

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

**Rolle der F_1F_0 -ATP Synthase und der
Rhomboidprotease Pcp1 für die Struktur und
Funktion von Mitochondrien**

Carsten Bornhövd

aus
Frankfurt am Main

München
2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert betreut. Prof. Dr. Patrick Cramer vertritt diese Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 13.04.2006



(Carsten Bornhövd)

Dissertation eingereicht am: 13.04.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am: 30.06.2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ursprung und Struktur von Mitochondrien	1
1.2 Funktion und Biogenese von Mitochondrien	2
1.3 Import von Proteinen in Mitochondrien	3
1.3.1 Die Translokasen der Außenmembran	5
1.3.2 Die TIM23-Translokase	6
1.3.3 Die TIM22-Translokase	7
1.3.4 OXA-Translokase	8
1.4 Morphologie von Mitochondrien	9
1.4.1 Mgm1 verbindet die mitochondriale Morphologie mit dem ATP-Spiegel	10
1.5 Intramembranproteolyse	12
1.5.1 Die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 in Hefe	12
1.6 Die oxidative Phosphorylierung	13
1.7 Die mitochondriale F ₁ F ₀ -ATP Synthase	15
1.8 Mitochondriale Suprakomplexe der Atmungskette	16
1.9 Zielsetzung	17
1.9.1 Cristae-Bildung durch die Oligomerisierung der F ₁ F ₀ -ATP Synthase	17
1.9.2 Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins Mgm1 an der Cristae-Struktur	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
2.1.2 Ethanolfällung und Phenolextraktion	20
2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	20
2.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	20
2.1.5 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.1.6 Agarosegelelektrophorese	22
2.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
2.1.8 Isolierung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen	22
2.1.9 Restriktionsverdau von DNA	23
2.1.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	23
2.1.11 Ligation von DNA	23
2.1.12 Änderungen in der Aminosäuresequenz mit QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	24
2.1.13 Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	24
2.1.14 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	24
2.1.15 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit DNA	25
2.1.16 DNA-Sequenzierung	25
2.1.17 Verwendete Vektoren	26
2.1.17.1 pYES2 (Invitrogen)	26
2.1.17.2 pRS315 und pRS416 (Sikorski und Hieter, 1989)	26
2.1.17.3 pYX223, pYX242	27
2.1.17.4 pGem4	27
2.1.18 Klonierungsstrategien	28
2.1.18.1 pYX242-Su e _{wt} , Su e ₁₋₆₅ , Su e ₁₋₄₆ , Su e _{18A}	28
2.1.18.2 pYES2 Pcp1	28
2.1.18.3 pRS315 Pcp1	29
2.1.18.4 Punktmutationen in pYES2-Pcp1 und pRS315 Pcp1	29
2.1.18.5 pYX242 Pcp1 TMD2-TCS-TMD3 und pYX242 Pcp1 C-term TCS	29
2.1.19 Weitere Verwendete Vektoren/Konstrukte	30
2.2 Methoden der Hefegenetik	31
2.2.1 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.3 Analyse des Verlustes von mtDNA in einer Hefekultur	32
2.3 Zellbiologische Methoden	32
2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie	32
2.3.2 Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit Rhodamin B-Hexylester	33

2.3.3 Färbung von DNA mit DAPI	33
2.3.4 Gesamtproteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	33
2.3.5 Subfraktionierung von Hefezellen.....	33
2.3.6 Isolation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.3.7 Sublokalisierung mitochondrialer Proteine.....	35
2.3.8 Alkalische Extraktion und Salzextraktion von mitochondrialen Membranen	36
2.3.9 <i>In vitro</i> Proteinimport von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien	36
2.3.10 Aufhebung des Membranpotentials durch Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP).....	37
2.3.11 Depletion von ATP in der mitochondrialen Matrix	37
2.4 Proteinchemische Methoden	38
2.4.1 <i>In vitro</i> Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine	38
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	39
2.4.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	39
2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.5 Harnstoff-Gelelektrophorese	40
2.4.6 Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)	40
2.4.7 Proteintransfer aus Gelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western-Blot).....	41
2.4.8 Autoradiographie	42
2.4.9 Messung des Membranpotentials in isolierten Mitochondrien.....	42
2.4.10 Messung des Absorptionsspektrums mitochondrialer Cytochrome	43
2.4.11 Messung spezifischer Enzymaktivitäten in Mitochondrien.....	43
2.4.11.1 Bestimmung der mitochondrialen F ₁ F ₀ -ATPase-Aktivität	44
2.4.11.2 Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität	45
2.4.11.3 Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität.....	46
2.4.11.4 Bestimmung der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität	46
2.4.11.5 Spezifischer Nachweis der F ₁ F ₀ -ATP Synthase-Aktivität in BN-PAGE-Gelen ...	46
2.4.12 Messung des Sauerstoffverbrauchs an isolierten Mitochondrien	47
2.4.13 Größenausschlusschromatographie.....	47
2.5 Immunologische Methoden.....	48
2.5.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper in Kaninchen.....	48
2.5.2 Bindung von Peptiden an eine Matrix zur Affinitätsreinigung von Antikörpern mit Sulfolink Coupling Gel [®] (Pierce)	49
2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern	50
2.5.4 Immundetektion von Proteinen	50
2.6 Puffer und Medien	52
2.7 Chemikalien und Geräte	53
2.7.1 Chemikalien	53
2.7.2 Geräte	54
3 Ergebnisse	55
3.1 Funktionsanalyse der Dimer-spezifischen F ₁ F ₀ -ATP Synthase-Untereinheit Su e.....	55
3.1.1 Funktionelle Charakterisierung der C-terminalen ‚coiled-coil‘ Strukturen von Su e..	55
3.1.2 Funktion der ‚coiled-coil‘-Domäne und der Transmembran-domäne von Su e bei der Oligomerisierung der F ₁ F ₀ -ATP Synthase	57
3.1.3 Reduzierte Stabilität der Suprakomplexe korreliert mit einer erhöhten Abbaurate von Su <i>g in vivo</i>	58
3.1.4 Die Wachstumsgeschwindigkeit ist reduziert in Stämmen mit verringerter Stabilität der Suprakomplexe	59
3.1.5 Mitochondriales Membranpotential ist reduziert bei Stämmen mit destabilisierten Oligomeren der F ₁ F ₀ -ATP Synthase	61
3.1.6 Reduktion des Membranpotentials oder verlängerte Verdopplungszeiten sind nicht durch den Verlust von mtDNA bedingt.....	64
3.1.7 Su e-Mutanten weisen ein tubuläres Netzwerk der Mitochondrien auf.....	65
3.1.8 Die Cristastrukturen in den Teildeletionen der Untereinheit e entsprechen denen des Wildtyps	66
3.1.9 Effekte der ‚coiled-coil‘-Deletionen auf die Aktivitäten der OXPHOS-Komplexe und die Integrität der inneren Membran.....	67
3.1.10 Die endogene Kontrolle der F ₁ F ₀ -ATP Synthase Aktivität durch das Inhibitorprotein (Inh1) wird durch die Suprakomplex-Bildung nicht beeinflusst	73

3.2 Charakterisierung der rhomboid-ähnlichen Protease Pcp1	75
3.2.1 Pcp1 ist ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrien-Membran	75
3.2.1.1 Pcp1 wird in der mitochondrialen Fraktion angereichert	75
3.2.1.2 In Mitoplasten kann Pcp1 proteolytisch abgebaut werden.....	76
3.2.1.3 Pcp1 ist ein integrales Protein der inneren Membran	77
3.2.2.1 Pcp1 wird durch die beiden Matrix-Proteasen MPP und MIP prozessiert.....	78
3.2.3 Topologie von Pcp1 in der inneren Mitochondrienmembran	81
3.2.3.1 <i>In vitro</i> Import-Experimente unterstützen eine N _{in} -C _{out} -Topologie.....	81
3.2.3.2 Modell der Topologie von Pcp1	82
3.2.4 Die Biogenese von Pcp1	83
3.2.4.1 Die Insertion von Pcp1 in die innere Mitochondrienmembran ist vom TIM23- Translokase-Komplex abhängig.....	83
3.2.4.2 Ssc1-Aktivität ist notwendig für die Biogenese von Pcp1	84
3.2.4.3 Die Insertion von Pcp1 in die mitochondriale Innenmembran ist ATP-abhängig	86
3.2.4.4 Anhand des Hydrophobizitätsprofils wird Pcp1 bis zum letzten hydrophoben Segment in die Matrix transloziert.....	87
3.2.5.1 Der C-Terminus von Pcp1 gelangt während der Biogenese nicht in die Matrix..	88
3.2.6 Funktionsanalyse der vorhergesagten katalytischen Triade.....	92
3.2.6.1 Untersuchung der an der proteolytischen Aktivität von Pcp1 beteiligten Aminosäuren.....	92
3.2.7 Der C-Terminus mit seinen positiven Ladungen ist nicht essentiell für die Prozessierung von Mgm1	93
3.2.8 Pcp1 befindet sich in einem 70-100 kDa großen Komplex.....	96
3.2.9 Die Koexpression zweier Punktmutanten komplementiert nicht die Funktion von Pcp1	97
4 Diskussion	99
4.1 Destabilisierung der Suprakomplexe der F ₁ F ₀ -ATP Synthase führt zu reduzierter Bioenergetisierung der Mitochondrien	99
4.1.1 Funktionsanalyse der ‚coiled-coil‘-Domänen	99
4.1.2 Auswirkung der reduzierten Stabilität der F ₁ F ₀ -ATP Synthase-Oligomere auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe.....	100
4.1.3 Abhängigkeit des Membranpotentials in Mitochondrien von der Suprakomplex-Bildung	102
4.1.4 Optimierung bioenergetischer Prozesse in Mitochondrien durch die Ausbildung von OXPHOS-Suprakomplexe	103
4.2 Die Rhomboidprotease Pcp1	105
4.2.1 Lokalisation und Topologie von Pcp1	105
4.2.2 Biogenese-Weg von Pcp1	106
4.2.3 Analyse der proteolytischen Aktivität von Pcp1	108
4.2.4 Komplexbildung von Pcp1.....	109
5 Zusammenfassung.....	111
5.1 Einfluss der F ₁ F ₀ -ATP Synthase-Oligomerisierung auf den bioener-getischen Zustand von Mitochondrien	111
5.2 Charakterisierung der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1	111
6 Summary	113
6.1 Role of oligomerisation of the F ₁ F ₀ -ATP synthase on the bioenergetic state of mitochondria	113
6.2 Characterisation of the rhomboid protease Pcp1	113
7 Literaturverzeichnis	117
8 Abkürzungsverzeichnis	129
9 Danksagung	131

1 Einleitung

Die eukaryotische Zelle enthält verschiedene membranumschlossene Reaktionsräume oder Kompartimente. Manche dieser Zellorganellen sind von einer einzelnen biologischen Membran abgetrennt (Endoplasmatisches Retikulum, Peroxysomen, Lysosomen), während andere von zwei biologischen Membranen begrenzt sind (Zellkern, Mitochondrien sowie in Pflanzen Chloroplasten und andere Plastiden). Die verschiedenen Zellorganellen ermöglichen der Zelle, durch Bildung eines spezifischen chemischen Milieus unterschiedliche Stoffwechsel-Reaktionen räumlich getrennt auszuführen.

1.1 Ursprung und Struktur von Mitochondrien

Phylogenetisch ist die eukaryotische Zelle aus einem Endosymbioseprozess eines aeroben Eubakteriums mit einer anaeroben protoeukaryotischen Urzelle hervorgegangen. Anhand der DNA wurde die Abstammung der Mitochondrien auf α -Proteobakterien (*Rickettsia*, *Anaplasma* und *Ehrlichia*) zurückgeführt (Gray et al., 1999). Eine solche Abstammung erklärt die starken Ähnlichkeiten zwischen Mitochondrien und Bakterien.

Mitochondrien sind durch zwei Membranen in vier Subkompartimente unterteilt: in zwei Membrankompartimente, die Innenmembran (IM) und die Außenmembran (AM), sowie in zwei wässrige Kompartimente, den Intermembranraum (IMR), der sich zwischen der Innen- und der Außenmembran befindet, und der Matrix, die von der Innenmembran umschlossen ist. Durch falten- oder röhrenförmige Einstülpungen der Innenmembran, den Cristae, kann deren Fläche vergrößert werden. Die Struktur und Anzahl der Cristae sind sowohl von der Art des Gewebes als auch von den Wachstumsbedingungen abhängig (Perkins et al., 1998), (Perkins et al., 2001), (Mannella et al., 2001), (Mannella, 2005). Der eng an die Außenmembran anliegende Teil der Innenmembran wird als innere Grenzmembran bezeichnet; diese hat stellenweise Berührungspunkte mit der Außenmembran über so genannte Kontaktstellen (,contact sites') (Reichert and Neupert, 2002). Der Übergang von der inneren Grenzmembran in die Cristaemembran weist tubuläre Strukturen auf. Diese haben konstante Durchmesser mit variablen Längen (Perkins et al., 1997); (Frey and Mannella, 2000), (Perkins and Frey, 2000), (Mannella et al., 2001), (Frey et al., 2002), (Mannella, 2005) und werden ,cristae junctions' genannt. Ob Proteine, wie Mitofusin oder Prohibitin, an der spezifischen Ausbildung dieser Strukturen beteiligt sind wird diskutiert (John et al., 2005). Eine Funktion der ,cristae junctions' könnte in der Ausbildung einer Diffusionsbarriere liegen. Dies würde eine Unterteilung des Intermembranraums und der Innenmembran in jeweils zwei weitere unterschiedliche

1 Einleitung

Kompartimente bewirken, den Intermembranraum und den Intracristaeraum (Mannella et al., 1997), (Mannella, 2005).

Die Außenmembran beinhaltet im Vergleich zur Innenmembran relativ wenige Proteine. Unter anderem sind dies Proteine, die an der mitochondrialen Morphologie, der Lipid-Biosynthese sowie an Transportmechanismen beteiligt sind. Poren bildende Proteine (Porine) dienen dem Durchlass von kleinen Metaboliten und Proteinen bis zu einer Größe von ca. 5 kDa. Bei der Translokation von Proteinen sind Transportkomplexe beteiligt. Dagegen ist die Innenmembran undurchlässig, was für den Aufbau eines Membranpotentials unerlässlich ist. Für den Transport von Proteinen und Metaboliten in die Matrix existieren spezifische Transportsysteme.

1.2 Funktion und Biogenese von Mitochondrien

Eine wichtige Funktion der Mitochondrien besteht in der Bereitstellung von Energie in Form von ATP für die gesamte Zelle. Für die Synthese von ATP wird über die Atmungskettenkomplexe ein Protonengradient an der Innenmembran erzeugt. Dieser Gradient wird dann von der F_1F_0 -ATP Synthase zur Synthese von ATP genutzt (Mitchell, 1961). Dieser Prozess der Verstoffwechslung von Substrat über die Atmungskettenkomplexe und der Nutzung durch die F_1F_0 -ATP Synthase wird als oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bezeichnet (Saraste, 1999).

In speziellen Geweben wird der Protonengradient allerdings nicht zur ATP Synthese verwendet, sondern dient mittels entkoppelnden Protonen transportierenden Proteinen der Thermogenese (Stuart et al., 1999). Damit sind Mitochondrien für homoiotherme Organismen zum Erhalt der Körpertemperatur notwendig.

Weitere Funktionen der Mitochondrien liegen in der Häm-Biosynthese, der β -Oxidation von Fettsäuren, der Synthese bestimmter Lipide, der Pyrimidin-Biosynthese, dem Aminosäure-Metabolismus sowie die Stickstoffentgiftung durch den Harnstoffzyklus (Scheffler, 2001). Zusätzlich zählt auch die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern zu den essentiellen Funktionen der Mitochondrien; diese sind nicht nur für mitochondriale Proteine wichtig, sondern dienen auch als Koenzyme zytosolischer und nukleärer Proteine (Lill and Kispal, 2000), (Muhlenhoff and Lill, 2000), (Lill and Muhlenhoff, 2005), (Johnson et al., 2005).

Neben diesen weitgehend metabolischen Aufgaben der Mitochondrien sind diese an anderen zentralen zellulären Prozessen beteiligt. So tragen Mitochondrien durch die Aufnahme von Kalzium zur Kalzium-Homöostase bei (Nicholls, 2005) und sind an apoptotischen Vorgängen durch Freisetzung bestimmter Signalproteine wie Cytochrom c beteiligt (Bernardi et al., 1999), (Bernardi et al., 2001), (Kuwana and Newmeyer, 2003), (Gibson, 2005).

Aufgrund der Vielzahl mitochondrialer Funktionen ist es nicht erstaunlich, dass viele Krankheiten auf Dysfunktionen von Mitochondrien zurückzuführen sind. Besonders in stark energieabhängigen, post-mitotischen Geweben wie Muskeln und Nerven wirken sich Funktionsstörungen der Mitochondrien stark aus (Wallace, 1999), (Smeitink et al., 2001), (McKenzie et al., 2004). Pathologische Zustände wie Enzephalopathien oder neurodegenerative Erkrankungen sind daher mit mitochondrialen Fehlfunktionen assoziiert. Dabei können Nervenzellen des gesamten Organismus wie auch nur bestimmte Nervenzellen betroffen sein. Ein Beispiel hierfür ist der Sehnerv, der bei der autosomal dominanten Optikusatrophie betroffen ist (Alexander et al., 2000). Wie es zu solch lokal begrenzten Auswirkungen kommen kann, ist eine offene Frage.

1.3 Import von Proteinen in Mitochondrien

Proteomanalysen von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* ergaben, dass ungefähr 99% der mitochondrialen Proteine kernkodiert sind (Sickmann et al., 2003), (Prokisch et al., 2004), (Reichert and Neupert, 2004). Von den 700-1000 mitochondrialen Proteinen, die in den verschiedenen Studien gefundenen wurden, werden in *S. cerevisiae* nur acht von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert. Ferner kodiert das ca. 85 kb große Mitochondriengenom von *S.cerevisiae* für zwei rRNA-Moleküle (21S und 15S), 24 tRNAs und den 9S RNA-Anteil der RNase P (Foury et al., 1998). Die zytosolisch synthetisierten Proteine müssen daher mit Hilfe von Translokasen in die Mitochondrien transportiert werden, von denen fünf identifiziert wurden: die zwei Translokasen der äußeren Membran, der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) und der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins*) sowie drei Translokasen in der Innenmembran, der TIM23-Komplex und der TIM22-Komplex (*translocases of the inner membrane*) und der OXA1-Komplex (*cytochrom c-oxidase assembly 1*) (Abb. 1.1) (Herrmann and Bonnefoy, 2004), (Wiedemann et al., 2004). Auch eine tRNA wird in Hefe-Mitochondrien importiert (Rinehart et al., 2005).

Die mitochondrialen Vorstufenproteine werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational importiert. Dazu werden die synthetisierten Proteine im Zytosol durch Chaperone im entfalteten, importkompetenten Zustand gehalten (Beddoe and Lithgow, 2002), (Young et al., 2003). Die Vorstufenproteine enthalten Signalsequenzen wobei zwischen N-terminalen Präsequenzen und internen Signalsequenzen unterschieden wird. N-terminale Präsequenzen bestehen aus 20-80 Aminosäuren, die eine amphipathische α -Helix Struktur einnimmt. Diese besteht aus Aminosäuren mit positiven Ladungen und hydroxylierten Resten auf der einen und hydrophoben Aminosäuren auf der anderen Seite. Die internen Signalsequenzen sind dagegen weit weniger charakterisiert (Endo and Kohda, 2002).

Innenmembran. Durch eine proteolytische Prozessierung wird anschließend das reife Protein in den IMR entlassen (Herrmann and Hell, 2005).

1.3.1 Die Translokasen der Außenmembran

Beide Translokasen der Außenmembran sind essentiell. Der TOM-Komplex ist bei jeglichen Importvorgängen nukleär kodierter Proteine beteiligt (Neupert, 1997). Während der erst kürzlich identifizierte TOB-Komplex bei der Biogenese von β -Barrel'-Proteinen der äußeren Membran beteiligt ist (Paschen et al., 2003), (Wiedemann et al., 2003).

Der TOM-Komplex setzt sich aus den Rezeptorproteinen (Tom20 und Tom70) und dem TOM-Kernkomplex zusammen. Die Rezeptorproteine sind lose mit dem Kernkomplex verbunden, dieser besteht aus den restlichen fünf TOM-Komponenten Tom40, Tom22, Tom5, Tom6 und Tom7 (Neupert, 1997), (Ryan et al., 2000). Die zytosolische Domäne der Rezeptorproteine dient der Interaktion mit zytosolischen Vorstufenproteinen, dabei ist Tom20 primärer Rezeptor für Vorstufenproteine mit N-terminaler Signalsequenz, während Tom70 interne Signalsequenzen erkennt. Da jedoch die Deletionen eines der Rezeptorproteine nicht letal ist, scheinen diese ein redundantes Bindungsverhalten aufzuweisen (Ramage et al., 1993). Die von den Rezeptorproteinen gebundenen Vorstufenproteine werden an Tom22 weitergeleitet und dann dem TOM-Kernkomplex zugeführt (van Wilpe et al., 1999).

Tom40 enthält einen hohen Anteil an antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen, mit denen es vermutlich den proteinleitenden Kanal bildet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur dreidimensionalen Rekonstruktion des TOM-Komplexes aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* wiesen eine Struktur mit 2-3 Poren auf (Ahting et al., 1999), (Kunkele et al., 1998), (Model et al., 2002). Mit einem Durchmesser von ca. 2,5 nm sind diese Poren theoretisch groß genug, um entfaltete Polypeptidketten oder zwei nebeneinander liegende α -Helices passieren zu lassen. Isolierter TOM-Kernkomplex weist dagegen nur eine Pore auf. Vermutlich wird die Pore durch ein Tom40-Dimer gebildet (Ahting et al., 2001). In blauen Nativgelen weist der TOM-Komplex eine Größe von 400 kDa auf, mit den Rezeptorproteinen 490-600 kDa (Dekker et al., 1998).

Den kleinen Proteinen des TOM-Komplexes (Tom5, Tom6 und Tom7) wurden eher strukturelle Funktionen bei der Assemblierung und Stabilisierung des Komplexes zugeschrieben (Honlinger et al., 1996), (Dekker et al., 1998), (Model et al., 2001), (Dembowski et al., 2001), (Schmitt et al., 2005).

Der TOB-Komplex besteht aus den Komponenten Tob55 (Sam50), Mas37 und Tob38 (Sam35) (Paschen et al., 2003), (Kozjak et al., 2003), (Wiedemann et al., 2003), (Waizenegger et al., 2004). β -Barrel-Vorstufenproteine werden über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transloziert und direkt für die Insertion an den TOB-Komplex weitergegeben. Eine Beteiligung der kleinen Tim-Proteine, die hydrophobe Proteine

beim Transfer vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex binden, konnte für den Transfer auf den TOB-Komplex nicht gezeigt werden (Paschen et al., 2005), (Milenkovic et al., 2004).

1.3.2 Die TIM23-Translokase

Nach der Passage der N-terminalen Signalsequenz durch die Außenmembran in den IMR werden Vorstufenproteine mit N-terminaler Signalsequenz vom TIM23-Komplex erkannt und in die Matrix transloziert. Einmal die Innenmembran durchspannende Präproteine werden während des Transfers in die Membran inseriert (Berthold et al., 1995), (Moro et al., 1999), (Jensen and Dunn, 2002), (Truscott et al., 2003a). Dazu besitzen diese zusätzlich zur Präsequenz einen hydrophoben Abschnitt, der den Transfer in die Matrix stoppt. Der arretierte hydrophobe Abschnitt wird anschließend lateral in die Innenmembran entlassen. Ein solcher Sortierungsmechanismus wird als ‚Stop-Transfer‘ bezeichnet.

Der Komplex besteht aus mindestens acht essentiellen Proteinen; dem Präsequenzrezeptor, dem membranintegrierten Translokationskanal sowie einem Importmotor auf der Matrix-Seite (Paschen and Neupert, 2001). Als Rezeptor wurde Tim50 postuliert, das die Innenmembran einfach durchspannt. Der im IMR gelegene C-Terminus von Tim50 interagiert mit dem N-Terminus (Aminosäuren 50-100) von Tim23. Gebundene Vorstufenproteine werden im Intermembranraum vom TOM-Komplex an Tim23 weitergeleitet (Mokranjac and Neupert, 2005).

Der Kanal wird aus den C-terminalen membranständigen Domänen von Tim17 und Tim23 gebildet (Truscott et al., 2001), (Milisav et al., 2001). Der N-Terminus von Tim23 kann durch die Außenmembran ins Zytosol reichen, wodurch Tim23 beide Membranen durchspannt (Donzeau et al., 2000). Vermutlich dient eine solche Topologie der Anreicherung von Tim23 in der inneren Grenzmembran und damit einem effizienteren Transfer vom TOM-Komplex zur TIM23-Translokase (Donzeau et al., 2000), (Mokranjac and Neupert, 2005). Eine direkte Interaktion zwischen den beiden Komplexen wurde vor kurzem nachgewiesen, wobei die nicht essentiellen Komponente des TIM23-Komplexes, Tim21, direkt mit Tom22 interagiert (Mokranjac et al., 2005a), (Chacinska et al., 2005).

Der Transport über die TIM23-Translokase ist Membranpotential- $(\Delta\Psi)$ - und ATP-abhängig. Die Translokation der positiv geladenen Präsequenz in die Matrix wird durch das Membranpotential unterstützt. Zusätzlich scheint das Membranpotential für die Dimerisierung von Tim23 nötig zu sein (Herrmann and Neupert, 2000). Die vollständige Translokation in die Matrix erfolgt durch den Importmotor, der ATP-abhängig die Vorstufenproteine in die Matrix transloziert (Neupert and Brunner, 2002). Der Importmotor besteht aus fünf Proteinen, Tim44, mtHsp70 (Ssc1), Mge1, Tim16 und Tim14. Tim44 ist peripher mit der Membran assoziiert und rekrutiert mtHsp70 an den Tim17/23-

Kanal. Wie alle Mitglieder der Hsp70-Familie bindet auch das mitochondriale Hsp70 das Substratprotein ATP-abhängig (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Durch die Bindung der transportierten Polypeptidkette wird ein Zurückrutschen verhindert. Des Weiteren ist Tim44 für die Assemblierung des Tim14/Tim16-Subkomplexes mit der TIM23-Translokase verantwortlich (Mokranjac and Neupert, 2005). Das membranständige Tim14 enthält eine J-Domäne, die stimulierend auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wirkt (Mokranjac et al., 2003), (Truscott et al., 2003b), (D'Silva et al., 2003). Durch die Hydrolyse wird die Bindungstasche von mtHsp70 verschlossen und damit das Substrat gebunden. Mge1 ist ein Nukleotidaustauschfaktor, der das gebundene ADP entfernt und so eine erneute Bindung von ATP ermöglicht. Im ATP-gebundenen Zustand ist die Bindungstasche von mtHsp70 wieder offen, und die Polypeptidkette kann sich vom Chaperon lösen.

Tim16 ist ein Protein mit einer J-ähnlichen Domäne; es wirkt jedoch nicht stimulierend auf die ATP-Hydrolyse. Die genaue Funktion von Tim16 ist nicht bekannt, jedoch scheint es einen stabilen Komplex mit Tim14 zu bilden und die Aktivität von Tim14 zu regulieren (Kozany et al., 2004), (Mokranjac et al., 2005b), (D'Silva et al., 2005).

Für den genauen Mechanismus des Hsp70-Motors werden zwei Modelle diskutiert. Das ‚Brownian-Ratchet‘- oder ‚Trapping‘-Modell sieht das Hsp70 als molekularen Sperrhaken, der an das translozierte Vorstufenprotein bindet und damit ein Zurückrutschen der Polypeptidkette verhindert. Dabei transloziert das Vorstufenprotein aufgrund der Brownschen-Molekularbewegung durch den Translokationskanal; der gerichtete Transport wird durch die wiederholte Bindung von Hsp70-Molekülen erreicht (Okamoto et al., 2002), (Neupert and Brunner, 2002). Das zweite Modell wird als ‚Pulling-Modell‘ oder ‚Power-stroke-Modell‘ bezeichnet. Bei diesem Modell erfolgt die Translokation durch die bei der ATP-Hydrolyse erfolgende Konformationsänderung des Hsp70, dies führt zum aktiven Ziehen des Präproteins in die Matrix durch das Hsp70 (Matouschek et al., 2000).

In der Matrix wird die N-terminale Präsequenz durch die Matrix-Prozessierungs-Peptidase (MPP) abgespalten und die Polypeptidkette kann sich mit Hilfe der mitochondrialen Chaperone (Hsp70/Hsp60) in die native Konformation falten (Neupert, 1997).

1.3.3 Die TIM22-Translokase

Der TIM22-Komplex inseriert Proteine, die über mehrere Transmembrandomänen verfügen und zwei verschiedenen Proteingruppen angehören, in die innere Membran. Zu den Substraten gehören Metabolit-Transportproteine der Carrier-Familie sowie die Translokase Untereinheiten Tim17, Tim23 und Tim22 selbst (Sirrenberg et al., 1996), (Endres et al., 1999), (Jensen and Dunn, 2002). Eine interne Signalsequenz, die

1 Einleitung

charakteristisch für eine TIM22-abhängige Biogenese dieser Proteinklasse ist, konnte bisher nicht identifiziert werden. Der Komplex besteht aus der essentiellen Komponente Tim22 sowie den Proteinen Tim18 und Tim54. Die Größe des Komplexes wurde auf ~300 kDa bestimmt (Sirrenberg et al., 1996). Der Insertionskanal wird durch Tim22 gebildet, dessen Porendurchmesser in elektronenmikroskopischen Aufnahmen 1,6 nm betrug (Rehling et al., 2003). Die Funktion von Tim18 und Tim54 sind unbekannt.

Vorstufenproteine, die über den TIM22-Komplex inserieren, werden über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transloziert und binden auf der IMR-Seite des TOM-Komplexes noch während der Translokation über die Außenmembran an einen löslichen 70 kDa Tim9/10- oder Tim8/13-Komplex (Paschen et al., 2000), (Koehler et al., 1998), (Adam et al., 1999), (Bauer et al., 2000). Diese Bindung verhindert das Zurückgleiten der Polypeptidkette und verhindert das Aggregieren der hydrophoben Domänen. Anschließend werden die Vorstufenproteine am TIM22-Komplex von einem assoziierten 70 kDa Komplex (Tim9/10/12) übernommen und an die Translokase weitergeleitet. Die Membraninsertion ist im Gegensatz zum TIM23-Komplex nur vom Membranpotential abhängig.

1.3.4 OXA-Translokase

Die OXA-Translokase vermittelt die Insertion von einer weiteren Gruppe Proteinen in die innere Mitochondrienmembran (Hell et al., 2001). In *N.crassa* konnte gezeigt werden, dass Oxa1 ein 200-250 kDa Homooligomer ausbildet, das den Hauptbestandteil der OXA-Translokase bildet (Nargang et al., 2002). Oxa1 wurde im Zusammenhang mit der Assemblierung des Cytochrom *c* Oxidase Komplexes entdeckt (oxidase assembly 1) (Bonney et al., 1994), (Bauer et al., 1994) und gehört zur stark konservierten Protein-Translokations-Familie YidC/Oxa1/Alb3 (Kuhn et al., 2003). Oxa1 vermittelt die Insertion sowohl nukleär als auch mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran (Herrmann, 2003). Entsprechend müssen nukleär kodierte Proteine zunächst vollständig über die TIM23-Translokase in die Matrix transportiert werden. Die Insertion der Membranproteine ist vergleichbar mit einem Export aus der Matrix, wie es für bakterielle Proteine beschrieben ist. Die Funktion von Oxa1 entspricht dabei dem bakteriellen YidC. Aufgrund der konservierten Funktion von Oxa1 wird ein solcher Insertionsmechanismus als konservativer Sortierungsweg bezeichnet (Dalbey and Kuhn, 2000), (Herrmann and Neupert, 2000). Möglicherweise hat Oxa1 auch Chaperon-ähnliche Funktionen und ist direkt an der Assemblierung von Komplexen in der Innenmembran beteiligt (Kuhn et al., 2003).

Substrate des OXA-Komplexes folgen in der Regel der ‚positiv-inside-rule‘, wodurch nach Insertion in die Innenmembran die negativen Ladungen bevorzugt auf der positiv geladenen Seite der IM im Intermembranraum liegen, während positive Ladungen auf der Matrix-Seite verbleiben (Dalbey et al., 1995), (Rojo et al., 1999).

Oxa1 ist für die Insertion der Untereinheit Cox2 der Cytochrom *c* Oxidase essentiell (Hell et al., 1997), während die Insertion der Untereinheiten Cox1 und Cox3 durch Oxa1 lediglich erleichtert wird (Hell et al., 1998). Interessanterweise verläuft die Biogenese von Oxa1 selbst auch über den konservativen Sortierungsweg (Herrmann et al., 1997).

1.4 Morphologie von Mitochondrien

Die Struktur der Mitochondrien ist stark vom Zelltyp abhängig und variiert zwischen verschiedenen Organismen (Frey and Mannella, 2000). In *S. cerevisiae* liegen sie in Form eines retikulären Netzwerks, unterhalb des Zellkortex gelegen, vor (Egner et al., 2002). Mitochondrien sind sehr dynamische Organellen (Bereiter-Hahn, 1990), (Bereiter-Hahn and Voth, 1994), die ständigen Fusions- und Teilungsprozessen unterliegen (Nunnari et al., 1997), (Shaw and Nunnari, 2002). Eine Änderung der mitochondrialen Morphologie, deren Verteilung sowie Dynamik haben Auswirkungen auf die verschiedensten zellulären Funktionen.

Verschiedene Aufgaben dieser Dynamik wurden postuliert: So spielen die Teilungsprozesse eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Dabei sind für die Freisetzung des Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum die Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie notwendig. Eine Inhibition des Teilungsprozesses kann daher die Freisetzung des Cytochrom *c* und damit die Ausführung des apoptotischen Programms durch die Aktivierung von Caspasen verhindern (Frank et al., 2001), (Karbowski and Youle, 2003), (Lee et al., 2004).

Bei der Fusion zweier Hefezellen dient die Fusion der Mitochondrien einer gleichmäßigen Durchmischung der parentalen mitochondrialen DNA (Berger and Yaffe, 2000). Mutationen in der mitochondrialen DNA, die durch freie Sauerstoffradikale (ROS), die bei der sauerstoffabhängigen ATP-Produktion entstehen, können durch Fusions- und Teilungsprozesse mit nicht mutierter DNA durchmischt werden. Somatischer Mutationen, die zu einem Defekt der Atmungskette führen, können so durch nicht mutierte DNA komplementiert werden (Ono et al., 2001), (Nakada et al., 2001), (Westermann, 2003). In den Schäden der mitochondrialen DNA wird eine Ursache der Zellalterung vermutet. Die Dynamik der Mitochondrien stellt möglicherweise einen Schutzmechanismus gegen diese Zellalterung dar (Scheffler, 2001). Ob die veränderte mitochondriale DNA separiert und selektiv entfernt werden kann, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Zusätzlich kann über das retikuläre Netzwerk Energie in Form des Protonengradienten ohne die Diffusion von Substrat in der gesamten Zelle verteilt werden. Das Membranpotential baut sich über das gesamte Netzwerk auf (Amchenkova et al., 1988) und kann am Ort gesteigerten Energiebedarfs über die ADP-Konzentration selektiv in ATP umgewandelt werden. Die Substratzufuhr kann dabei an einer

beliebigen Stelle der Zelle stattfinden. Eine weitere wichtige Funktion der Fusion von Mitochondrien wurde bei der Zelldifferenzierung postuliert. Die Notwendigkeit des mitochondrialen Fusionsprozesses wurde in der Fliege *Drosophila melanogaster* gezeigt. Dabei kommt es während der Spermatogenese zur Fusion der Mitochondrien zum so genannten Nebenkern. Dieser lagert sich an die Basis der Flagellen an und kann so die für die Bewegung der Spermien notwendige Energie zur Verfügung stellen (Hales and Fuller, 1997). Ohne die Fusion der Mitochondrien wird die Spermatogenese gestoppt, und die männlichen Fliegen sind steril.

1.4.1 Mgm1 verbindet die mitochondriale Morphologie mit dem ATP-Spiegel

Mgm1 ist ein Dynamamin-ähnliches Protein in Mitochondrien. Dynamamine sind normalerweise bei der Endozytose beteiligt und assemblieren dabei ringförmig um die Einstülpung der Plasmamembran (Hinshaw, 2000). Die Deletion von Mgm1 führt zum Verlust der mtDNA (Mgm1: mitochondrial genome maintenance 1) und damit zur Respirationsdefizienz (Jones and Fangman, 1992). Weiterhin führt der Verlust von Mgm1 zur Fragmentierung der Mitochondrien und der Bildung von mitochondrialen Aggregaten (Guan et al., 1993). Aufgrund dieses Phänotyps wurde eine Beteiligung von Mgm1 bei Fusionsprozessen von Mitochondrien vorgeschlagen (Wong et al., 2000), (Wong et al., 2003). Allerdings wurde in temperatursensitiven Mgm1 Mutanten, bei denen durch die Deletion der Teilungskomponente DNM1, das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung wieder hergestellt worden war, bei restriktiver Temperatur mitochondriale Fusion beobachtet (Wong et al., 2000). In Verbindung mit der Ähnlichkeit zu Dynamaminen und der Lokalisation von Mgm1 in Mitochondrien führten zu Spekulationen, dass Mgm1 an der Teilung der Innenmembran oder der Ausbildung der Cristae beteiligt sein könnte (Wong et al., 2000). Mgm1 könnte den Dynamaminen ähnliche ringförmige Strukturen bilden und die Innenmembran einschnüren oder durch Ausbildung eines Ringes auf der Intermembranseite die ‚cristae junctions‘ stabilisieren.

Die Vorstufe von Mgm1 trägt eine N-terminale Präsequenz, der eine Transmembrandomäne folgt. C-terminal wird eine GTPase-Domäne, eine Dynamamin-Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne vorhergesagt. Zwischen der Transmembrandomäne und den C-terminalen Domänen befindet sich eine weitere hydrophobe Sequenz (Herlan et al., 2004). In den Mitochondrien kommt Mgm1 in zwei Isoformen vor, der großen Isoform (l-Mgm1) von 97 kDa und der kleinen Isoform (s-Mgm1) von 84 kDa. In Mitochondrien liegen die beiden Isoformen im Verhältnis von ungefähr 1:1 vor. Die C-terminalen Domänen beider Isoformen befinden sich im Intermembranraum (Wong et al., 2000), (Herlan et al., 2003). Die große Isoform ist in der Innenmembran verankert, während die kleine Isoform peripher assoziiert ist. Der Entstehung der kleinen Isoform liegt eine Prozessierung durch die Rhomboidprotease

Pcp1 zugrunde (Herlan et al., 2003), (McQuibban et al., 2003), (Sesaki et al., 2003). Pcp1 ist ein integrales Protein der Innenmembran. Die Substrate von Pcp1 werden innerhalb einer hydrophoben Domäne geschnitten. Die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 hängt vom Importmotor und dem energetischen Zustand (ATP-Level) der Mitochondrien ab. Die Spaltung erfolgt in der N-terminal gelegenen zweiten hydrophoben Sequenz (Herlan et al., 2004).

Für die Entstehung der großen Isoform wird der N-Terminus des Mgm1-Vorstufenproteins in Abhängigkeit von der Signalsequenz über die TIM23-Translokase in die Matrix transloziert. Die Polypeptidkette stoppt während des Transfers mit dem ersten hydrophoben Segment in der Translokase und wird lateral in die innere Membran inseriert. Nach der Prozessierung der Signalsequenz durch MPP entsteht I-Mgm1. Alternativ dazu kann die Translokation des N-Terminus jedoch in Abhängigkeit vom Importmotor und dem ATP-Gehalt der Matrix weiter transloziert werden. Wird das zweite hydrophobe Segment erreicht, kann dieses nach der lateralen Insertion durch Pcp1 prozessiert werden. Dieser Prozess wird als „alternative Topogenese“ von Mgm1 bezeichnet (Abb. 1.2) (Herlan et al., 2004). Die koordinierte Bildung der beiden Mgm1-Isoformen ist für die Ausbildung des mitochondrialen Netzwerks essentiell. Zellen mit einem veränderten Verhältnis der beiden Isoformen untereinander weisen eine Fragmentierung der Mitochondrien auf (Herlan et al., 2003), (Herlan et al., 2004).

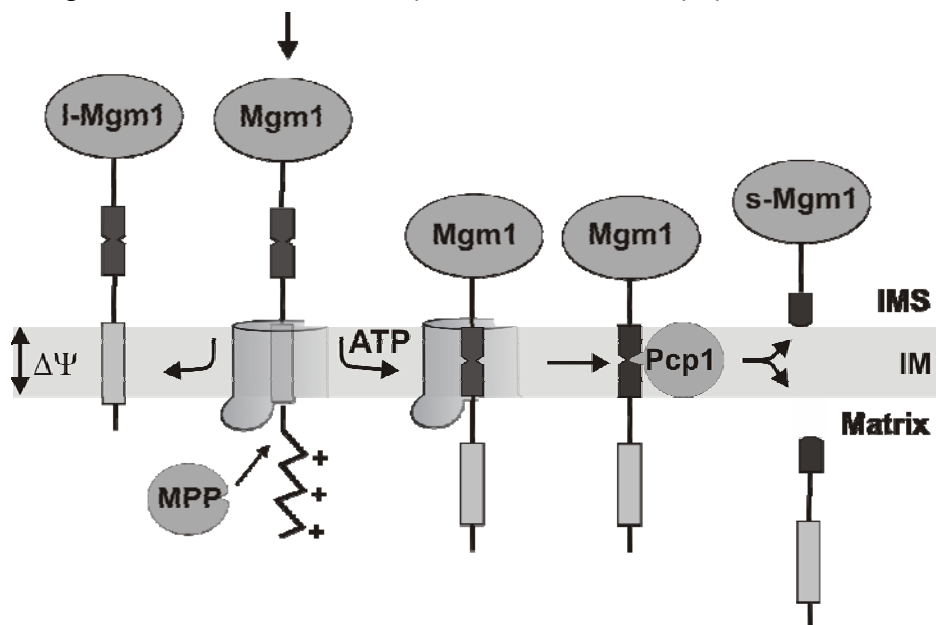


Abb. 1.2 : **Modell der Biogenese der beiden Mgm1 Isoformen.** Bei der Bildung der langen Isoform (I-Mgm1) wird während des Imports der erste hydrophobe Abschnitt lateral in die Innenmembran inseriert. Für die kurze Isoform (s-Mgm1) wird das Vorstufenprotein ATP abhängig bis zum zweiten hydrophoben Segment in die Matrix transloziert und erst dann in die Membran inseriert. In der Membran wird dieses hydrophobe Segment von der Rhomboidprotease Pcp1 erkannt und es kommt zur Prozessierung in der Membran. Die Präsenz von Mgm1 wird durch die MPP entfernt.

Als eine mögliche Funktion dieser Kopplung des energetischen Zustands der Mitochondrien mit der Fragmentierung wurde der Erhalt der mitochondrialen DNA

postuliert. Geschädigte Mitochondrien könnten so aufgrund der Fusionsdefizienz vom Netzwerk separiert werden und könnten anschließend entfernt werden (Herlan et al., 2004).

1.5 Intramembranproteolyse

Intramembranproteasen spalten Peptid-Bindungen in der Transmembran-domäne von Substratproteinen innerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran. Wie ein solcher hydrolytischer Prozess im hydrophoben Milieu der Membran erfolgen kann, ist eine der Hauptfragen diesbezüglich. Intramembranproteolytische Prozesse kommen bei der intrazellulären Signal-Weitergabe, dem Lipid-Metabolismus und der Stress-Antwort vor (Brown 2000), (Weihofen and Martoglio, 2003). Auch bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit spielt eine Intramembranprotease, die γ -Sekretase, eine wichtige Rolle (Selkoe and Schenk, 2003). Vier Unterklassen von Intramembranproteasen werden unterschieden: die S2-P- (,site-2 proteasen') (Rawson et al., 1997), (Duncan et al., 1997), die SPP- (,signal peptid proteases'), die Aspartyl-Proteasen (De Strooper et al., 1998), (Wolfe et al., 1999), (Ponting et al., 2002), (Weihofen et al., 2002), sowie die Rhomboid-Serinproteasen (Lee et al., 2001), (Urban et al., 2001).

1.5.1 Die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 in Hefe

Pcp1 aus *S.cerevisiae* gehört zu der Familie der Rhomboid-proteasen. Dies sind stark konservierte Serinproteasen (Wasserman et al., 2000), (Koonin et al., 2003), die ihr Substrat innerhalb der Lipiddoppelschicht schneiden. Rhomboidproteasen kommen sowohl in Eubakteria, Eukarya und Archea vor (Koonin et al., 2003). Für wenige Proteasen dieser Klasse ist eine genaue Funktion bekannt.

Ein charakteristisches Merkmal der Rhomboidprotease Familie ist die aus sechs Transmembranhelices bestehende ,Core'-domäne. Teilweise besitzen einige Vertreter dieser Familie eine weitere siebte Transmembrandomäne, die sowohl N-terminal als auch C-terminal von der ,Core'-domäne gelegen sein kann (Koonin et al., 2003). Als katalytisches Zentrum der Rhomboidproteasen wurde ein konserviertes Motiv aus den Aminosäuren Serin, Asparagin und Histidin identifiziert. Die Mutation des Serinrestes führt zum Verlust der proteolytischen Aktivität von Pcp1 (Esser et al., 2002), YqgP (Lemberg et al., 2005) und GlpG (Maegawa et al., 2005).

Rhomboidproteasen (Huppert and Kopan, 2001) wurden zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Freeman et al., 1992), (Sturtevant et al., 1993), (Fraering et al., 2004). Dort ist die Serinprotease Rhomboid-1 an der Signaltransduktion beteiligt. Der membrangebundene EGF (,epidermal growth factor') Ligand Spitz wird in Abwesenheit des Proteins Star im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gehalten (Lee et

al., 2001). Durch Star wird Spitz in den Golgi-Apparat transferiert. Dort befindet sich die Serinprotease Rhomboid-1, die durch Proteolyse den Liganden Spitz in das Golgi-Lumen freisetzt. Anschließend wird das Spitz-Fragment über den sekretorischen Weg in den extrazellulären Raum entlassen und kann dort an den EGF-Rezeptor anderer Zellen binden (Lee et al., 2001) (Urban et al., 2001), (Urban et al., 2002a), (Urban et al., 2002b).

Zusammen mit AarA aus *Providencia stuartii* sind damit zwei bekannte Rhomboidproteasen an der Zell-Zell Kommunikation beteiligt. Andere Vertreter der Rhomboidproteasen scheinen wichtige Funktionen beim Eindringen von Protozoen in die Wirtszelle zu haben (*Toxoplasma* bzw. *Plasmodium*) (Gallio et al., 2002), (Urban et al., 2002b). Vor kurzem wurde auch eine mitochondriale Rhomboidprotease (Pcp1) und deren Substrate identifiziert (Esser et al., 2002), (McQuibban et al., 2003), (Herlan et al., 2003), (Sesaki et al., 2003).

Pcp1 ist unmittelbar an der Prozessierung der mitochondrialen Proteine Mgm1 (Herlan et al., 2003), (McQuibban et al., 2003), (Sesaki et al., 2003) und Cytochrom *c*-Peroxidase (Ccp1) (Esser et al., 2002) beteiligt. Beide werden zusätzlich durch weitere Proteasen in den Mitochondrien prozessiert. Vermutlich wird die Präsequenz von Mgm1 vor der Spaltung durch Pcp1 von der in der Matrix gelegene Matrix-Prozessierungs-Protease (MPP) entfernt. Das Entfernen der Signalsequenz von Mgm1 ist nicht essentiell für die weitere Prozessierung durch Pcp1 (nicht publizierte Daten), während Ccp1 zuvor durch die mitochondriale AAA-Protease Yta10/Yta12 geschnitten werden muss (Esser et al., 2002). Yta10/Yta12 ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert und das katalytische Zentrum befindet sich in der Matrix (Arnold and Langer, 2002).

1.6 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung stellt die Nutzung des über die Atmungskette aufgebauten Protonengradienten für die Synthese von ATP dar. Durch die Atmungskette werden die Elektronen aus NADH und FADH₂, die ein niedrigeres elektrochemisches Potential als Sauerstoff aufweisen, entlang einer Folge von Überträgermolekülen auf den finalen Akzeptor O₂ übertragen. Dieser auch als Elektronentransportkette bezeichnete Vorgang wird über vier verschiedene Enzymkomplexe, die in die innere Mitochondrienmembran integriert sind, bewerkstelligt. Die Elektronen werden dabei mit steigendem elektrochemischem Potential von NADH auf den Komplex I (NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase) auf Ubichinon übertragen. Vom entstandenen Ubichinol werden die Reduktionsequivalente über den Komplex III (Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase, Cytochrom *bc*₁-Komplex) auf Cytochrom *c* und von da über den Komplex IV (Cytochrom *c* Oxidase) auf Sauerstoff weitergeleitet. Im

1 Einleitung

Komplex II (Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase) der Atmungskette werden die Elektronen vom Succinat auf FADH_2 , das ein höheres elektrochemisches Potential als NADH besitzt, transferiert. Dieses wird für die Reduktion von Ubichinon genutzt. Das resultierende Ubichinol wird durch Komplex III oxidiert. Beim Transfer der Elektronen wird die freiwerdende Energie aus dem elektrochemischen Potentialgefälle zum Transport von Protonen aus der Matrix in den IMR genutzt. Pro Elektronenpaar werden jeweils vier Protonen über die Komplexe I und III sowie zwei Protonen vom Komplex IV in die Matrix gepumpt. Aufgrund des geringen elektrochemischen Potentialunterschieds zwischen FADH_2 und Ubichinol kann der Komplex II nicht zum Aufbau des Membranpotentials beitragen. Der durch die Atmungskette aufgebaute Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP und freiem Phosphat genutzt, dabei gelangen die Protonen vom IMR wieder in die Matrix. Dieser gekoppelte Vorgang ist auch als chemiosmotische Hypothese von Mitchell bekannt (Mitchell, 1961).

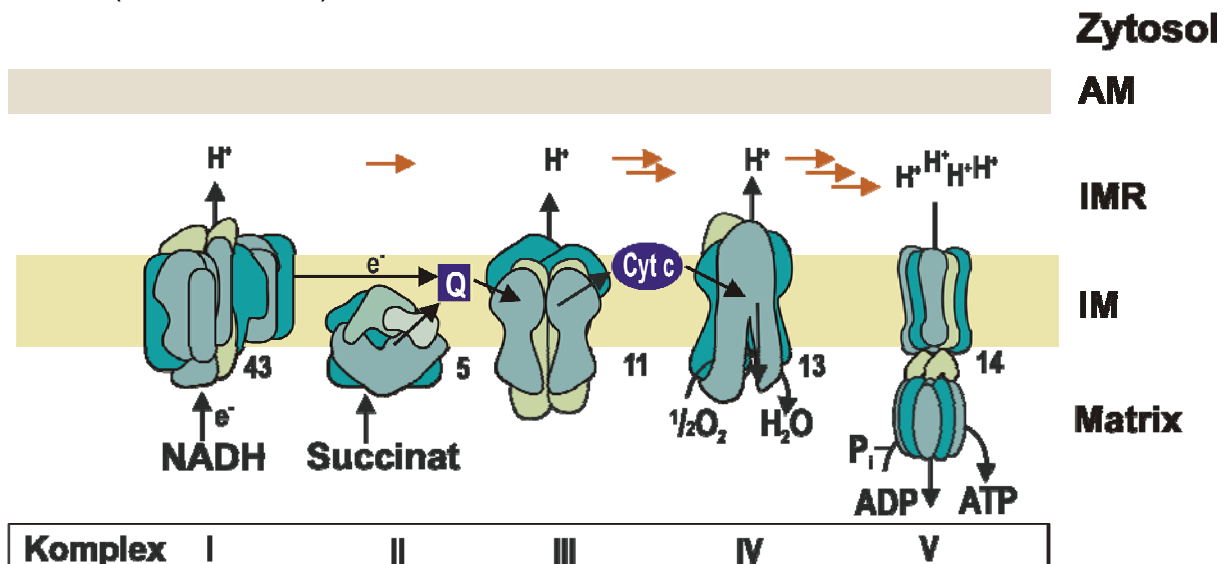


Abb.1.2: Die an der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) beteiligten Enzym-Komplexe. Die Komplexe I (nicht in Hefe), III und IV transferieren während des Elektronentransports Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMR). Der dabei aufgebaute Protonengradient kann von der F_1F_0 -ATP Synthase (Komplex V) zur Synthese von ATP genutzt werden. Die Elektronen werden zwischen den Komplexen über kleinere Moleküle (Cytochrom c, Cyt c und Ubichinon, Q) transportiert.

Bei *S. cerevisiae* erfolgt der Elektronentransport vom Substrat auf Sauerstoff anders, da diese keinen Komplex I besitzt. Das Zuführen der Reduktionsequivalente des NADH in die Atmungskette wird durch verschiedene NADH-Dehydrogenasen bewerkstelligt (de Vries and Marres, 1987). Zwei davon sind in der inneren Membran verankert und übertragen die Elektronen auf Ubichinon. Eine weitere NADH-Dehydrogenase ist in der äußeren Membran lokalisiert und benutzt direkt Cytochrom c zur Übertragung der Elektronen. Die katalytische Domäne der drei NADH-Dehydrogenasen liegt im IMR. Zusätzlich befindet sich noch die L-Laktat-Cytochrom c-

Oxidoreduktase (Cytochrom b_2) im IMR, die den Transfer von Elektronen von Laktat direkt auf Cytochrom c katalysiert (de Vries and Marres, 1987).

1.7 Die mitochondriale F_1F_0 -ATP Synthase

Die Hauptfunktion der F_1F_0 -ATP Synthase in allen Organismen ist die ATP-Produktion. In Prokaryonten ist diese in der Plasmamembran gelegen, während sie bei höheren Organismen in der mitochondrialen Innenmembran zu finden ist. Jedoch kann, je nach Wachstumsbedingungen die Funktion des Komplexes umgekehrt werden, so dass Protonen aus der Matrix unter ATP-Hydrolyse ausgeschleust werden. Somit kann unter jeglichen Wachstumsbedingungen ein für essentielle Prozesse (Proteinimport, Metaboliten-Transportprozesse) notwendiges Membranpotential bereit gestellt werden (Capaldi and Aggeler, 2002), (Devenish et al., 2000).

Die F_1F_0 -ATP Synthase besteht aus zwei funktionellen Bestandteilen, dem peripher membranassoziierten F_1 -Komplex und dem in der Membran verankerten F_0 -Komplex. Der Matrix gelegene F_1 -Komplex enthält die für die ATP-Synthese bzw. -Hydrolyse notwendigen Untereinheiten. Dagegen enthält der F_0 -Komplex (Oligomycin-sensitiv) den Protonenkanal, der für den Transport von Protonen zuständig ist (Capaldi and Aggeler, 2002), (Devenish et al., 2000). Der F_1 -Komplex besteht aus den Proteinen α , β , γ , δ und ϵ in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:3:1:1:1. Die α und β -Untereinheiten sind homolog und besitzen ATP-Bindungsstellen, jedoch sind nur die β -Untereinheiten katalytisch aktiv. Der F_1 -Komplex ist in Prokaryonten und Eukaryonten gleichermaßen aufgebaut (Stock et al., 1999), (Velours and Arselin, 2000).

Dagegen ist der F_0 -Komplex bei Prokaryonten und Eukaryonten unterschiedlich aufgebaut. In Prokaryonten besteht dieser aus den Untereinheiten a , b und c im Verhältnis 1:2:9-12 (Jones and Fillingame, 1998), wobei die Untereinheiten c einen Ring bilden, der sich synchron mit den Untereinheiten γ und ϵ des F_1 -Komplex dreht. Die integrale Untereinheit a verbindet den c -Ring mit dem Dimer der Untereinheit b , die teilweise in das Zytoplasma ragt und einen Teil der starren Verbindung zwischen den F_1 - und F_0 - Subkomplexen der ATP-Synthase bildet (Stock et al., 1999), (Velours and Arselin, 2000), (Fillingame et al., 2003).

Der mitochondriale F_0 -Komplex ist wesentlich komplizierter zusammengesetzt. Zusätzlich zu den Untereinheiten 4, 6 und 9, die den prokaryontischen Untereinheiten b , a und c entsprechen, enthält diese die neun weiteren Untereinheiten 8 (A6L), OSCP, d , e , f , g , h (F6), i/j und k (Devenish et al., 2000), (Velours and Arselin, 2000). Obwohl manche dieser Proteine keine Assoziation mit der Membran aufweisen, werden diese dennoch zu den Untereinheiten des F_0 -Komplexes gezählt (Devenish et al., 2000).

Im assemblierten Zustand sind die beiden Subkomplexe über zwei Stege miteinander verbunden. Dabei rotiert der innere Steg, während der äußere Steg starr

bleibt. Damit wird eine Rotation des gesamten Komplexes verhindert, und nur der aus der Untereinheit 9 gebildete Ring mit dem inneren Steg aus den Untereinheiten γ , δ und ϵ dreht sich. Durch die Rotation der γ -Untereinheit im α , β -Hexamer kommt es zu einer Konformationsänderung der β -Untereinheiten, wodurch die ATP-Synthese ermöglicht wird (Boyer, 1993), (Boyer, 2002). Im umgekehrten Fall wird die Rotation durch die ATP-Hydrolyse bewirkt und führt zum Transport von Protonen aus der Matrix (Stock et al., 1999). Die Protonentranslokation erfolgt durch die Rotation des in der Membran gelegenen Rings des F_0 -Komplexes relativ zur Untereinheit 6 (Velours and Arselin, 2000).

1.8 Mitochondriale Suprakomplexe der Atmungskette

Die Atmungskettenkomplexe befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran und bestehen aus zahlreichen Untereinheiten. Zur Organisation der Komplexe in der Membran zueinander wurden zwei unterschiedliche Modelle entwickelt. Das ‚liquid-state‘-Modell (auch ‚random collision-Modell‘) geht davon aus, dass alle Komplexe unabhängig voneinander in der Membran vorliegen und frei beweglich sind. Die Effizienz des Elektronentransports hängt daher von den Diffusionsvorgängen in der Innenmembran ab (Hackenbrock et al., 1986), (Chazotte and Hackenbrock, 1989), (Gupte and Hackenbrock, 1988).

Dagegen sind im ‚solid-state‘-Modell (oder Respirasom-Modell) die Enzymkomplexe zu stabilen und geordneten Suprakomplexen vereint (Schagger and Pfeiffer, 2000). Für eine solche Organisation der Atmungskettenkomplexe sprechen kinetische Untersuchungen, die mit Hilfe von Inhibitor-Titrations durchgeführt wurden (Boumans et al., 1998), sowie Untersuchungen zur Stöchiometrie der Komplexe untereinander (Hatefi, 1985), (Schagger and Pfeiffer, 2001). Zusätzlich konnten mit Größenausschlusschromatographie und nativen Gelelektrophoretischen-Methoden einzelne Superkomplexe, die aus den Komplexen III und IV (in Hefe-Mitochondrien) (Cruciat et al., 2000) oder I, III und IV (in Rinderherz-Mitochondrien und *Paracoccus denitrificans*) bestehen, isoliert werden (Schagger and Pfeiffer, 2000), (Stroh et al., 2004). Eine Interaktion zwischen den Komplexen II und III in Hefe (*S.cerevisiae*) konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden (Bruehl et al., 1996). Dadurch sollten alle drei Komplexe der Hefe physikalisch miteinander assoziiert sein (Schagger, 2002).

Eine solche Suprakomplex-Bildung hätte den Vorteil, dass eine bestimmte Teilpopulation an Ubichinon und Cytochrom *c* den Elektronentransport zwischen den Komplexen ohne lange, zufällige Diffusion ausführt und so die Effizienz der Atmungskette steigert. Zusätzlich können reaktive Zwischenprodukte, wie Semiubichinon, das mit Sauerstoff gefährliche Radikale (ROS) bilden kann, verhindert werden (Schagger, 2002), (Genova et al., 2003).

Auch für die F_1F_0 -ATP Synthase konnte eine Assemblierung zu Dimeren (Arnold et al., 1998) und Oligomeren gezeigt werden. Insbesondere die Untereinheiten *e* und *g*, sowie die erste Transmembrandomäne der Untereinheit 4 sind dafür notwendig (Brunner et al., 2002), (Soubannier et al., 2002). Die Untereinheit *k* ist spezifisch für die F_1F_0 -ATP Synthase-Dimere ist aber für die Assemblierung nicht essentiell (Arnold et al., 1998). Die Deletion der Untereinheiten *e*, *g* oder der ersten Transmembrandomäne der Untereinheit 4 führt zum Verlust der Cristae-Ausbildung (Paumard et al., 2002), (Soubannier et al., 2002) und die Morphologie der Innenmembran dieser Deletionsstämme wurde als zwiebelartig beschrieben (Paumard et al., 2002), (Giraud et al., 2002). Dagegen ist die enzymatische Aktivität der F_1F_0 -ATP Synthase in den Deletionsmutanten nicht betroffen.

1.9 Zielsetzung

Entgegen den meisten Abbildungen in Lehrbüchern bilden die Mitochondrien eine netzartige Struktur aus. Ferner unterliegt das Netzwerk einer großen Dynamik. Dies zeigt sich sowohl in der zellulären Lokalisation als auch in den steten Teilungs- und Fusionsprozessen. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Fusion und Teilung führt zu einer fragmentierten bzw. einer Fischernetz-artigen Mitochondrienstruktur. Aber auch physiologische Änderungen der Wachstumsbedingungen haben Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie. Eine adaptive Änderung der mitochondrialen Struktur scheint zur Optimierung mitochondrialer Funktionen beizutragen. So führen Wachstumsbedingungen mit gesteigerter Atmungskettenaktivität zu vermehrter Cristaebildung. Daraus ergeben sich fundamentale Fragen: Wie werden Cristaestrukturen gebildet? Und welche Proteine sind daran beteiligt? Welche Vorteile ergeben sich durch die Cristae-Bildung? Zur Aufklärung dieser weit reichenden Fragen sollte die vorliegende Arbeit beitragen.

Zwei Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden als zur Cristaebildung notwendig vorgeschlagen. Der oligomere Zustand der F_1F_0 -ATP Synthase und das Dynamin-ähnliche Protein Mgm1. Während der oligomeren Zustands der F_1F_0 -ATP Synthase primär zum Erhalt der Cristaestrukturen notwendig ist, führt der Verlust von Mgm1 zur Fragmentierung des gesamten mitochondrialen Netzwerks. Stehen die Strukturen der Innenmembran und die des Netzwerkes in direktem Zusammenhang? Welche Auswirkungen haben Veränderungen der Ultrastruktur auf das Netzwerk?

1.9.1 Cristae-Bildung durch die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase

Die Ausbildung der Cristaestrukturen hängt vom dimeren und oligomeren Zustand der F_1F_0 -ATP Synthase ab. Welche Aufgaben hat dabei die dimerspezifische Untereinheit *e* und im Speziellen wozu dienen die C-terminalen ‚coiled-coil‘-Strukturen?

1 Einleitung

Dienen diese Domänen der Assemblierung und Stabilisierung der F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomere oder vermitteln sie die Anlagerung anderer Atmungskettenkomplexe zur Bildung eines Suprakomplexes? Welche bioenergetischen Vorteile bietet die Ausbildung der Oligomere und damit der Cristaestrukturen für die Zelle?

1.9.2 Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins Mgm1 an der Cristae-Struktur

Mgm1 ist eine weitere Komponente, die möglicherweise an der Bildung des mitochondrialen Netzwerks beteiligt ist. Für die normale Morphologie werden beide Isoformen von Mgm1 benötigt. Dabei spielt die Prozessierung durch die Rhomboidprotease Pcp1 eine entscheidende Rolle. Zur genaueren Aufklärung der Prozessierung auf molekularer Ebene sowie eventuellen regulatorischen Mechanismen wurde die Topologie und Biogenese von Pcp1 ermittelt. Weitere Untersuchungen betrafen die Komplexbildung und das katalytische Zentrum der Protease.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

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

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA aus 2 ml *E.coli*-Kulturen gewonnen (Minipräparation). Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse aus den Zellen isoliert (modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979)). Die in selektivem Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) gewachsenen Zellen wurden 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) lysiert. Nach weiteren 5 min bei RT wurden 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 4,8) zur Neutralisation zugegeben, 2-5-mal invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt aggregieren die meisten Proteine und die genomische DNA mit dem schlecht löslichen Kaliumdodecylsulfat und können durch Zentrifugation für 5 min mit 13000 rpm bei 4°C sedimentiert werden. 400 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt (vgl. 2.1.2). Die getrocknete DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser mit 50 µg/ml Ribonuklease A resuspendiert. Zur Analyse der isolierten Plasmid-DNA wurden 2 µl in einem Restriktionsverdau eingesetzt (vgl. 2.1.9).

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit höherer Reinheit mit Hilfe des „Jetstar-Kit“ der Firma Genomed gewonnen (Midi- oder Maxipräparation). Dazu wurden 50 ml einer Übernacht-Kultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes in LB^{Amp} bei 5000 rpm, 5 min in einem JA20-Rotor sedimentiert. Die Zellen wurden in 4 ml der Lösung E1 (10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und anschließend durch Inkubation für 5 min bei RT mit 4 ml der Lösung E2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) lysiert. Schließlich wurden die Proteine und die chromosomale DNA durch Zugabe von 4 ml der Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat pH 5,5) gefällt. Die Suspension wurde 10 min mit 12000 rpm in einem JA-20 Rotor zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 0,15 % Triton X-100, 100 mM Natriumacetat pH 5,0) äquilibrierte Anionenaustauschersäule überführt. Diese wurde 2-mal mit je 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) von der Säule eluiert. Zum Fällen der Plasmid-DNA wurden dem Eluat 3,5 ml Isopropanol zugegeben und 30 min mit 10000 rpm bei 4°C im JA-20 zentrifugiert. Die gefällte DNA

2 Material und Methoden

wurde einmal mit 5 ml 70 %igen Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser gelöst.

2.1.2 Ethanolfällung und Phenolextraktion

Zum Aufkonzentrieren von wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit Natriumacetat auf eine Endkonzentration von 300 mM versetzt. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol zugesetzt und die Proben bei -20°C für 30 min inkubiert. Die dabei gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C mit 20000 xg für 30 min sedimentiert. Das Präzipitat wurde mit kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, an der Luft bei RT getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

Die Phenolextraktion dient dem vollständigen Entfernen von Proteinen; dazu wurden die DNA-Proben mit zwei Volumina Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 v/v/v) ausgeschüttelt (Sambrook, 1989). Die DNA verbleibt dabei in der wässrigen Lösung, die Proteine dagegen werden denaturiert und befinden sich je nach Hydrophobizität in der phenolischen Phase oder der Grenzschicht zwischen den Phasen. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurden die Proben 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA durch Ethanolfällung aufkonzentriert.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Meist wurden Plasmid-DNA-Präparationen (vgl. 2.1.1) zur Konzentrationsbestimmung 1:100 verdünnt. Eine Extinktion bei 260 nm von eins entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zusätzlich wurde die Extinktion der Probe bei 280 nm gemessen, um den Grad an Proteinverunreinigungen abschätzen zu können. Gegebenenfalls wurden die DNA-Proben einer zusätzlichen Reinigung unterzogen (Phenolextraktion, vgl. 2.1.2).

2.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung genomischer DNA (Rose, 1990) wurde eine 10 ml Kultur des entsprechenden Hefestammes über Nacht in YPD-Medium bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 3000 rpm 5 min bei RT in einer Sigma 3K12-Zentrifuge mit dem Rotor 11333 sedimentiert. Mit 10 ml Wasser gewaschen und in 200 µl Puffer (2 % (w/v) Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Weitere 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1(v/v/v)) sowie ca. 100-300 mg Glaskugeln (mit 0,45 mm Durchmesser) wurden

zugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütiges Vortexen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) wurden die Proben 5 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 200 µl sterilem Wasser gelöst (vgl. 2.1.2). Die in den Proben enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 75 µg/ml RNase A und Inkubation bei 37°C, 5 min zerstört. Nach erneuter Ethanolfällung wurde die DNA in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

2.1.5 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) amplifiziert. Hierbei werden bestimmte Schritte des Reaktionszyklus wiederholt durchlaufen. Ein Reaktionszyklus besteht aus der Trennung der Matrizenstränge, Anlagerung von kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primer) an die einzelsträngige Matrizen-DNA und der darauf folgende Verlängerung dieser Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Somit können spezifische Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert werden (Saiki et al., 1988), (Saiki et al., 1985). Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer, 3 U der thermostabilen DNA-Polymerase, 1,5 mM MgSO₄, 100 pmol der beiden Oligonukleotide, 200 µM der vier Desoxynukleosid-5'-triphosphate und ca. 100 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA als Matrize. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurden die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (GL BioTech), die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) sowie das *Expand*-System (Roche) verwendet. Die *Taq*-Polymerase ist besonders prozessiv, jedoch auch fehleranfällig, da diese im Gegensatz zur *Pfu*-Polymerase keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist. Diese „proof-reading“-Aktivität verringert erheblich die Fehlerrate, jedoch bedingt diese die geringere Prozessivität der *Pfu*-Polymerase. Zur Verbesserung der Prozessivität mit verminderter Fehlerrate können die beiden Polymerasen zusammen eingesetzt werden. Das *Expand*-System ist eine optimierte Mischung beider Polymerasen.

Eine typische PCR wurde mit einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, bei dem die Matrizen-DNA vollständig in Einzelstränge aufgetrennt wird, begonnen. Diesem folgt ein 25-30 Zyklen umfassender Amplifizierungsschritt. Der einzelne Zyklus besteht aus drei Schritten. Der erste Schritt 30 s 94 °C, bei dem die Matrix-Stränge denaturiert werden, dem Anlagern der spezifischen Primer (40-60 °C, 1 min) im zweiten Schritt und der DNA-Synthese bei 72 °C für 1-3 min entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bzw. der Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerasen (dem dritten Schritt). Nach Ablauf des Amplifizierungsschrittes folgte eine

2 Material und Methoden

10-minütige Inkubation bei 72 °C, um unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu komplettieren. Zum Abschätzen der Anlagerungstemperatur der Primer an die Matrix wurde die G/C = 4 °C; T/A = 2 °C -Regel verwendet. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.1.6) und entsprechend aus präparativen Agarosegelen oder über Mikrozentrifugationssäulchen isoliert (vgl. 2.1.7 und 2.1.8).

2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden in 5-fach Auftragspuffer (0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerol pH 8,0) aufgenommen und in horizontalen Agarosegelen (0,8-3 % (w/v)) in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,4) elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Zur Detektion der DNA wurde die Agaroselösung vor dem Erkalten mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 10-15 V/cm durchgeführt und anschließend die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Anhand einer Standard DNA-Lösung können die Größen der Fragmente und deren Konzentration abgeschätzt werden.

2.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden Gelstücke, die die entsprechenden Banden enthielten, mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion wurde mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Anleitung durchgeführt. Entsprechend der Masse des ausgeschnittenen Gelstücks wurde die Agarose mit dem dreifachen Volumen (300 µl pro 100 µg) QG-Puffer versetzt. Anschließend wurde die Agarose 10 min bei 50°C aufgelöst und die Lösung auf ein Mikrozentrifugationssäulchen geladen und 1 min bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulchen in zwei Schritten mit insgesamt 900 µl PE-Puffer gewaschen. Die Waschlösungen wurden ebenfalls verworfen, das Säulchen zur vollkommenen Trocknung nochmals 2 min zentrifugiert und die DNA mit 50 µl sterilem Wasser von den Säulchen in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert.

2.1.8 Isolierung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen

Zum Isolieren von PCR-Produkten wurde der Qiaquick PCR Purification Kit verwendet. Der PCR-Ansatz wurde dazu mit dem 5-fachen Volumen PB-Puffer versetzt und auf ein Mikrozentrifugationssäulchen aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei

14000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Durchfluss verworfen und das Säulchen mit insgesamt 900 µl PE-Puffer in zwei Schritten gewaschen. Die Waschlösung wurde verworfen und das Säulchen nochmals 2 min zentrifugiert, um die Waschlösung vollständig zu entfernen. Schließlich wurde die gebundene DNA mit 50 µl sterilem Wasser von der Säule eluiert.

2.1.9 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller (New England Biolabs, NEB) mitgelieferten Puffer-Systemen. Es wurden 1-2 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden zur reinen Analyse für 1 h, bei präparativen Ansätzen 2-4 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Bei präparativen Ansätzen wurde teilweise mit der Dephosphorylierung fortgefahren oder die DNA über ein Agarosegel aufgereinigt (vgl. 2.1.6 und 2.1.7).

2.1.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Vektoren wurden in der Regel nach dem Restriktionsverdau (vgl. 2.1.9) mit alkalischer Phosphatase von Krabben (Roche) behandelt, um die endständigen Phosphatgruppen zu entfernen. Damit wird eine Religation des Vektors vermieden. Die Restriktionsansätze wurden dazu nach dem Restriktionsverdau mit einem Zehntel ihres Volumens an 10-fach konzentriertem Puffer (50 mM MgCl₂, 0,5 M Tris/HCl pH 8,5) sowie 1 U alkalischer Phosphatase pro 50 µl Ansatz versetzt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Phosphatase durch 15-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Schließlich wurden die Vektoren über ein präparatives Agarosegel (vgl. 2.1.6 und 2.1.7) aufgereinigt.

2.1.11 Ligation von DNA

Für eine Ligation wurde die Konzentration des Vektors und des zu inserierenden DNA-Fragmentes über ein Agarosegel abgeschätzt. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde ungefähr in dreifachem molaren Überschuss an zu inserierendem DNA-Fragment im Ligationsansatz eingesetzt. Im Ligationsansatz wurde der vom Hersteller der T4-DNA Ligase (New England Biolabs, NEB) mitgelieferte 5-fach Puffer verwendet (5 mM ATP, 50 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM MgCl₂, 25 µg/ml BSA, 250 mM Tris/HCl pH 7,6). In einem 10 µl Ansatz wurden 0,5 U T4-DNA Ligase verwendet. Die Ansätze wurden mindestens 4 h bei 16 °C, normalerweise über Nacht,

2 Material und Methoden

inkubiert. 1 µl des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von *E.coli* verwendet (vgl. 2.1.13).

2.1.12 Änderungen in der Aminosäuresequenz mit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

Zum Austausch bestimmter Aminosäuren eines Proteins wurde das Gen auf einem Plasmid mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen) gezielt verändert. Dazu wurden spezifische Primer entwickelt, die sich an die zu mutierende DNA-Sequenz partiell homolog anlagern können. Mit Hilfe der PCR-Technik (vgl. 2.1.5) wurde das gesamte Plasmid mit der durch die Primer eingeführten Punktmutationen amplifiziert. Nach dem Amplifizierungsschritt wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von 10 U *Dpn1* und Inkubation für eine Stunde bei 37 °C aufgrund der DNA-Methylierungen spezifisch gespalten. Anschließend wurde das Produkt der PCR direkt in *E.coli* transformiert; dort erfolgte die Ligation des Plasmidamplikates durch endogene Ligasen. Positive Klone wurden auf die jeweilige Mutation über Restriktionsverdau sowie durch Sequenzieren überprüft.

2.1.13 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E.coli*

Eine 50 ml Übernachtskultur von *E.coli* DH5α oder XL1-blue wurden verwendet, um 2 l LB-Medium auf eine OD₅₇₈ von ca. 0,05 anzuimpfen. Anschließend wurde diese Kultur bei 37°C inkubiert, bis eine OD₅₇₈ von 0,5 erreicht worden war. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und dann die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation mit 5000 rpm bei 2°C im JA-10 Rotor sedimentiert. Die Zellen wurden mit 1000 ml, 500 ml und schließlich mit 100 ml vorgekühlter 10 %iger Glycerin-Lösung (v/v) gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Überstand vollständig entfernt und die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 50 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.14 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

Die *E.coli*-Zellen wurden durch Elektroporation transformiert, dazu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (vgl. 2.1.13) auf Eis aufgetaut, mit 1 µl eines Ligationsansatzes oder einer 1:100 Verdünnung einer Midi-Plasmidpräparation (vgl. 2.1.1) versetzt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporationsgerät mit einem Spannungspuls transformiert (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF; Gene-Pulser, Bio-Rad) (Dower et al., 1988), (Miller et al., 1988). Anschließend wurde der Ansatz sofort in 1 ml LB oder SOC (0,5 % (w/v) Hefeextrakt,

0,2 % (w/v) Trypton, 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 mM NaCl) aufgenommen und für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die für die Selektion nötige Resistenz ausbilden zu können. Schließlich wurden die Zellen durch 1 min Zentrifugation sedimentiert, auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.15 Transformation von *S.cerevisiae* mit DNA

Für die Transformation wurde der entsprechende Stamm in YPD oder einem anderen geeigneten Medium über Nacht bei 30 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurden mit der Vorkultur 50 ml Medium auf ca. 0,1 OD₅₇₈ angeimpft und weiter bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, bis diese eine OD₅₇₈ von 0,3-0,5 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min gewonnen (Sigma 3K12, Rotor 11133), der Überstand verworfen, mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 s bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Für jede Transformation wurden 50 µl dieser Suspension in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation bei RT, 13000 rpm, 15 s in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Hefezellen wurden nun mit 240 µl PEG 3350 (50 % (w/v)) überschichtet, bevor sie mit 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) sowie 5-10 µl der zu transformierenden DNA und einer entsprechenden Menge (70-75µl) sterilem Wassers versetzt wurden. Die Ansätze wurden anschließend kräftig durch Vortexen durchmischt, so dass die Zellen resuspendiert wurden. Dann wurden die Zellen 30 min bei 30 °C inkubiert, bevor sie bei 42 °C für 20 min einem Hitzeschock unterzogen wurden. Nach Beendigung der Inkubationsschritte wurden die Zellen bei 13000 rpm, RT, 15 s sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen, um sie schließlich auf Agarplatten mit selektivem Medium ausbringen zu können (Gietz et al., 1995). Die Selektion erfolgte über die entsprechenden Auxotrophiemarker oder Kanamycin-Resistenz (Geneticin, G418).

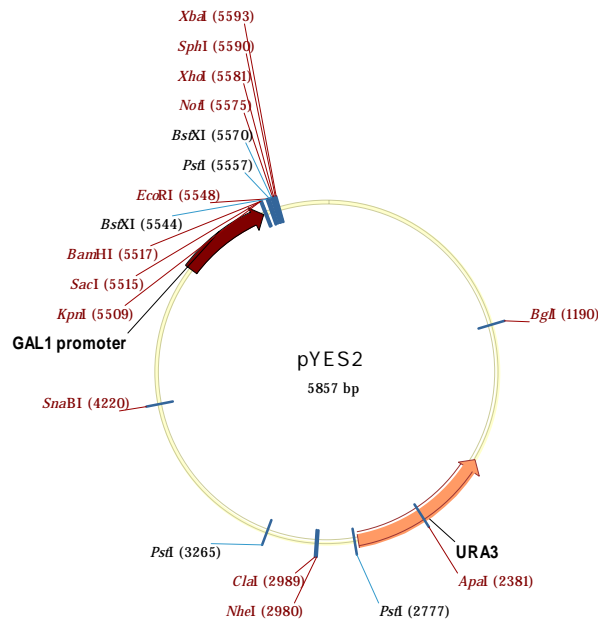
2.1.16 DNA-Sequenzierung

Das Sequenzieren wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt; es wurden fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide verwendet.

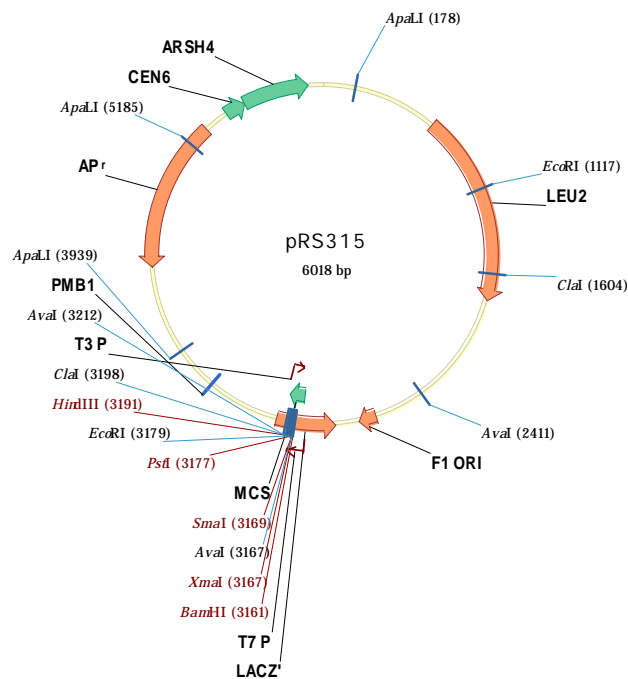
2 Material und Methoden

2.1.17 Verwendete Vektoren

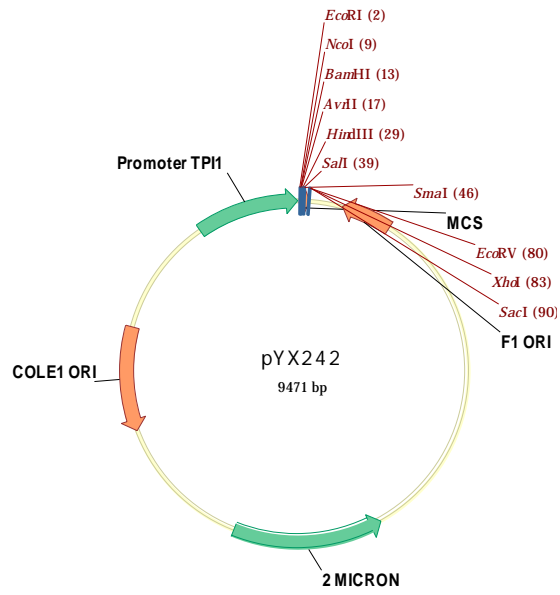
2.1.17.1 pYES2 (Invitrogen)



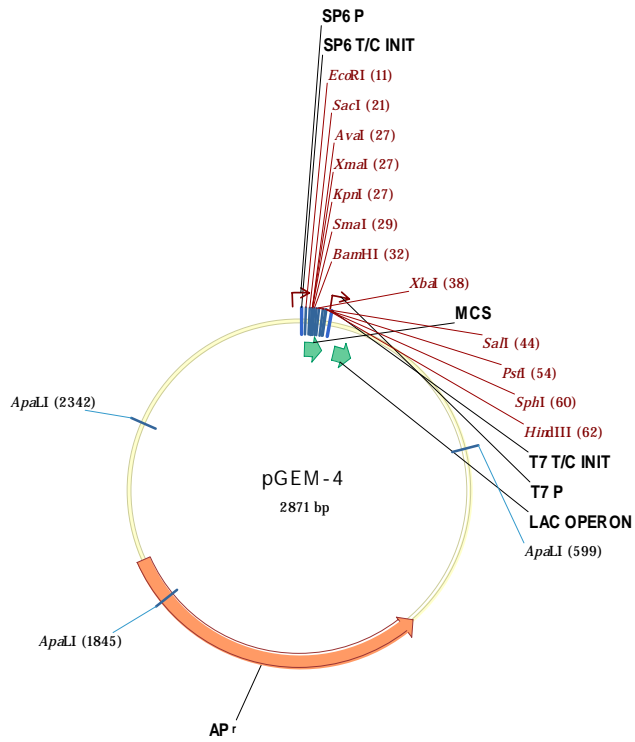
2.1.17.2 pRS315 und pRS416 (Sikorski und Hieter, 1989)



2.1.17.3 pYX223, pYX242



2.1.17.4 pGem4



2.1.18 Klonierungsstrategien

2.1.18.1 pYX242-Su e_{wt} , Su e_{1-65} , Su e_{1-46} , Su e_{18A}

Die Su e_{wt} , Su e_{1-65} , Su e_{1-46} -Konstrukte wurden über PCR mit den Primern Tim11_up, Tim11_down, Tim11_65 und Tim11_46 und der genomischen DNA aus *S.cerevisiae* W303 α als Matrize amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde über *EcoR1/Sma1*-Schnittstellen in den Vektor pYX242 kloniert. Die Plasmide wurden zur Komplementation in dem Deletionsstamm $\Delta su e$ transformiert. Die Expression der Konstrukte mit dem TPI-Promotor und einem 2 μ Replikon entspricht der endogenen Expression auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Zur Synthese des Su e_{18A} -Konstruktes wurde die genomische DNA aus dem *S.cerevisiae* Stamm D273-10B/A/H/U Su e_{18A} von Jean Velours (Université Victor Segalen, Bordeaux, Frankreich) als Matrix für die PCR mit den Primern Tim11up und Tim11down verwendet.

Primer	Sequenz
Tim11_up	5'-CCCCGAATTCGCCATGTCGACAGTTAATGTTTTGA-3'
Tim11_down	5'-CCCCCCC GGGTTATGTTGAAGCTTCCTTCAG-3'
Tim11_65	5'-CCCCCCC GGGTTACACATCTTTAGGAGTTACTAC-3'
Tim11_46	5'-CCCCCCC GGGTTATACCAGCTTCAATTTCTCCTC-3'

2.1.18.2 pYES2 Pcp1

Zur Expression von Pcp1 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors wurde PCP1 mit den Primern Ye-*Xho1*/Exp.PCP1-3Nterm und der genomischen DNA aus *S.cerevisiae* W303 α als Matrix über PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über *BamH 1/Xho 1*-Schnittstellen in den pYES2 Vektor kloniert. Das pYES2 Pcp1-Konstrukt wurde auch zur Herstellung der Punktmutationen N202A, S256A und H313A mit dem QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet.

Primer	Sequenz
Ye- <i>Xho1</i>	5'-CCCCCTCGAGTTAAAACCCACCTACCAGCAGC-3'
Exp.PCP1-3Nterm	5'-CCCCGGATCCTTAAAACCCACCTACCAGCAG-3'

2.1.18.3 pRS315 Pcp1

Das pRS315-Pcp1 Konstrukt wurde über PCR mit genomischer DNA von *S.cerevisiae* W303 α als Matrize und den Primern RS-Sac1 und RS-HindIII amplifiziert und mit den Restriktions-Schnittstellen Sac1 und HindIII in den Vektor pRS315 ligiert. Mit diesem Vektor kann Pcp1 unter endogenem Promotor exprimiert werden. Das Produkt wurde zur Herstellung der Punktmutationen S256A und H313A verwendet.

Primer	Sequenz
RS-Sac1	5'-CCCCGAGCTCATCCTCGCAGATGAAACTTACG-3'
RS-HindIII	5'-CCCAAGCTTTTAAAACCACCTACCAGCAGC-3'

2.1.18.4 Punktmutationen in pYES2-Pcp1 und pRS315 Pcp1

Die Punktmutationen N202A, S256A und H313A von Pcp1 wurden mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit in die Plasmide pRS315 Pcp1 und pYes2 Pcp1 eingeführt (vgl. 2.1.12). Die dafür nötigen Primersequenzen wurden entsprechend der Anleitung entworfen. Pro Mutation wurde ein Primerpaar entworfen, die beide die entsprechende Mutation enthielten. Die Anzahl der Basen jedes Primers variierte zwischen 35 und 42. Die Annealing Temperatur sollte 78 °C betragen und wurde anhand der Formel $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Z$ bestimmt. Dabei repräsentiert N die Anzahl der Basen des Primers, GC den Gehalt an Guanin/Cytosin-Basen im Primer und Z die Anzahl der sich nicht anlagernden Basen. Prozentzahlen wurden auf ganze Zahlen gerundet. Die Mutation befand sich mittig im Primerpaar. Um mutierte Klone von Klonen mit dem Template-Plasmid zu unterscheiden, wurde mit den Primern eine stille Mutation eingeführt, die entweder eine neue Restriktionsstelle in das Plasmid einführt oder eine Vorhandene entfernt. Für die Mutation N202A wurden die Primer N202A-1 und N202A-2, für S256A die Primer S256A-1 und S256A-2 und für H313A die Primer H313A-1 und H313A-2 verwendet.

Primer	Sequenz
N202A-1	5'-GGCACTTAGGTATGGCTATGCTGGCGTTGTGGTCCTTTGG-3'
N202A-2	5'-CCAAAGGACCACAACGCCAGCATAGCCATACCTAAGTGCC-3'
S256A-1	5'-GGACCTAGCTTGGGTGCTGCAGGAGCGCTATTTGG-3'
S256A-2	5'-CCAAATAGCGCTCCTGCAGCACCCAAGCTAGGTCC-3'
H313A-1	5'-GGTCATTTGATTACGCCGCGGCTTTAGGTGGCTCTATGATGG-3'
H313A-2	5'-CCATCATAGAGCCACCTAAAGCCGCGGCGTAATCAAATGACC-3'

2.1.18.5 pYX242 Pcp1 TMD2-TCS-TMD3 und pYX242 Pcp1 C-term TCS

Die Konstrukte für die Topologie-Bestimmung Pcp1 TMD2-TCS-TMD3 und Pcp1 C-term TCS wurden in den Vektor pYX242 kloniert. PCP1 C-term wurde mit den Primern Pcp1-C-Mfe 1/Pcp1-C-TCS-L und der genomischen DNA aus *S.cerevisiae* W303 α als Matrix über PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über *EcoR* 1/*Xho* 1-

2 Material und Methoden

Schnittstellen in den pYX242 Vektor kloniert. Das Pcp1 TMD2-TCS-TMD3 Konstrukt wurde durch Ligation zweier Fragmente in den pYX242-Vektor kloniert. Als Template wurde die genomische DNA aus *S.cerevisiae* verwendet. Ein Fragment wurde über PCR mit Hilfe der Primer Pcp1-N-*Hind* III/TCS2-3 A synthetisiert, während das zweite Teilstück mit den Primern Pcp1-C-Mfe 1/TCS2-3 B amplifiziert wurde.

Primer	Sequenz
Pcp1-C-Mfe 1	5'-CCCCCAATTGGCCATGTCAGGTGTAAGCTCTG-3'
Pcp1-N- <i>Hind</i> III	5'-CCCCAAGCTTTTAAAACACCTACCAGCAG-3'
TCS2-3 B	5'-CCCCGGATCCGAAAATCTATATTTTCAAGGACTGCAA AAGGATTACGTAAC-3'
TCS2-3 A	5'-CCCCGGATCCCA TGT ACT TCT GTA GAA ACC-3'
Pcp1-C-TCS-L	5'-CCCCAAGCTTTTAAAACACCTACCAGCAGCCTGAAG GCGACGCTGCCTTTGTTTCTCTCCTTGAAAATATAGATTT TCACTAGCACCACCTAGCACCTACAGCTTTACTTATATACC AAG-3'

2.1.19 Weitere Verwendete Vektoren/Konstrukte

Vektorname	Gen	Referenz
pRS416-Gal1-PreF _O -ATPase (Su9)-TEV Protease	Su9-Präseq.-TEV	(Kondo-Okamoto et al., 2003)
pRS416-Gal1-CYB2(1-220)- TEV Protease	Cytb2-Präseq.-TEV	(Kondo-Okamoto et al., 2003)
pYX142-CYB2(1-220)-3HA- TCS-GFP	Cytb2-Präseq.-3HA-TCS- GFP	(Kondo-Okamoto et al., 2003)
pYX142-Su9-3HA-TCS-GFP	Su9-Präseq.-3HA-TCS-GFP	(Kondo-Okamoto et al., 2003)

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 α	MAT α , ade2-1, his3-11, 15 leu2, 112 trp1, ura23-53, can1-100	(Rothstein and Sherman, 1980)
W303a	MATa, ade2-1, his3-11, 15 leu2, 112 trp1, ura23-53, can1-100	(Rothstein and Sherman, 1980)
D273-10 B	Wildtyp	ATCC, Nr. 24657
Su e _{18A}	D273-10 B/A/H/U	Jean Velours
Δ su e	W303a, su e::HIS3	(Arnold et al., 1997)
Δ su g	W303a, su g::HIS3	(Arnold et al., 1998)
Δ su k	W303a, su k::HIS3	(Arnold et al., 1998)
Δ pcp1/ Δ pcp1	MATa/MAT α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; pcp1::kanMX4/pcp1::kanMX4	Research Genetics
Δ mgm1/ Δ mgm1	MATa/MAT α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; mgm1::kanMX4/mgm1::kanMX4	Research Genetics
Δ pcp1/ Δ mgm1	MATa, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, MET15, ura3 Δ 0, mgm1::kanMX4, pcp1::HIS3	diese Arbeit
SSC1	MAT α , his4-713, lys2, ura3-52, Δ trp1, leu2-3, 112,	(Gambill et al., 1993)
ssc1-2	MAT α , his4-713, lys2, ura3-52, Δ trp1, leu2-3, 112, ssc1-2(LEU2)	(Gambill et al., 1993)
ssc1-3	MAT α , his4-713, lys2, ura3-52, Δ trp1, leu2-3, 112, ssc1-3(LEU2)	(Gambill et al., 1993)
Δ mip/ Δ mip	MATa/MAT α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; mip::kanMX4/mip::kanMX4	Research Genetics

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefezellen erfolgte in YP- bzw. Laktat-Medium nach Standardprotokollen (Guthrie and Fink, 1991). Bei der Selektionierung auf einen Auxothrophiemarker wurde, entsprechend mit Markersubstanzen, sublimiertes Selektiv-Glukose (SD)-Medium verwendet. Langzeit-Stammkulturen wurden in 15 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert. Von diesen wurden geringe Mengen entnommen und auf Agarplatten überführt. Mit den auf der Agarplatte gewachsenen Kulturen wurden Flüssigkulturen angeimpft. Agarplatten wurden 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend als mittelfristige Dauerkultur bei 4 °C verwahrt. Die Flüssigkulturen wurden unter Schütteln (140 rpm) bei 30 °C wachsen gelassen. Als Standardmedien

2 Material und Methoden

dienten sowohl fermentierbare (YPD und YPGal) als auch nicht fermentierbare (YPG und Laktat) Kohlenstoffquellen. Bei Selektiven-Flüssigkulturen wurden entsprechende SD- sowie SL-Medien verwendet.

Die Glycerolstammkulturen (Langzeit-Kulturen) wurden hergestellt, indem 1 ml einer stark bewachsenen Flüssigkultur (mind. OD_{578} von 1) mit 1 ml 30 % (v/v) Glycerol gemischt wurden. Alternativ wurde etwas von der Kultur der Agarplatte in sterilem 15 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Glycerolstammkulturen wurden schließlich bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.2.3 Analyse des Verlustes von mtDNA in einer Hefekultur

Für die Analyse wurde der Hefestamm in einer Flüssigkultur in selektivem Laktat-Medium über drei Tage mehrfach passagiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kultur eine OD_{578} von 1,5 nicht überschritt. Von der exponentiell wachsenden Kultur wurden 200-300 Zellen auf selektive Glycerin-Platten, die 0,1 % (w/v) Glucose enthielten, verteilt. Zellen, die ihre mitochondriale DNA teilweise (ρ^-) oder ganz (ρ^0) verloren haben, konnten nur solange auf der Platte wachsen, bis die Glucose aufgebraucht war. Dagegen konnten die Zellen, die ihre mtDNA vollständig behalten hatten, weiter wachsen. Nach drei Tagen Inkubation bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten die kleineren ρ^-/ρ^0 -Klone von den großen Klonen auf der Platte unterschieden werden. Das Ausmaß des Verlustes an mtDNA wurde ausgedrückt durch die Anzahl der kleinen Klone in Relation zur Anzahl aller Klone.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit einer CCD-Kamera (Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA) und der dazugehörigen Software (MetaView 3.6a; Universal Image Corporation, USA) gemacht. Es wurde ein Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan Neofluar, 100x, numerische Apertur 1,3) verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde der Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: $>515\text{ nm}$) (Heim und Tsien, 1996). Für Färbungen mit Rhodamin B-Hexylester (vgl. 2.3.2) wurde der Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: $>590\text{ nm}$) (Matz et al., 1999). Für die DNA-Färbung mit DAPI wurde der Filtersatz No. 01 benutzt (Anregung: 353 bis 377 nm, Emission: $>397\text{ nm}$) (vgl. 2.3.3). Die Zellen wurden mit 0,5 % (w/v) niedrig schmelzender Agarose auf den Objektträgern fixiert.

2.3.2 Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit Rhodamin B-Hexylester

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in flüssigem Medium angezogen. Bei exponentiellem Wachstum wurden von den Kulturen Proben genommen. Die Zellen wurden durch 1 min Zentrifugieren bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und in 1 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Wasser und 10 µl einer 10 µM Rhodamin B-Hexylester-Lösung versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 30 °C unter Schütteln wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.3.3 Färbung von DNA mit DAPI

Um chromosomale und mitochondriale DNA (mtDNA) der Hefe im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde diese mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (McConnell and Yaffe, 1992), (Williamson and Fennell, 1979). Dazu wurden Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur durch Zentrifugation bei 13000 rpm 1 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und in 1 ml PBS resuspendiert. 1 µl einer 1 mg/ml DAPI-Stammlösung wurde in die Zellsuspension gegeben und 1 Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert und einmal mit PBS gewaschen, bevor diese unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden.

2.3.4 Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Die Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe erfolgte durch alkalische Lyse. Dazu wurden Zellen, die einer OD₅₇₈ von 1-2 entsprachen, sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 50 µl Lysepuffer (1,85 M NaOH, 7,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 20 mM PMSF) versetzt, durch Vortexen gut gemischt und 10 min auf Eis inkubiert (modifiziert nach (Yaffe and Schatz, 1984)). Durch Zugabe von 220 µl 72 % (w/v) TCA wurden die Proteine gefällt. Die Proben wurden erneut gevortext und 15 min auf Eis inkubiert, bevor diese 15 min bei 15000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert wurden. Das Präzipitat wurde schließlich mit 1 ml Aceton (-20 °C) gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die Extrakte wurden zur Analyse über SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) in SDS-Probenpuffer gelöst.

2.3.5 Subfraktionierung von Hefezellen

Die Subfraktionierung erfolgte im Wesentlichen wie von Caplan und Douglas beschrieben (Caplan and Douglas, 1991). Für die Subfraktionierung wurden Wildtyp-

2 Material und Methoden

Hefezellen (W303 α), die in Laktat-Medium gewachsen waren, verwendet. Die Anzucht, Isolation und Sphaeroblastierung erfolgte wie zur Isolation von Mitochondrien aus *S.cerevisiae* beschrieben (vgl. 2.3.6).

Die Sphaeroblasten wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm 5 min bei 4 °C sedimentiert, in Lysepuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM DTT, 3 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4) aufgenommen und die Sphaeroblasten mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis aufgebrochen. Vor dem Abtrennen von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellkernen und Zellhüllen wurde eine Probe (Gesamtzellprotein) genommen und das Lysat bei 10000 xg 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde auf einen 30 % (v/v) Percoll-Gradienten in Lysepuffer aufgetragen und 50 min bei 2 °C mit 76000 xg zentrifugiert. Die obere der beiden im Gradienten entstandenen Banden wurde abgenommen und durch Zentrifugation für eine Stunde mit 150000 xg bei 4 °C aufkonzentriert. Das Percoll wird dabei sedimentiert und die mikrosomale Zellfraktion befindet sich oberhalb des Percollsediments. Die zweite Hälfte des Sphaeroblasten-Lysats wurde zur Isolation der Mitochondrien bei 17500 xg für 12 min und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment (mitochondriale Fraktion) wurde in Lysepuffer resuspendiert und der Überstand bei 15000 xg eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand enthielt die löslichen zytosolischen Proteine.

2.3.6 Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Dazu wurden von einer Agarplatte 50 ml Laktat-Medium angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Vorkultur wurde in regelmäßigen Abständen verdünnt, um ein Überwachsen der Kultur ($OD_{578} < 1,5$) zu verhindern; dabei wurde das Gesamtvolumen stetig erhöht. Am Abend vor der Mitochondrienisolation wurde eine Hauptkultur von 10 l angesetzt. Die Hauptkultur wurde mit einer OD_{578} von 0,02 angeimpft, so dass diese am nächsten Tag eine OD_{578} zwischen 1 und 1,5 erreichte.

Für die Subfraktionierung wurden die Zellen der Hauptkultur durch 10 min Zentrifugieren bei 4000 rpm in einem JLA-8.1000-Rotor gesammelt, mit 300 ml Wasser gewaschen und in einem JA10 Zentrifugenbecher 5 min bei 5000 rpm sedimentiert. Das Nassgewicht der Zellen wurde ermittelt und diese entsprechend in DTT-Puffer (0,5 g Nassgewicht/ml; 10 mM DTT, 100 mM Tris/SO₄ pH 9,4) aufgenommen. Die Suspension wurde 15 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min wieder sedimentiert. Die Zellen wurden in 100 ml Sorbitol-Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM KPi pH 7,4) gewaschen und mit einer Endkonzentration von 0,15 g Nassgewicht/ml in Sorbitol-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde entsprechend dem Nassgewicht mit Zymolyase (3 mg/g) versetzt und 30-60 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zymolyase zersetzt dabei die

Zellwand der Hefezellen, und es bilden sich Sphaeroblasten. Dabei verhindert das Sorbitol im Puffer das osmotische Platzen der Zellen. Zur Kontrolle der Sphaeroblastenbildung wurden jeweils 20 µl der Suspension in 1 ml Wasser und Sorbitol-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Differenz der Optischen Dichte bei 578 nm ermittelt; eine Differenz von 90 % zeigte eine gute Sphaeroblastierung an.

Nach der Sphaeroblastierung wurden die weiteren Schritte der Mitochondrienisolation bei 4 °C durchgeführt. Die Sphaeroblastensuspension wurde zentrifugiert (5 min, 5000 rpm, JA10-Rotor) und die Sphaeroblasten in Lysepuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4) auf eine Endkonzentration von 0,15 g/ml Nassgewicht resuspendiert. Der Aufschluss der Sphaeroblasten erfolgte durch homogenisieren mit einem Dounce-Homogenisator (20-30 mal). Anschließend wurden die Mitochondrien durch fraktionierte Zentrifugation aus dem Lysat gewonnen. Nicht aufgeschlossene Zellen, Zellkerne und große Zelltrümmer (Zellhüllen) wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 4000 rpm im JA20-Rotor für 5 min sedimentiert. Die Sedimente wurden teilweise für einen weiteren Homogenisierungsschritt verwendet oder verworfen. Der Überstand wurde zur Isolation der Mitochondrien bei 12000 rpm 12 min im JA20-Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde zur Erhöhung der Reinheit in 30 ml HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4) vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zuerst bei 4000 rpm 5 min im JA20-Rotor, anschließend noch mal bei 12000 rpm für 12 min. Die Mitochondrien wurden in 0,2-0,5 ml HS-Puffer vorsichtig aufgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt. Die Mitochondrien-Suspension wurde auf 10 mg/ml mit HS-Puffer eingestellt, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.7 Sublokalisierung mitochondrialer Proteine

Zur genauen Determination der submitochondrialen Lokalisation endogener oder *in vitro* importierter mitochondrialer Proteine wurde die mitochondriale Außenmembran selektiv durch osmotisches Schwellen disruptiert. Dazu wurde die Mitochondriensuspension auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml in HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4) eingestellt und anschließend mit H-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,4) auf das 10-fache verdünnt. Aufgrund des osmotischen Drucks dringt Wasser in die Matrix ein und die Innenmembran dehnt sich aus, bis die äußere Membran der Mitochondrien platzt. Durch die Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K zur Suspension und Inkubation für 25 min auf Eis wurden die aufgrund der Zerstörung der Außenmembran zugänglichen Proteine des Intermembranraums proteolytisch verdaut. Die Protease-Behandlung wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF terminiert und die Suspension nochmals auf Eis 5 min inkubiert. Die Mitoplasten wurden

2 Material und Methoden

sedimentiert (10 min, 10000 rpm, 4 °C in der Eppendorf-Tischzentrifuge), einmal mit 1 mM PMSF in HS-Puffer gewaschen ohne zu resuspendieren und in HS-Puffer aufgenommen. Um jeglichen weiteren proteolytischen Verdau von Proteinen zu vermeiden, wurden die Proteine der Mitoplasten einer Fällung mit TCA unterzogen (vgl. 2.4.3). Das Sediment wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) und Transfer auf Nitrozellulose (vgl. 2.4.7) analysiert. Die selektive Disruption der äußeren Membran wurde durch Western-Blot-Analyse, mit Antikörpern gegen spezifische Fragmente integraler Innenmembran-Proteine (Bsp.: Aac-2) sowie gegen Matrix Proteine (Bsp.: Mge1), überprüft (vgl. 2.5.4).

2.3.8 Alkalische Extraktion und Salzextraktion von mitochondrialen Membranen

Mittels alkalischer Extraktion sowie Salzextraktion lassen sich lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen unterscheiden (Fujiki et al., 1982). Dazu wurden Mitoplasten erzeugt (vgl. 2.3.7), die anschließend mit dem gleichen Volumen 0,2 M Na₂CO₃ (alkalische Extraktion, pH 11,5) oder 2 M NaCl in HEPES-Puffer versetzt wurden. Durch Vortexen und 30 min Inkubation bei 4 °C wurden die Membranen extrahiert. Die extrahierten Membranen wurden bei 45000 rpm für 30 min in einem TLA-45 Rotor (Beckman Optima Ultrazentrifuge) bei 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Membranen in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und die Proteine der Überstände (lösliche Proteine) durch TCA-Fällung (vgl. 2.4.3) aufkonzentriert. Die TCA-Fällung der alkalischen Extraktion wurde mit 24 % (w/v) TCA durchgeführt, um den pH-Wert für die Fällung weit genug abzusenken. Auch die sedimentierten löslichen Proteine wurden in SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Gleiche Mengen, bezogen auf das Ausgangsmaterial, wurden mit SDS-PAGE (vgl. 2.4.4), Transfer auf Nitrozellulose (vgl. 2.4.7) und Immundekoration (vgl. 2.5.4) analysiert. Dabei wurde die Extraktionseffizienz durch Immundekoration mit Antikörpern gegen unterschiedlich stark mit der Innenmembran assoziierten integralen Membranproteinen (Aac-2, DLD) kontrolliert.

2.3.9 *In vitro* Proteinimport von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien

In einem Standardimportansatz sind isolierte Mitochondrien (50 µg pro Gelspur) in Importpuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Magnesiumacetat, 2,5 mM EDTA, 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 5 mM NADH, 2,5 mM ATP, 2,5 mM Malat, 2,5 mM Succinat, 1 mg/ml fettsäurefreies BSA, 50 mM HEPES/KOH pH 7,2) suspendiert, 1 mg/ml. Der Ansatz wurde bei RT 3 min vorinkubiert, bevor der Import durch die Zugabe von 2-10% (v/v) des Retikulozytenlysates, in dem das radioaktiv markierte

Vorstufenprotein enthalten war, gestartet wurde. Die Ansätze wurden 2-40 min bei RT inkubiert, bevor nicht importierte Vorstufenproteine durch zehnfache Verdünnung mit HS-Puffer und gleichzeitiger Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K proteolytisch entfernt wurden. Die Proteolyse wurde nach Inkubation von 25 min auf Eis durch Zugabe von 2 mM PMSF beendet. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10000 rpm, 12 min, 4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge), die Mitochondrien einmal mit 1 mM PMSF in HS-Puffer gewaschen, ohne zu resuspendieren, und in 500 µl HS-Puffer aufgenommen. Die Proteine wurden mit TCA gefällt (vgl. 2.4.3), um unspezifische Proteolyse durch Proteinase K-Restaktivität zu vermeiden. Anschließend wurden die Proteine in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und konnten mit SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) und Transfer auf Nitrozellulosemembranen (vgl. 2.4.7) analysiert werden. Radioaktiv-markierte Proteine wurden durch Auflegen sensitiver Filme sichtbar gemacht (vgl. 2.4.8). Zur Kontrolle der Außenmembranintegrität wurden Immunreaktionen mit Antikörpern gegen Proteine der Innenmembran (Aac-2) durchgeführt (vgl. 2.5.4).

2.3.10 Aufhebung des Membranpotentials durch Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP)

CCCP kann Membranen sowohl im protonierten als auch im deprotonierten Zustand passieren; damit kann CCCP den protonenabhängigen Anteil des Membranpotentials aufheben. CCCP wurde, in der Regel, in einer Endkonzentration von 50 µM in Importexperimenten mit radioaktiven Vorstufenproteinen eingesetzt.

2.3.11 Depletion von ATP in der mitochondrialen Matrix

Um ATP in der Matrix von Mitochondrien zu depletieren, wurden isolierte Mitochondrien vor dem Importexperiment mit 40 U/ml Apyrase und 10 µl/ml Oligomycin behandelt (Stuart et al., 1994b). Die Apyrase hydrolysiert extramitochondriales ATP. Das in der Matrix befindliche ATP wird jedoch durch den ADP/ATP-Transporter (Aac-2) gegen ADP, das durch die Apyrase abhängige ATP-Hydrolyse entsteht, ausgetauscht, so dass es zu einer Verarmung an ATP auch in der Matrix kommt. Gleichzeitig wird eine membranpotential-abhängige Neusynthese durch die ATP-Synthase durch Oligomycin inhibiert. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, bevor der ADP/ATP-Transporter selektiv durch Zugabe von 5 µM Atractylosid und Inkubation bei 4 °C für 5 min inhibiert wurde. Damit wurde der Eintransport von ATP unter Importbedingungen vermieden. Anschließend wurden die vorbehandelten Mitochondrien für Importexperimente eingesetzt (vgl. 2.3.9). Als Kontrolle wurde gleichzeitig das Vorstufenprotein pSu9₁₋₆₉-DHFR importiert; für dieses war ein ATP-abhängiger Import gezeigt worden (Gambill et al., 1993).

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 *In vitro* Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine

Für die *in vitro* Synthese von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen, die bei Importexperimenten eingesetzt werden sollten, wurden diese in das Plasmid pGEM4 kloniert. Anschließend konnten die Konstrukte durch SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und dann in der Gegenwart von [³⁵S]-markiertem Methionin mit Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert werden (Pelham and Jackson, 1976).

Für einen Transkriptionsansatz wurden 40 µl 5-fach konzentrierter Transkriptionspuffer (30 mM Magnesiumacetat, 10 mM Spermidin, 50 mM NaCl, 500 µg/ml BSA, 200 mM Tris/HCl pH 7,9) mit jeweils 10 µl ATP (10 mM), CTP (10 mM), UTP (10 mM) und GTP (1 mM) sowie 20 µl 100 mM DTT, 10 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G, 4,5 µl RNasin (40 U/µl, Promega) und 10-20 µg DNA in 200 µl sterilem Wasser zugegeben. Die Transkription wurde mit der Zugabe von 1,5 µl SP6-RNA-Polymerase (25 U/µl) gestartet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 10 M Lithiumchlorid und 600 µl Ethanol (-20 °C), einer halbstündigen Inkubation bei -80 °C sowie einer halbstündigen Zentrifugation bei 2 °C mit 20000 xg wurde die Transkriptionsreaktion gestoppt und die RNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die RNA bei 30 °C getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser, das 1 µl RNasin (40 U/µl) enthielt, gelöst. Die RNA wurde auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C gelagert.

Ein Translations-Ansatz enthielt 50 µl Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega), 1,5 µl RNasin (40 U/µl), 1,2 µl Aminosäuregemisch (1 mM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin), 10 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml), 20 µl RNA sowie 100 µl steriles Wasser. Der Ansatz wurde gut gemischt und eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 8 µl 0,2 M Methionin sowie 21 µl 1,5 M Saccharose zugegeben, um einen weiteren Einbau von radioaktivem Methionin zu verhindern. Durch Zentrifugation des Translations-Ansatzes bei 2 °C mit 100000 xg wurden die Ribosomen im Ansatz sedimentiert; dabei wurden auch die unvollständigen Polypeptidketten präzipitiert. Das Translationsprodukt wurde in 10 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Alternativ zur separaten Transkription und Translation wurde ein gekoppeltes Transkriptions/Translations-Verfahren verwendet (TNT-Lysat, Promega). Für einen Ansatz wurden 1 µg DNA in 18 µl Wasser, 2 µl TNT-Reaktionspuffer (Promega), 1 µl Aminosäuremischung (s.o.), 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µl TNT SP6-Polymerase (Promega), 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) sowie 25 µl TNT-Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega) verwendet. Der Ansatz wurde 90 min bei 30 °C inkubiert und anschließend der Einbau radioaktiven Methionins durch Zugabe von 2,5 µl 0,2 M nicht markiertem Methionin beendet. Nach weiteren 5 min Inkubation bei 30 °C wurde

der Ansatz ebenfalls bei 2 °C mit 100000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in 10 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Methode von Bradford verwendet (Bradford, 1976). Die Proben wurden dazu mit jeweils 1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrates (Bio-Rad-Proteinassay-Reagenz, Biorad) versetzt und mind. 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde mit einer Standard-Proteinlösung (bovines IgG, Biorad) eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden konnte.

2.4.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen wurden die darin enthaltenen Proteine durch Zugabe von 1/6 Volumen einer 72 % (w/v) TCA-Lösung ausgefällt. Nach der Zugabe wurden die Proben mindestens 15 min auf Eis inkubiert, bevor die Proteine durch 15 min Zentrifugation bei 4 °C mit 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment einmal mit 500 µl Aceton (-20 °C), um überschüssige TCA zu entfernen, gewaschen. Anschließend wurden die Proteine getrocknet und in SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proteine der Proben wurden dann über SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulose analysiert (vgl. 2.4.7; 2.4.8; 2.5.4).

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse wurden Proteine durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Entsprechend der Größe des Zielproteins und der Auflösung wurden Gelsysteme zwischen 8 %/0,14 % (w/v) und 16 %/0,26 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid und einer Laufstrecke zwischen 7 und 13 cm (Schichtdicke 1 mm) verwendet. Im Sammelgel wurden 5 %/0,08 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben in SDS-Ladepuffer aufgenommen und, soweit das Zielprotein nicht aggregierte, durch Inkubation bei 95 °C für 5 min denaturiert. Es wurden Probenvolumina zwischen 30-50 µl mit Proteinmengen bis 200 µg pro Spur geladen. Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde bei jedem Lauf eine Proteinstandardlösung aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 2,5 Stunden bei 25-30 mA. Im Anschluss an

2 Material und Methoden

die Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten gelöst und für den Transfer auf Nitrozellulose verwendet (vgl. 2.4.8).

Sammelgel:	5 % (w/v) Acrylamid/0,08 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED, 60 mM Tris/HCl pH 6,8
Trenngellösung:	8-16 % (w/v) Acrylamid/0,14-0,26 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,03 % (v/v) TEMED, 375 mM Tris/HCl pH 8,8
Laufpuffer:	380 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,3

2.4.5 Harnstoff-Gelelektrophorese

Für eine bessere Auflösung von kleinen Proteinen (unter 15 kDa) wurden die Proteine durch Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Sammelgels entspricht der bei SDS-PAGE verwendeten (vgl. 2.4.4). Das Trenngel dagegen bestand aus: 19,5 % (w/v) Acrylamid/0,26 % (w/v) Bisacrylamid, 36 % (w/v) Harnstoff, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED und 750 mM Tris/HCl pH 8,8. Es wurde SDS-PAGE Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese dauerte 3,5 h bei 30 mA.

2.4.6 Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

Für die Analyse von Proteinkomplexen wurden diese unter nativen Bedingungen mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) nach Größe aufgetrennt (Schagger et al., 1994). Dazu wurden isolierte Mitochondrien in Solubilisierungspuffer (1% Digitonin, 150 mM Kaliumacetat, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 30 mM HEPES/KOH pH 7,4) aufgenommen. Zum vollständigen Solubilisieren wurden die Proben eine halbe Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde nicht lysiertes Material durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C mit 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Vor dem Auftragen auf ein lineares 3-8 % Gradientengel wurde ein Zehntel BN-Auftragspuffer (5 % (w/v) Serva Blau G, 500 mM 6-Aminocaprinsäure) zugegeben. Zunächst wurde die Elektrophorese eine Stunde bei 4 °C mit konstanten 100 V, zum Einlaufen der Proteine ins Trenngel, durchgeführt. Dann wurde die Spannung auf 500 V (Limitiert auf 15 mA) erhöht. Zu Beginn der Elektrophorese wurde ein Kathodenpuffer verwendet, der zusätzlich 0,02 % (w/v) Serva Blau G enthielt. Nach einem Drittel des Laufes wurde dieser gegen Kathodenpuffer ohne Farbstoffzugabe ausgetauscht. Im Laufe der Elektrophorese wurde der blaue Farbstoff aus dem ersten Kathodenpuffer durch das gesamte Gel transferiert. Nachdem der Farbstoff vollständig aus dem Gel in den Anodenpuffer übergegangen war (ca. 4-5 h), wurde die Elektrophorese beendet. Im Anschluss wurden die Gele direkt angefärbt (In-Gel-ATPase Aktivität, vgl. 2.4.11.6), auf

Nitrozellulose-/PVDF-Membranen transferiert (vgl. 2.4.7) oder zur weiteren Analyse auf SDS-PAGE-Gele geladen (2.Dimension).

Sammelgel: 2,5 % (w/v) Acrylamid/0,0625 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocaprinsäure, 0,08 % (w/v) APS, 0,08 % (v/v) TEMED, 50 mM BisTris/HCl pH 7,4

Trenngel: linearer Gradient aus 3-8 % (w/v) Acrylamid/0,075-0,2 % Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocaprinsäure, 5 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED, 50 mM BisTris/HCl pH 7,4

Kathodenpuffer: 50 mM Tricine, 0,02 % (w/v) Serva Blau G, 15 mM BisTris/HCl 7,4

Anodenpuffer: 50 mM BisTris/HCl pH 7,4

2.4.7 Proteintransfer aus Gelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western-Blot)

Nachdem die Proteine in einem der verschiedenen Gel-Systeme aufgetrennt worden waren, wurden die Proteine zur genauen Analyse (immunologisch (vgl. 2.5.4) oder mittels Autoradiographie (vgl. 2.4.8)) auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen elektrophoretisch transferiert („Western-Blotting“-Verfahren; Towbin et al., 1979). Es wurden dabei zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, das Halbtrocken- (Graphit-Elektroden) und das Nassverfahren (Tankblot). Prinzipiell unterscheiden sich diese beiden Verfahren nicht. Der Vorteil des Nassverfahrens liegt im quantitativen Transfer insbesondere von großen Proteinen; jedoch benötigt es eine längere Transferzeit. In der Regel wurde das Halbtrockenverfahren verwendet, so dass auf dieses hier näher eingegangen wird.

Für den Transfer wurden das Gel und die Membran 5 min in Transferpuffer (150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS, 20 mM Tris) vorinkubiert. Eine PVDF-Membran wurde zuvor, zum Aktivieren der Bindungsstellen, in reinem Methanol geschwenkt. Der Blot wurde auf der Anode (untere Graphitelektrode) assembliert, dazu wurden 3 Whatman Filterpapier-Lagen in Transferpuffer getaucht und auf der Elektrode glatt gestrichen. Die Membran wurde auf die Whatman Papierlagen platziert, bevor das Gel wiederum auf die Membran gelegt wurde. Drei weitere Whatman Filterpapier-Lagen wurden über das Gel gelegt und alle Lagen unter leichtem Druck geglättet, so dass keine Luftblasen zwischen den Lagen einen gleichmäßigen Transfer verhindern konnten. Entsprechend der Proteingröße variierte die Dauer des Transfers zwischen 30 und 90 min bei 200 mA. Beim Tankblot-Verfahren wurde 2,5 Stunden mit 20 V, 150 mA geblottet. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran unspezifisch mit Ponceau S angefärbt, um die Markerproteine einzeichnen und die Gleichmäßigkeit des Transfers beurteilen zu können. Für die Färbung wurde die Membran zunächst in

2 Material und Methoden

deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend kurz in Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) geschwenkt. Überschüssiges Ponceau S wurde durch Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt.

2.4.8 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteinen wurden nach SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) und Transfer auf Nitrozellulose Membranen (vgl. 2.4.7) durch Autoradiographie nachgewiesen. Dazu wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) auf die getrocknete Membran aufgelegt und nach einer entsprechenden Inkubationszeit (1-7 Tage) entwickelt (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert). Zur Quantifizierung der Signale auf dem Röntgenbild wurde der Film mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Pharmacia) eingelesen. Die Intensitäten der Banden wurden mit dem Programm Image Master 1D (Pharmacia) densitometrisch bestimmt. Alternativ wurde anstelle des Röntgenfilms eine Phosphorimaging-Platte auf die Nitrozellulose-Membran aufgelegt. Diese wurde mit einem Phosphorimager (FLA 3000, Fuji) ausgelesen und konnte mit Hilfe des Programms AIDA (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland) quantitativ ausgewertet werden.

2.4.9 Messung des Membranpotentials in isolierten Mitochondrien

Zur Messung des Membranpotentials von isolierten Mitochondrien wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: 3,3'-Dipropylthiodicarbocyanin (DiSC₃) und Rhodamin 123. Die kationischen Farbstoffe werden membranpotentialabhängig in die Mitochondrien aufgenommen. Dadurch kommt es zur Akkumulation des Farbstoffes in den Mitochondrien, was eine Rotverschiebung der emittierten Fluoreszenz zur Folge hat. Dabei korreliert die Abnahme der Emission mit der Höhe des Membranpotentials, jedoch ist diese vom verwendeten Farbstoff abhängig. Somit ist ein Vergleich der relativen, farbstoffabhängigen Membranpotentiale von unterschiedlichen Mitochondrienpräparationen möglich. Für die Messung wurden 3 ml $\Delta\Psi$ -Puffer (0,6 M Sorbitol, 0,1 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 0,5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4) in eine Fluoreszenzküvette vorgelegt. 0,7 μ M DiSC₃ oder 0,4 μ g/ml Rhodamin 123 wurden zugegeben und die Emission der Lösung im Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Dann wurden 150 μ g Mitochondrien (15 μ l einer 10 mg/ml Lösung) zugegeben, gemischt und zum Aufbau eines Membranpotentials 10 μ l Ethanol hinzugegeben. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde bis zum Erreichen eines stabilen, maximalen Wertes verfolgt (2 min), und dann wurde das Membranpotential durch Zugabe von 0,2 mM KCN aufgehoben. KCN führt zur Inhibition des Komplex IV der Atmungskette, so dass das Membranpotential nicht weiter durch die Atmungskette aufrechterhalten werden konnte. Mit einer zusätzlichen Gabe von

0,7 mM CCCP konnte keine weitere Absenkung des Membranpotentials erreicht werden. Wurde kein CCCP zugegeben, so konnte erneut ein Membranpotential durch ATP-Zugabe erreicht werden. Dabei werden die Protonen unter ATP-Hydrolyse durch Umkehr der ATP-Synthase-Funktion aus der Matrix gepumpt. Eine anschließende Aufhebung des Membranpotentials durch CCCP-Zugabe und erneute Zugabe von ATP wurde verwendet, um die Höhe des ATP-abhängigen Membranpotentials zu berechnen. Dies ist nötig, da ATP bereits alleine zu einer Rotverschiebung der Emission führt. Zur Ermittlung des mit ATP aufgebauten Membranpotentials muss dies berücksichtigt werden. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Das relative Membranpotential wurde aus dem Verhältnis der Maximal-Abnahme ($\Delta F = F_{\max} - F_{\min}$) und der Fluoreszenz nach Aufhebung des Membranpotentials (F_{\max}) ermittelt.

2.4.10 Messung des Absorbtionsspektrums mitochondrialer Cytochrome

Zur Messung des Absorbtionsspektrums der mitochondrialen Cytochrome wurden zwei Quarz-Küvetten mit jeweils 130 μ l Mitochondriensuspension (ca. 10 mg/ml) bestückt und in ein Doppelstrahl-Photospektrometer gestellt. Um das Differenzspektrum aufnehmen zu können, wurde die Mitochondriensuspension einer Küvette mit 1,3 μ l einer 3 % (w/v) H_2O_2 -Lösung oxidiert, während die Suspension der anderen Küvette durch Zugabe von 1,3 μ l 100 mM Na_2SO_3 -Lösung reduziert wurde. Anschließend wurde das Differenzspektrum im Jasko V550 Photospektrometer im Wellenlängen-Bereich von 500 bis 650 nm aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug dabei 40 nm/min, und alle 0,5 nm wurde ein Datenpunkt genommen. Nach der Messung des Differenzspektrums wurde dieses ausgewertet; dazu wurden die verschiedenen Maxima und Minima zur Ermittlung der Absorbtionswerte verwendet und diese mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten in Stoffmengen umgerechnet.

	Maximum bei	Minimum bei	Extinktionskoeffizient
Cytochrom <i>a/a</i> ₃	600 nm	630 nm	13 M ⁻¹ cm ⁻¹
Cytochrom <i>b_Hb_L</i>	561 nm	575 nm	18 M ⁻¹ cm ⁻¹
Cytochrom <i>c/c</i> ₁	551 nm	540 nm	18 M ⁻¹ cm ⁻¹

2.4.11 Messung spezifischer Enzymaktivitäten in Mitochondrien

Zur Messung spezifischer mitochondrialer Enzymaktivitäten wurden die Ansätze und Reaktionen so gewählt, dass der Substratumsatz direkt oder indirekt photometrisch bestimmt werden konnte. Die Ausgangsmengen in den Ansätzen wurden so gewählt, dass die Reaktion über einen längeren Zeitraum (5-10 min) konstant ablaufen konnte.

2 Material und Methoden

Über die zeitabhängigen Extinktionsänderungen am Anfang der Reaktion wurden die Aktivitäten mit dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

2.4.11.1 Bestimmung der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase-Aktivität

Zur Funktionalitätsmessung der F_1F_0 -ATP Synthase wurde deren hydrolytische ATPase-Aktivität gemessen. Die Aktivitätsmessungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Dazu wurden 10-15 µg Mitochondrien in 300 µl HS-Puffer (0,65 M Sorbitol, 0,2 M KCl, 3 mM MgCl, 40 mM Tris/HCl pH 8,4) resuspendiert, mit 7 µM CCCP versetzt und 2 min bei RT inkubiert, so dass sich der außen angelegte pH-Wert in der Matrix einstellen konnte. Durch Verwenden von verschiedenen pH-Werten, die mit unterschiedlichen Puffersystemen zwischen pH 6 und pH 9 eingestellt waren, konnte die pH-abhängige Inhibition der F_1F_0 -ATP Synthase durch das Inhibitorprotein (Inh1) untersucht werden. Für maximale Aktivitätsmessungen wurde ein pH-Wert von 8,4 eingestellt, da bei diesem pH-Wert das Inhibitorprotein von der F_1F_0 -ATP Synthase dissoziiert. Nachdem der pH-Wert in der Matrix eingestellt war, wurde die Suspension mit 7 mM ATP versetzt und damit die ATPase abhängige ATP-Hydrolyse gestartet. Nach verschiedenen Zeitpunkten (2, 5, 10, 15 min) wurden 50 µl des Ansatzes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 95 °C deaktiviert. Weiter unspezifische thermische ATP-Hydrolyse wurde verhindert, indem die Proben im Anschluss an die Deaktivierung auf Eis gestellt wurden. Um die Spezifität der Hydrolyse zu kontrollieren, wurde parallel ein Ansatz mit 6 µg/ml Oligomycin versetzt. Oligomycin bindet spezifisch den membrangebundenen F_0 -Teil der F_1F_0 -ATP Synthase und verhindert damit die Hydrolyse des ATP. Die bei der Hydrolyse freiwerdenden Produkte, Phosphat und ADP, wurden quantitativ aus eigenständigen Experimenten mit Malachitgrün-Reagenz (Phosphat-Nachweis) (vgl. 2.4.11.1.1) oder in einem gekoppelten Enzym-Assay (ADP-Messung) ermittelt (vgl. 2.4.11.1.2).

2.4.11.1.1 Quantitative Bestimmung von Phosphat mit Malachitgrün-Reagenz

Durch die Hydrolyse von ATP freigesetztes Phosphat wurde quantitativ mittels Bildung eines Ammoniumheptamolybdat-Komplexes nachgewiesen. Dieser Komplex ist in der Lage, Malachitgrün zu oxidieren. Die Bildung des oxidierten Malachitgrüns wurde photometrisch bei 640 nm verfolgt.

Die Proben der Hydrolyse-Reaktion (50 µl) wurden mit 800 µl Malachitgrün-Reagenz versetzt und die Oxidationsreaktion nach 1 min mit der Zugabe von 100 µl 34 % (w/v) Zitronensäure beendet. Anschließend wurden die Ansätze bei RT für 30 min inkubiert und dann die Absorption bei 640 nm gegen den Leerwert (800 µl Malachitgrün-Reagenz, 100 µl 34 % (w/v) Zitronensäure, 50 µl Puffer) gemessen. Zur Quantifizierung

wurde eine Phosphat-Eichkurve (0-150 μM Kaliumphosphat pH 7,4) aufgenommen. Anhand der zeitabhängigen Zunahme an Phosphat wurde die ATPase-Aktivität ermittelt.

Malachitgrün-Reagenz:

Lösung1:	340 mg Malachitgrün wurden in 75 ml Wasser gelöst.
Lösung2:	10,5 g Ammoniumheptamoybdat wurden in 250 ml 4 N HCl gelöst.

Die Lösungen 1 und 2 wurden gemischt und auf einen Liter mit Wasser aufgefüllt. Nach Inkubation für eine Stunde auf Eis wurde die Lösung filtriert und bei 4 °C gelagert. Zur Messung wurde das Malachitgrün-Reagenz mit 1 % TX-100 versetzt.

2.4.11.1.2 Quantitative ADP-Messung mit einem gekoppelten Enzym-Assay

Mit Hilfe des gekoppelten Enzymassays wurde indirekt ADP quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, dass dieser Assay im Vergleich zur Phosphat-Bestimmung mit dem Malachitgrün-Reagenz genauere Daten lieferte. Gemessen wurde die maximale Oxidation von NADH durch die Laktat-Dehydrogenase. Das dazu nötige Pyruvat entsteht durch die Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Kinase mit ADP und Phosphoenolpyruvat. Die entstandene molare Menge an NAD entspricht der molaren Menge ADP in der Probe.

Zur Messung wurden die Proben der Hydrolyse mit 200 μl Reaktionsmix (50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 20 $\mu\text{g/ml}$ Phosphoenolpyruvat-Kinase, 10 $\mu\text{g/ml}$ Laktat-Dehydrogenase, 0,2 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 50 mM Tris/ SO_4 pH 8,0) versetzt und die Absorption bei 340 nm über 3 min verfolgt. Der stabile Endwert nach 3 min wurde zur Ermittlung der ADP-Konzentration verwendet.

2.4.11.2 Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität

Der Cytochrom c Oxidase Komplex ist der vierte und letzte Komplex der Atmungskette, über diesen Komplex werden die Reduktionsäquivalente vom Cytochrom c auf Sauerstoff übertragen, dabei entsteht Wasser. Zur Messung der Cytochrom c Oxidase wurde die zeitabhängige Oxidation von Cytochrom c bei 550 nm in einem Differenzspektrum verfolgt. Als Substrat wurde eine 1 % (w/v) Cytochrom c Lösung (in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) mit Natriumdithionit vollständig reduziert. Zwei Küvetten wurden mit 920 μl 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und 80 μl der reduzierten Cytochrom c Lösung bestückt. In eine der Küvetten wurden 5-20 μg Mitochondrien gegeben und die zeitliche Absorptionsänderung aufgezeichnet. Durch die Zugabe der Mitochondrien in die Pufferlösung, platzen diese und die Enzymkomplexe der Innenmembran werden zugänglich. Die Anfangssteigung der

2 Material und Methoden

Oxidationsreaktion wurde ermittelt und die spezifische Aktivität anhand des Extinktionskoeffizienten (Cytochrom *c* bei 550 nm $18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet.

2.4.11.3 Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität

Die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die NAD abhängige Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Das bei dieser Reaktion durch Übertragung der Reduktionsäquivalente entstehende NADH kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. 10-50 μg Mitochondrien wurden in 1 ml MDH-Puffer (2,44 mM NAD^+ , 85 mM L-Malat, 100 mM Glycin/NaOH pH 10,0) solubilisiert und die Absorptionsänderung bei 340 nm über die Zeit verfolgt. Mit dem Extinktionskoeffizient von $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei diesen Bedingungen für NADH wurde die spezifische Aktivität ermittelt.

2.4.11.4 Bestimmung der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität

Die NADH-Cytochrom *c* Reduktase Reaktion umfasst die Übertragung von Elektronen von NADH über den Komplex II der Atmungskette (NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase) auf Ubichinon und die Übertragung vom Ubichinon auf Cytochrom *c*. Die Reduktion von Cytochrom *c* kann über ein Differenzspektrum photometrisch bei 550 nm verfolgt werden (vgl. 2.4.11.4). Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Die Messung wurde in 1 ml Reduktase-Puffer (0,08 % (w/v) Cytochrom *c*, 0,1 mM NADH, 0,1 mM KCN, 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5) durchgeführt. Eine Referenz-Küvette wurde nur mit Puffer bestückt, während die Reaktion in der anderen Küvette mit 5-50 μg Mitochondrien gestartet wurde. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und die spezifische Aktivität errechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* beträgt bei 550 nm $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.4.11.5 Spezifischer Nachweis der F_1F_0 -ATP Synthase-Aktivität in BN-PAGE-Gelen

Zur Identifizierung der F_1F_0 -ATP Synthase Monomere, Dimere und Oligomere wurde nach der Auftrennung durch BN-PAGE (vgl. 2.4.6) deren enzymatische Aktivität genutzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und 20 min bei RT in deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel 20 min in Aktivitätspuffer (5 mM MgCl_2 , 20 mM ATP, 50 mM Glycin/NaOH pH 8,4) inkubiert. Bei diesem pH-Wert hydrolysiert die ATP-Synthase ATP und setzt Phosphat frei. Durch Zugabe von 2 ml einer 10 % (w/v) CaCl_2 -Lösung im Anschluss an die 20 minütige Inkubation wurde das freiwerdende Phosphat im Gel als unlösliches Kalziumphosphat sichtbar.

2.4.12 Messung des Sauerstoffverbrauchs an isolierten Mitochondrien

Der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien wurde mit einem Oxigraphen der Firma Hansatech Instruments gemessen. Dazu wurden 500 µg frisch isolierter Mitochondrien in 1 ml Respirationspuffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl₂, 5 mM KPi, 20 mM HEPES pH 7,4) resuspendiert. Für die Messung des ‚State IV‘ wurden 5 mM Succinat und 0,6 mM NADH zugegeben. Zusätzlich wurde 250 µM ADP für die Messung des ‚State III‘ zugefügt. Zum Entkoppeln des Sauerstoffverbrauchs von der F₁F₀-ATP Synthase, und damit zur maximalen Atmungsaktivität, wurde 0,4 µM CCCP verwendet. Die Sauerstoffverbrauchsrate wurde mit Hilfe der Computerprogramms Oxyg32 V2.25 ermittelt.

2.4.13 Größenausschlußchromatographie

Alternativ zur BN-PAGE wurden die Größen bestimmter Komplexe und deren Zusammensetzung über Größenausschlußchromatographie mit Hilfe eines ÄKTA-Chromatographiesystems (Pharmacia) untersucht. 0,5-2 mg isolierte Mitochondrien wurden dazu in 600 µl Lysepuffer (1,5 % (w/v) Digitonin oder 0,5 % (w/v) DDM, 20 % (v/v) Glycerol, 150 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM DTT, 50 mM Kaliumacetat pH 7,4) aufgenommen und 30 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden die ungelösten Aggregate durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 °C für 15 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine Superose 6–Größenausschlußsäule (Pharmacia) aufgetragen, die zuvor mit 2 Säulenvolumina Laufpuffer (0,1 % (w/v) Digitonin oder 0,03 % (w/v) DDM, 10 % (v/v) Glycerol, 150 mM KCl, 10 mM DTT, 50 mM Kaliumacetat pH 7,4) äquilibriert worden war. Die Gelfiltration wurde mit einer Flußrate von 0,3 ml/min durchgeführt. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und die darin enthaltenen Proteine mit TCA ausgefällt (vgl. 2.4.3). Anschließend wurden die Proben mit SDS-PAGE (vgl. 2.4.4), Transfer auf Nitrozellulose (vgl. 2.4.7) und Immunoblot (vgl. 2.5.4) analysiert. Um die Komplexgröße abschätzen zu können, wurde eine Eichgerade mit Markerproteinen bei diesen Laufbedingungen erstellt. Als Markerproteine wurden verwendet: Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (440 kDa), ADH (150 kDa), BSA (66 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Um polyklonale Antikörper gegen die Proteine Pcp1, Su e, Su g und Su k zu gewinnen, wurden Kaninchen mit entsprechenden Peptiden immunisiert. Zur besseren Gewinnung wurden einige Peptide als Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert. Dazu dienten GST- (Glutathion-S-Transferase) und MBP-Domänen (Maltose-Binde-Protein). Die Aminosäuresequenzen der Peptide wurden so gewählt, dass die entstehenden Antikörper spezifisch einen bestimmten Teil des Proteins erkannten. Weiterhin wurden die Sequenzen so gewählt, dass keine besonders hydrophoben Bereiche der Proteine zur Antikörperproduktion verwendet wurden. Zusätzlich musste für den N-terminalen Antikörper gegen Pcp1 berücksichtigt werden, dass keine genaue Vorhersage gemacht werden konnte, an welcher Stelle eine Prozessierung durch die mitochondriale Matrix-Protease erfolgt.

Dem Peptid zur Erzeugung des C-terminalen Antikörpers gegen Pcp1 wurde N-Terminal ein zusätzliches Cystein angehängt, um durch kovalente Kopplung an eine Matrix eine Affinitätsreinigung des Antikörpers zu ermöglichen (vgl. 2.5.2). Die Synthese dieses Peptids sowie die Immunisierung und die Gewinnung des Serums wurden von der Firma Pineda Antikörper Service durchgeführt.

Das N-terminale Peptid zur Herstellung eines Pcp1-Antikörpers wurde als GST-Fusions Protein in *E.coli* überexprimiert und über eine Glutathion-Agarose-Säule isoliert.

Allgemein wurden für die Erstinjektion 200 µl (1 µg/µl) des gereinigten Peptids/Fusionsproteins mit gleichem Volumen TiterMax versetzt, 3 min auf dem Vortexer gemischt und dann dem Kaninchen an mindestens 2 Stellen im Nacken subkutan gespritzt. Weitere Injektionen erfolgten in 4-6 Wochen Abständen, wobei jedoch anstelle von TiterMax unvollständiges ‚Freudschens Adjuvans‘ verwendet wurde. 8-10 Tage nach einer Injektion mit ‚Freudschens Adjuvans‘ wurde den Kaninchen über die Ohrvenen 20-25 ml Blut entnommen. Nach dem Gerinnen des Blutes (1h bei RT) wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 3000 xg für 5 min bei RT das Serum gewonnen. Das Serum wurde in ein neues 15 ml Schraubdeckelreagenzgefäß überführt und 20 min auf 56 °C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

Protein	Peptidsequenz	
N-term Pcp1 40-110	GST- STSILKNAPNLEDNVTNLQKIIPKRFFSQTSILKSRWKPIFN EETTNRYVRLNRFQQYQQQRSGGNPLGSM	diese Arbeit
C-term Pcp1 332-346	CEKQRQRRLQAAGRWF	Pineda im Rahmen dieser Arbeit
Su e 21-65	MBP- RNDMILKCNAAKKKEEQAQYEEKLKLVEEAKKEYAKLHPVV TPKDV	diese Arbeit
Su g 104-115	CIGRRKLVGYKHH	(Arnold et al., 1998)
Su k 1-67 (gesamt)	MBP- MGAAYHFMGKAIPPHQLAIGTLGLLGLLVVPNPFKSAKPK TVDIKTDNKDEEKFIENYLKKHSEKQDA	diese Arbeit

2.5.2 Bindung von Peptiden an eine Matrix zur Affinitätsreinigung von Antikörpern mit Sulfolink Coupling Gel[®] (Pierce)

Die Peptide, die von der Firma Pineda Antikörper Service zur Immunisierung der Kaninchen synthetisiert und verwendet wurden, waren für die Affinitätsreinigung mit einem zusätzlichen N-terminalen Cystein versehen worden. Über dieses Cystein konnte das Peptid an die Sulfolink Coupling Gel[®] Matrix gekoppelt werden. Die Matrix besitzt dazu eine Iodacetylgruppe, die über eine 12 Kohlenstoff Atome lange Verbindung an die Matrix gebunden ist. Die Matrix wurde für die Peptidbindung in 6-fachem Volumen Bindungspuffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,5) äquilibriert. In der Regel wurden 0,5-1 ml Gelbettvolumen verwendet, für 1 ml Gelbettvolumen wurden 10 mg des zu koppelnden Peptids in 1 ml Bindungspuffer gelöst. Teilweise ließen sich die Peptide erst durch Sonifizieren oder Zugabe von Detergenz in Lösung bringen. Die Peptidlösung wurde auf die äquilibrierte Matrix gegeben und die Suspension 1 Stunde bei RT unter Rühren inkubiert. Das meiste der Peptide wurde während dieser Zeit an die Matrix gebunden. Nach dieser Inkubation wurde die Peptid-Lösung entfernt und die Matrix mit 3 Säulenvolumina Bindungspuffer ohne Peptid gewaschen. Als Bindungskontrolle wurden Proteinbestimmungen nach Bradford (vgl. 2.4.2) von der peptidhaltigen Bindungspuffer-Lösung vor dem Koppeln an das Säulenmaterial und nach der einstündigen Inkubation gemacht. Die übrig gebliebenen Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation der Säulenmatrix mit 50 mM Cystein in Bindungspuffer abgesättigt. Dann wurde die Cysteinlösung entfernt und die Matrix mit 16 Säulenvolumina 1 M NaCl und 16 Säulenvolumina 0,05 % (w/v) Natriumazid gewaschen. Schließlich wurde die Säule noch mit zehn Säulenvolumina Lagerungspuffer (0,02 % (w/v) Natriumazid, 10 mM Tris/HCl pH 7,6) gewaschen, mit 1 ml überschichtet und bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Für die Affinitätsreinigung der Antikörper wurde die Säule mit dem gekoppelten Peptid mit jeweils 10 ml Puffer 1 (10 mM Tris/HCl pH 7,6), Puffer 2 (100 mM Glycin/HCl pH 2,5), Puffer 3 (10 mM Tris/HCl pH 8,8) und Puffer 4 (100 mM Natriumphosphat pH 11,5) gewaschen. Dann wurde die Säule mit 10 ml Puffer 1 äquilibriert. Für die Antikörperbindung wurden 4 ml Serum mit 10 ml Puffer 1 versetzt, durch Zugabe von 65 µl 0,2 M PMSF, 52 µl 0,25 M EDTA, 52 µl 0,5 M EGTA, 130 µl 50 mM o-Phenantrolin und 13 µl 1 mg/ml Leupeptin wurden jegliche Proteasen inaktiviert. Die Serum-Lösung wurde anschließend 3-mal auf das Säulenmaterial geladen. Danach wurde die Säule mit jeweils 20 ml Puffer 1 und Puffer 5 (500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,6) gewaschen. Die Antikörper wurden durch schrittweises Absenken des pH-Wertes von der Säule eluiert. Dazu wurden 10 ml Citratpuffer (100 mM Natriumcitrat pH 4), 10 ml Glycinpuffer (100 mM Glycin/HCl pH 2,5) und 10 ml Puffer 4 (100 mM Natriumphosphat pH 11,5) auf die Säule aufgetragen und das Eluat in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Der pH-Wert der jeweiligen Fraktionen wurde mit 1 M Tris-Base (Citratpuffer, Glycinpuffer) oder 1 M Glycin pH 2,5 (Puffer 4) neutralisiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford (vgl. 2.4.2) bestimmt. Meistens enthielten die Fraktionen 2-4 der Glycin/HCl pH 2,5-Elution den höchsten Antikörpergehalt. Die Fraktionen, die Antikörper enthielten, wurden bei -20 °C gelagert. Die Säule wurde nach der Elution mit zehn Säulenvolumina Lagerungspuffer (0,02 % (w/v) Natriumazid, 10 mM Tris/HCl pH 7,6) gewaschen, mit 1 ml überschichtet und bei 4 °C gelagert.

2.5.4 Immundetektion von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen (Western-Blot, Immunoblotting) wurden diese durch SDS-PAGE (vgl. 2.4.4) oder BN-PAGE (vgl. 2.4.6) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen elektrophoretisch transferiert (vgl. 2.4.7). Unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen wurden zunächst durch Inkubation in MTBS (5 % (w/v) Magermilchpulver, 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) für 30-60 min bei RT unter Schütteln abgesättigt. Dann wurden die Membranen mit in MTBS verdünntem Antikörper- bzw. Antiseren-Lösungen (Primärer Antikörper) 1-2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Verdünnung des Antikörpers in der MTBS-Lösung variierte je nach Antikörper-Lösung (Serum, Affinitätsreinigung) zwischen 1:200 bis 1:1000. Anschließend wurden die Membranen 3-mal 5 min in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit gegen Kaninchen- oder Maus-Immunglobulin G

gerichteten Antikörpern von einer Ziege detektiert; diese waren mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert worden (Ziege anti-Kaninchen-HRP Konjugat oder Ziege anti-Maus-HRP Konjugat, Biorad). Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 (anti-Kaninchen) oder 1:5000 (anti-Maus) in MTBS-Puffer eingesetzt. Die Membranen wurden eine Stunde bei RT in der Sekundär-Antikörper-Lösung geschüttelt. Dann wurden die Membranen erneut 3-mal 5 min in TBS gewaschen. Die über die beiden Antikörper an das Zielprotein gebundene Peroxidase wurde mit einem auf Chemilumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham Biosciences) mit einem Röntgenfilm (Fuji) nachgewiesen (Vacherau, 1989). Für die Nachweisreaktion wurden gleiche Volumina (2-6 ml) der Lösungen ECL1 und ECL2 gemischt, die Membran in dieser Lösung 1-2 min inkubiert und der Röntgenfilm zwischen 10 s bis 10 min der Chemilumineszenz exponiert.

ECL1:	0,044 % (w/v) Luminol
	0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure
	100 mM Tris/HCl pH 8,5
ECL2:	0,024 % (w/v) H ₂ O ₂
	100 mM Tris/HCl pH 8,5

2.6 Puffer und Medien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid;

LB-Platten: LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar

Für LB^{Amp}-Medium sowie -Platten wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

S-Medium: 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2% (w/v) Laktat (SL), 2% (w/v) Glycerin (SG) oder 2% (w/v) Glukose (SD)

Auxotrophiemarker:

Adenin	20 mg/l
Uracil	20 mg/l
Histidin	20 mg/l
Leucin	20 mg/l
Lysin	20 mg/l
Tryptophan	20 mg/l

SDS-Probenpuffer: 2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl (Lämmli) pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

Sporulationsplatten: 1% (w/v) Kaliumacetat; 2% (w/v) Agar

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien

Agfa-Gevaert, München	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Biosciences, Freiburg	ECL-Immunoblot-Detektionssystem, Kaninchen-Retikulozytenlysat
ARK-Sigma, Darmstadt	Oligonukleotide
Biorad, München	Proteinstandard und Proteinreagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgG
Boehringer, Mannheim	Desoxynukleosidtriphosphate, Expand PCR-Kit, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris
Braun, Melsungen	Kanülen, Spritzen
DIFCO, Detroit (USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, <i>Yeast Nitrogen Base</i>
EUROSCARF, Frankfurt	Hefestämme (vgl. Tabelle)
Fuji, Tokyo (Japan)	Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Genomed, Bad Oeynhausen	Jetstar®-Reagenzien und Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu, Gaiberg	Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH
GIBCO-BRL, Eggenstein	Agarose, T4-DNA-Ligase, Restriktionsenzyme
GL BioTech, Hude	GL <i>taq</i> PCR-Kit
ICN Pharmaceuticals, Eschwege	[³⁵ S]-Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol), Tris
Invitrogen, Groningen	DH5α, Elektroporationsküvetten, See Blue Plus 2 Prestained Protein Standard
Kodak, München	Biomax MR Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm
Metabion, Martinsried	Oligonukleotide
Molecular Probes, Eugene (USA)	Rhodamin B-Hexylester
Nestlé-Alete, München	Magermilchpulver
New England Biolabs, Schwalbach	Restriktionsenzyme und 10 x Puffer für Restriktionsenzyme
Pall Life Sciences, New York (USA)	Nanosep Centrifugal Devices
peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	peqGOLD Proteinmarker, Molekulargewichts-Standard für SDS-PAGE
Pierce, Rockford (USA)	Sulfolink® Coupling Gel, Quervernetzungsreagenzien DSG, DSS und MBS, GelCode® Kolloidaler Commassie Färber
Pineda Antikörper Service, Berlin	Antikörper gegen C-terminales Peptid von Pcp1 (vgl. 2.5.1)
Promega, Heidelberg	RNasin, TNT Coupled Reticulocyte System, pGEM4-Vektor, Gel Drying Film, <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
Qiagen, Hilden	QIAquick Gel Extraction Kit, Ni-NTA Agarose
R&D Systems, Abingdon (UK)	pYX-Vektoren
Research Genetics, Huntsville (USA)	homozygot diploide Deletions-Hefestammsammlung (vgl. Tabelle)
Riedel de Haen, Seelze	Kaliumacetat
Sarstedt, Bad Homburg	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll, Kassel	Protran Nitrozellulosemembranen BA83, PVDF-Membran, Whatman Filterpapiere, Faltenfilter, Sterilfilter
Seikagaku, Tokyo (Japan)	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Coomassie Blau G, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Raffinose, Saccharose (Sucrose), Serva Blau G, SDS, TEMED
Sigma, München	Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Ethidiumbromid, Glycerol, Lachsspermien-DNA, β-Mercaptoethanol, LMW und HMW Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE, PMSF, Rhodamin123, Triton X-100, Oligomycin, Trypsin (Typ VIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A
Stratagen, Kalifornien (USA)	QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit
Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.	

2 Material und Methoden

2.7.2 Geräte

Agarose-Geldokumentation	The Imager [®] Imaging System, Appligene, Heidelberg
Autoklav	Varioclav [®] 400E, H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschränke,	Inkubatoren Heraeus Christ, Osterode
Chromatographiesäule Superose 6	Amersham Biosciences, Freiburg
Chromatographiesystem	Äkta Explorer, Amersham Biosciences, Freiburg
CCD-Kamera für Fluoreszenz-	Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, (USA)
mikroskop	
Durchlichtscanner und	Image Scanner und Software Image Master 1D, Amersham
Quantifizierungssoftware	Biosciences, Freiburg
Elektroporationssystem	Gene Pulser, BioRad, München
Entwicklermaschine	Gevamatic 60 [®] Agfa-Gevaert, München
Feinwaagen	Sartorius, Mainz
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
	Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad, München
Kolbenhubpipetten	Abimed, Düsseldorf
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidorph
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Peristaltische Pumpe P-1,	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphoimager	Phosphoimager FLA 3000, Fuji, Tokyo (Japan)
Photometer	Photometer UV-120-02 und UV-240, Shimadzu, Kyoto (Japan)
	Ultraspec10, Celldensity-meter, Amersham Biosciences,
	Freiburg
	UV/VIS-Photospektrometer V-550, JASCO, Toronto (Kanada)
	Fluoreszenz-Spektrometer, FluroMax [®] , Spex
	GeneQuant <i>pro</i> , Amersham Biosciences Eppendorf, Freiburg
Quarzküvetten	Hellma
Reinstwasseranlagen	PureLab Plus, USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach
Halbtrocken Blotapparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Software Fluoreszenzmikroskop	MetaView 3.6 a, Universal Image Corporation, (USA)
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences,
	Freiburg
Sterilbank	BDK
Tank-Blot	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Thermocycler	Primus 25/96, MWG Biotech, Ebersberg
Thermomixer	Thermomixer <i>compact</i> Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B-15, G. Heinemann
Vortex-Mixer	Bender und Hobein, München
Wärmeschränke	Memmert, Hannover
Zentrifugen	Beckman Instruments:
	Kühlzentrifuge J2-21
	Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E
	Ultrazentrifugen L8-50M/E und L8-M
	Eppendorf: Tischzentrifugen (5415D und 5810R)
	Heraeus Christ: Tischzentrifuge Bactifuge [®]
	Sigma: Kühlzentrifuge 3K30

3 Ergebnisse

3.1 Funktionsanalyse der Dimer-spezifischen F_1F_0 -ATP Synthase-Untereinheit Su_e

Der oligomere Zustand der F_1F_0 -ATP Synthase ist für den Erhalt von Cristae-Strukturen notwendig (Giraud et al., 2002), (Paumard et al., 2002). Insbesondere die Transmembrandomäne von Su_e mit dem Dimerisierungsmotiv GXXXG ist dabei funktionell wichtig. Die Untereinheit e der F_1F_0 -ATP Synthase aus Pilzen (*S.cerevisiae*, *N.crassa*) besitzt im Gegensatz zu Orthologen aus Säugern, die nur eine vorhergesagte C-terminale ‚coiled-coil‘-Domäne besitzen, zwei ‚coiled-coil‘-Domänen (Arnold et al., 1997), deren Funktion jedoch nicht bekannt ist.

3.1.1 Funktionelle Charakterisierung der C-terminalen ‚coiled-coil‘ Strukturen von Su_e

Die Funktion der unterschiedlichen Domänen der Untereinheit e auf das Dimerisierungs- und Oligomerisierungsverhalten der F_1F_0 -ATP Synthase wurde untersucht. Ferner wurden Experimente zum Einfluss der Suprakomplex-Bildung auf den bioenergetischen Zustand der Mitochondrien durchgeführt. Zur funktionellen Charakterisierung der Transmembrandomäne und der beiden ‚coiled-coil‘-Domänen wurden C-terminal verkürzte Varianten von Su_e und die Insertionsmutante Su_{e18A} kloniert und in der Deletionsmutante Δsu_e exprimiert (Abb. 3.1.1). Die Verkürzungen wurden so gewählt, dass die C-terminal gelegene erste ‚coiled-coil‘-Domäne vollständig entfernt wurde (Su_{e1-65}). Außerdem wurde zusätzlich ein dazu N-terminal liegender großer Teil entfernt (Su_{e1-46}). Eine weitere Verkürzung, bei der beide ‚coiled-coil‘ Domänen vollständig entfernt wurden, konnte nicht stabil exprimiert werden. Zur Kontrolle wurde einerseits Wildtyp Su_e ($Su_{e_{wt}}$) kloniert und in der Deletionsmutante exprimiert, andererseits wurde, um gleiche Wachstumsbedingungen zu ermöglichen, der leere Vektor in die Deletionsmutanten Δsu_e , Δsu_g und Δsu_k transformiert. Die drei Untereinheiten e , g und k kommen spezifisch in der dimeren/oligomeren Form der F_1F_0 -ATP Synthase vor, jedoch sind nur Su_e und Su_g für die Suprakomplexbildung notwendig.

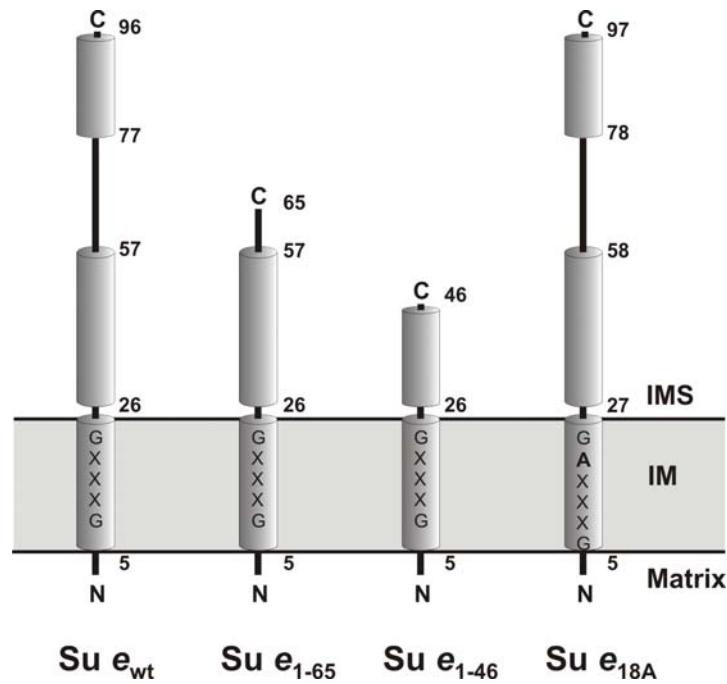


Abb. 3.1.1: **Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.** Diese Varianten von *Su e* wurden in den pYX242 Vektor kloniert und in der Deletionsmutante $\Delta su e$ exprimiert. Die „coiled-coil“-Motive sowie der Transmembranbereich mit dem GXXXG-Motiv wurden als Zylinder dargestellt.

Die Transformation des Wildtyp-Konstruktes (*Su e_{wt}*) in die Deletionsmutante konnte den Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen vollständig komplementieren, daher wurde dieser Stamm als Wildtyp-Kontrolle in den weiteren Experimenten verwendet. Die Expression der verschiedenen Konstrukte in der Deletionsmutante wurden mittels Western-Blot überprüft. Alle vier Konstrukte konnten mit dem polyklonalen *Su e*- Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2). Lediglich das Signal von *Su e₁₋₄₆* war stark reduziert, was sich durch das teilweise Fehlen des Epitops erklären lässt, gegen die der *Su e*-Antikörper gebildet worden war (Aminosäuren 21-65 der Untereinheit *e*).

Die Untereinheiten *e* und *g* stabilisieren sich wechselseitig im Dimer-Komplex. Ohne die stabilisierende Wirkung der Untereinheiten aufeinander kommt es zum schnellen Abbau dieser Untereinheiten. Anhand dieser Abhängigkeit der Untereinheiten voneinander kann über die Proteinmenge eines der Proteine auf die Stabilität, die Proteinmenge und die Funktionalität der anderen Untereinheit geschlossen werden. Bei den Teildeletionen (*Su e₁₋₆₅* und *Su e₁₋₄₆*) wurden Wildtyp ähnliche Mengen an *Su g* detektiert. Entsprechend funktionelle *Su e₁₋₄₆*-Proteinmengen sind in diesem Stamm vorhanden (Abb. 3.1.2) (Arnold et al., 1998). Dagegen führte die Expression der Insertionsmutante *Su e_{18A}* oder das vollständige Fehlen der Untereinheit *e* zu keiner Stabilisierung der Untereinheit *g*. Dies zeigt die Relevanz der Transmembrandomäne für die Stabilisierung von *Su g* (Arselin et al., 2003). Zur Kontrolle der aufgetragenen

Proteinmenge wurde mit Antikörpern gegen den ADP/ATP-Transporter (Aac2) dekoriert (Abb. 3.1.2). Zusammengefasst zeigt sich, dass alle Konstrukte ausreichend exprimiert und auch die teildeletierten Varianten (Su e_{1-65} und Su e_{1-46}) in Bezug auf die stabilisierende Funktion von Su g funktionell sind.

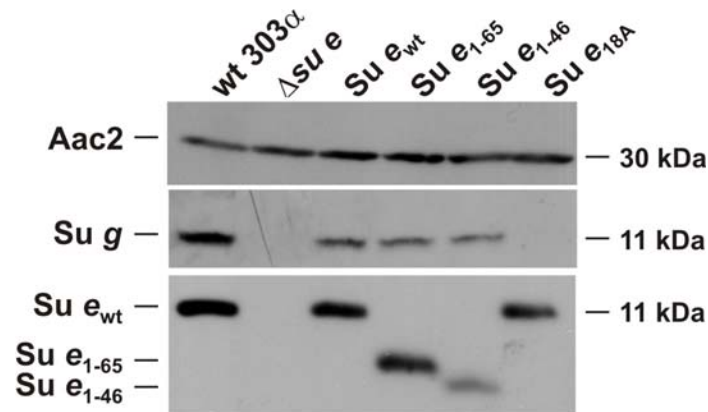


Abb. 3.1.2: **Proteinmengen der verschiedenen Konstrukte in der Deletionsmutante $\Delta su e$.** Die Expression der Su e -Konstrukte wurden über SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion gezeigt. Die Konstrukte zeigen durch die Stabilisierung der Untereinheit g ihre Funktionalität. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde gegen den ADP/ATP-Transporter dekoriert (Aac2).

3.1.2 Funktion der ‚coiled-coil‘-Domäne und der Transmembran-domäne von Su e bei der Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase

Die Untereinheit g wird in den Zellen stabilisiert, die die verkürzten Su e - Konstrukte Su e_{1-65} und Su e_{1-46} exprimieren, ob jedoch auch die Dimerisierung und Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase in diesen Mutanten verändert ist, war unklar. Zur Untersuchung der Stabilität der Suprakomplexe wurden isolierte Mitochondrien unter nativen Bedingungen mit Digitonin solubilisiert und die Komplexe in einem BN-Gel der Größe nach aufgetrennt. Um die Stabilität der Suprakomplexe zu untersuchen, wurden die Mitochondrien mit unterschiedlichen Protein/Detergenz (Digitonin)-Verhältnissen solubilisiert. Anschließend wurden die F_1F_0 -ATP Synthase-Komplexe über Kalziumphosphat-Präzipitation im Gel sichtbar gemacht. Beim Wildtyp waren deutliche Banden, die die dimere- (D) und oligomere-Form (O) der F_1F_0 -ATP Synthase repräsentieren, sichtbar (Abb. 3.1.3). Diese waren in der Deletionsmutante, $\Delta su e$, nicht zu erkennen. Die Insertionsmutante Su e_{18A} wies sehr geringe Mengen der dimeren-Form auf, entsprechend früherer Berichte (Arselin et al., 2003). Bei Expression von Su e_{1-65} und Su e_{1-46} konnten geringe Mengen an Dimeren und Oligomeren der F_1F_0 -ATP Synthase nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass diese eine geringere Stabilität aufweisen, als dies beim Wildtyp der Fall war. Demnach ist die Stabilität der Suprakomplexe proportional zur Länge der ‚coiled-coil‘-Domänen innerhalb der

3 Ergebnisse

Untereinheit e. Hauptsächlich trägt die Transmembrandomäne mit dem Dimerisierungsmotiv GXXXG zur Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase-Suprakomplexe bei.

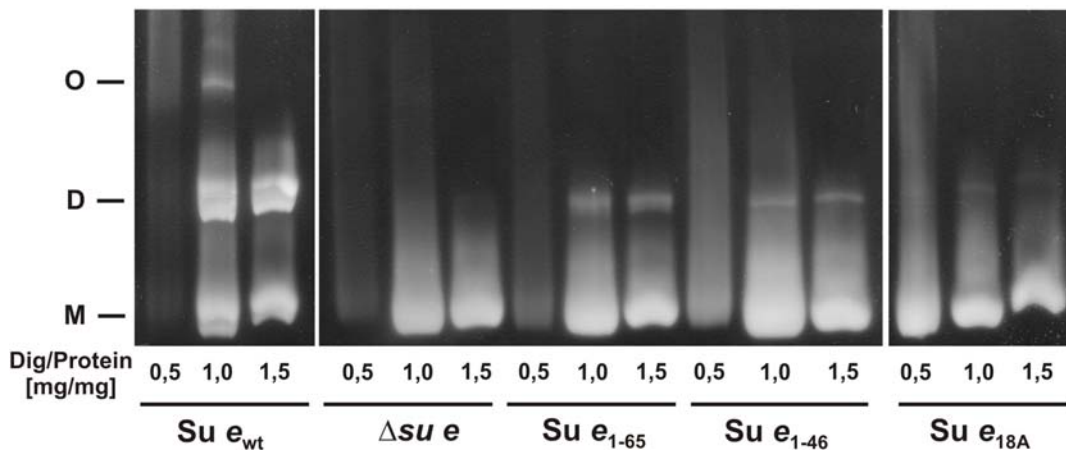


Abb. 3.1.3: Die Stabilität der Dimere und Oligomere der F_1F_0 -ATP Synthase hängt sowohl vom Dimerisierungsmotiv GXXXG in der Transmembrandomäne als auch von den ‚coiled-coil‘-Segmenten der Untereinheit e ab. Isolierte Mitochondrien der verschiedenen Stämme wurden mit steigendem Verhältnis von Detergenz zu Protein (w/w) unter nativen Bedingungen solubilisiert und mit BN-PAGE analysiert. Die ATP-Synthase Komplexe (Monomere (M), Dimere (D) und Oligomere (O)) wurden durch Kalziumphosphat-Fällung im Gel sichtbar gemacht.

3.1.3 Reduzierte Stabilität der Suprakomplexe korreliert mit einer erhöhten Abbaurate von Su g *in vivo*

Die Stabilitäten von Untereinheiten eines Komplexes korrelieren oft mit der Gesamtstabilität des Komplexes. Daher könnte die reduzierte Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase Suprakomplexe zu reduzierter Stabilität der Dimer-spezifischen Untereinheiten führen. Um die Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase Untereinheiten näher zu untersuchen, wurden die Stämme mit den unterschiedlichen Su e-Konstrukten (Su e_{wt}, Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆) in der exponentiellen Phase mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid inhibiert die Neusynthese von Proteinen, so dass die Stabilität bzw. die Umsatzrate verschiedener Proteine mit der Zeit nach der Zugabe verfolgt werden kann. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cycloheximid wurden den Kulturen Proben entnommen und der Gesamtzellextrakt über SDS-PAGE und Westernblotting analysiert (Abb. 3.1.4). Als Indikator für die Stabilität der Suprakomplexe wurde die Untereinheit g gewählt und deren Menge in den Gesamtzellextrakten über die Zeit in den verschiedenen Stämmen verfolgt. Zum Vergleich wurde die Stabilität der Untereinheit 4 der F_1F_0 -ATP Synthase untersucht. Bereits nach zwei Stunden war die Proteinmenge von Su g in der Su e₁₋₄₆-Mutante drastisch reduziert. Die Abbaurate von Su g im Stamm, der Su e₁₋₆₅ exprimiert, war gering, während im Wildtyp kein Abbau festzustellen war. Die Untereinheit 4 war in keinem der Stämme von der Cycloheximid-Behandlung betroffen. Damit weisen die ‚coiled-coil‘-Domänen auch *in vivo* einen zusätzlichen stabilisierenden Effekt auf die Dimer spezifische Untereinheit g auf.

Weiterhin legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass in den Mutanten, die eine verminderte Stabilität der Suprakomplexe aufweisen, die Anordnung der F_1F_0 -ATP Synthase Dimere und Oligomere verändert oder dynamischer ist, da die Untereinheit g für Proteasen leichter zugänglich ist als im Wildtyp.

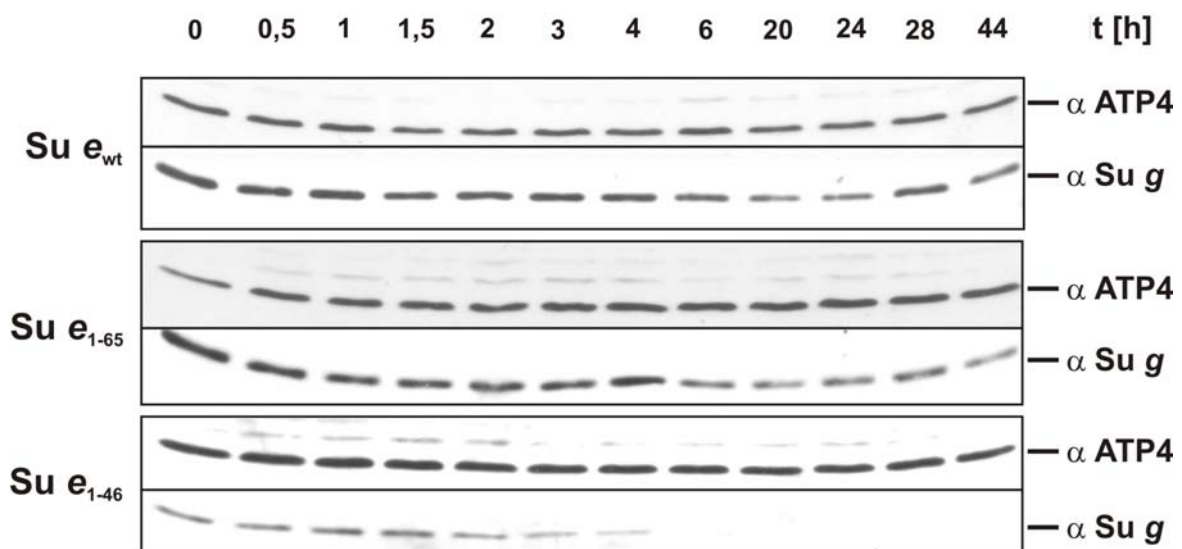


Abb. 3.1.4: **Die Stabilität der Untereinheit g ist von den ‚coiled-coil‘-Domänen der Untereinheit e abhängig.** Untersucht wurde der Proteingehalt der F_1F_0 -ATP Synthase Untereinheiten g und 4 in den $Su e_{wt}$, $Su e_{1-65}$ und $Su e_{1-46}$ exprimierenden Stämmen nach Cycloheximid-Behandlung. Die Zellen wurden bei 30°C in selektivem Flüssigmedium angezogen und mit $100\ \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und gleiche Mengen des Gesamtzellextraktes über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. In Abhängigkeit zur Größe der verbleibenden ‚coiled-coil‘-Domänen kam es zu einem beschleunigten Abbau der dimer-spezifischen Untereinheit g .

3.1.4 Die Wachstumsgeschwindigkeit ist reduziert in Stämmen mit verringerter Stabilität der Suprakomplexe

Um die Funktion der Untereinheit $Su e$ bei der Dimerisierung und Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase besser zu verstehen, wurde der Einfluss der Suprakomplexbildung auf die Wachstumseigenschaften und das mitochondriale Membranpotential der verschiedenen Stämme untersucht. Zum einen wurde die maximale Verdopplungsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase der Kultur und zum anderen die maximal erreichbare Zelldichte in der stationären Phase ermittelt. Die Verdopplungszeiten spiegeln dabei die Geschwindigkeit des Substratumsatzes von Laktat wider, während die maximale Zelldichte ein Maß für die effiziente Nutzung des Substrates darstellt. Bei keinem der getesteten Stämme konnten signifikante Unterschiede in der maximalen Zelldichte festgestellt werden. Folglich konnte die

3 Ergebnisse

gesamte Energie, die im Medium vorhanden war, für den Aufbau von Zellmasse genutzt werden.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Deletionsmutanten $\Delta su e$, $\Delta su g$ sowie der Insertionsmutante $Su e_{18A}$ waren dagegen auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle drastisch reduziert im Vergleich zum Wildtyp $Su e_{wt}$ oder der Deletionsmutante $\Delta su k$, deren Suprakomplex-Bildung nicht beeinflusst ist (Abb. 3.1.5).

Die Deletionen der ‚coiled-coil‘-Domänen führten zu Wachstumsraten, die kleiner als der Wildtyp, aber größer als im Fall der vollständigen Deletion von $Su e$ waren. Das Ausmaß der Erhöhung der Verdopplungszeiten war umso größer, umso mehr von den ‚coiled-coil‘-Domänen der Untereinheit e deletiert war. Der Einfluss der ‚coiled-coil‘-Domänen auf die Verdopplungszeiten bei 30 °C nahm mit steigender Temperatur (37 °C) deutlich zu. Zusammengefasst hat die Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase Suprakomplexe einen Effekt auf die Umsatzgeschwindigkeit, jedoch keinen Einfluss auf die effiziente Nutzung des Substrats.

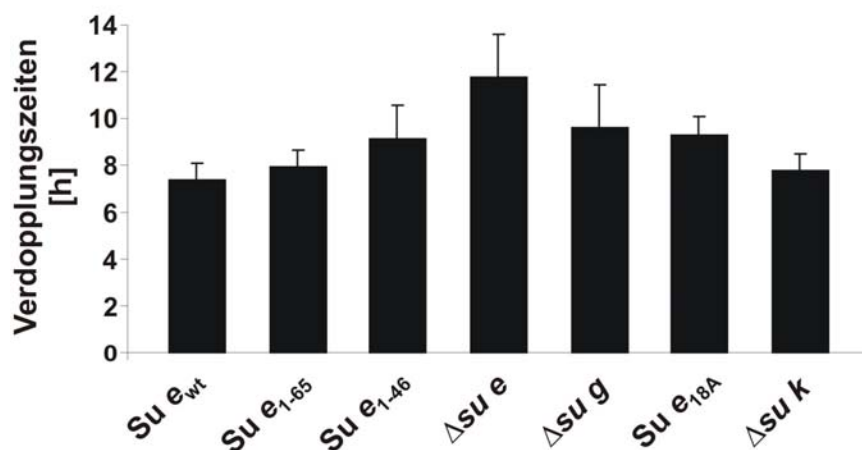


Abb. 3.1.5: Die Wachstumsgeschwindigkeit ist stark reduziert in Stämmen, die eine geringere Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase Oligomere aufweisen. Die Verdopplungszeiten der einzelnen Stämme wurden in selektivem Flüssigmedium (SLaktat) in der exponentiellen Wachstumsphase bei 30 °C durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm ermittelt. Für jeden Stamm sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.1.5 Mitochondriales Membranpotential ist reduziert bei Stämmen mit destabilisierten Oligomeren der F_1F_0 -ATP Synthase

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit in den Stämmen mit veränderter Suprakomplex-Stabilität ist ein reduzierter Substratumsatz durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Um dies zu untersuchen, wurde zunächst das Membranpotential in isolierten Mitochondrien der verschiedenen Mutanten ermittelt. Der verwendete kationische Farbstoff Rhodamin 123 wird membranpotentialabhängig in die Mitochondrien aufgenommen. Durch die Anreicherung des Farbstoffes kommt es zu einem ‚quenching‘-Effekt des Emissionsspektrums, so dass eine dem Membranpotenzial proportionale Abnahme der Fluoreszenz (ΔF) photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der Grundfluoreszenz wird das Membranpotential durch Zugabe von KCN, das die Atmungskette (Komplex IV) hemmt, aufgehoben, und es kommt wieder zur Freisetzung des Farbstoffs aus der Matrix. Eine vollständige Entkopplung mit CCCP führte nicht zu einer Steigerung der Farbstofffreisetzung. Da diese Methode sehr empfindlich auf kleine Unterschiede in der eingesetzten Farbstoffmenge reagiert, wurden diese durch Normierung des Fluoreszenzunterschieds auf die maximale Fluoreszenz kompensiert ($\Delta F/F$).

Zur Messung wurden isolierte Mitochondrien in isotonischem Puffer suspendiert, der bereits den Farbstoff Rhodamin 123 enthielt (1). Die daraufhin erkennbare geringe Abnahme der Fluoreszenz ist auf Lichtstreuung und residuales Membranpotential der Mitochondrien zurückzuführen. Zum vollständigen Aufbau eines Membranpotentials wurde Ethanol als Substrat für die Atmungskette zugegeben (2). Nach Erreichen des Maximalwertes wurde die Atmungskette (Cytochrom *c* Oxidase) durch Zugabe von KCN inhibiert (3) und das Membranpotential wurde aufgehoben (Abb. 3.1.6).

Alle Stämme, die einen Defekt in der Dimerisierung/Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase aufgewiesen hatten, zeigten ein stark reduziertes Membranpotential im Vergleich mit dem Wildtyp. Die ermittelten Werte lagen zwischen 32,5 % ($\Delta su e$) und 59,6 % ($Su e_{18A}$) des für den Wildtyp ($Su e_{wt}$) gemessenen $\Delta F/F$ -Wertes. Bei den isolierten Mitochondrien aus den $Su e_{1-46}$ und $Su e_{1-65}$ exprimierenden Stämmen konnten Fluoreszenzunterschiede von 51,4 % bzw. 65,6 % des Wildtyps ermittelt werden. Zur Kontrolle wurde das Membranpotential von Mitochondrien der Deletionsmutante $\Delta su k$, einer dimerspezifischen Untereinheit der F_1F_0 -ATP Synthase, die jedoch nicht für die Dimerisierung/Oligomerisierung nötig ist, gemessen. Diese Mutante zeigte jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp keine Reduktion des Membranpotentials.

3 Ergebnisse

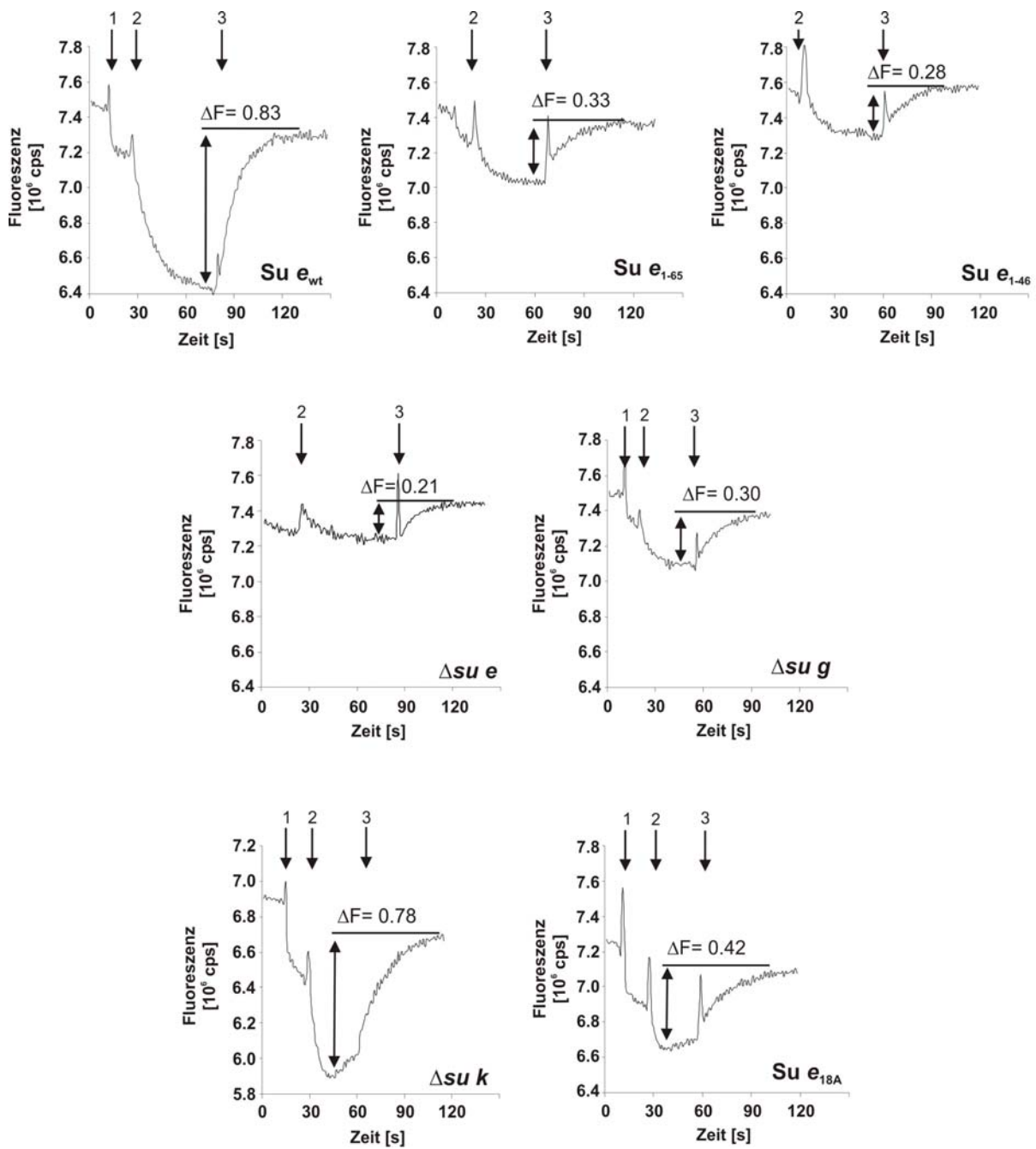


Abb. 3.1.6: Das mitochondriale Membranpotential ist stark reduziert in den Mutanten, die eine veränderte Suprakomplex-Bildung der F_1F_0 -ATP Synthase aufweisen. Das Membranpotential wurde anhand der spezifischen Fluoreszenz-Abnahme (ΔF), durch die membranpotentialabhängige Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin123 ermittelt. Für die Messungen wurden frisch isolierte Mitochondrien verwendet. Die Stämme wurden für die Präparation auf selektivem Flüssigmedium (SLaktat) bei 30 °C angezogen. 150 μg Mitochondrien wurden in isotonischem Puffer mit dem Fluoreszenzfarbstoff suspendiert (1). Anschließend wurde zum Aufbau des Membranpotentials Ethanol als Substrat zugegeben (2). Nachdem eine maximale Fluoreszenz-Abnahme erreicht worden war, wurde das Membranpotential durch Zugabe von KCN (3) wieder vollständig abgebaut. Der vollständige Abbau wurde durch Zugabe von CCCP (nicht gezeigt) bestätigt. Die Differenz aus der maximalen Fluoreszenz und dem Wert der geringsten Fluoreszenz (maximale Abnahme) spiegelt die Höhe des unter diesen Bedingungen maximalen Membranpotentials wider.

Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurde das Membranpotential zusätzlich mit einem weiteren kationischen Fluoreszenzfarbstoff (DiSC₃) bestimmt und die membranpotentialabhängige Abnahme der Fluoreszenz von bis zu fünf unabhängigen Mitochondrienpräparationen gemessen. Auch mit diesem Farbstoff wurden die Ergebnisse der zuvor gefundenen reduzierten maximalen Membranpotentiale bei den Mutanten, bei denen die Oligomerisierung der F₁F₀-ATP Synthase verändert ist, bestätigt (Abb. 3.1.7; Tab. 3.1.1). Mit diesem Farbstoff ergab sich ein $\Delta F/F$ -Wert für $\Delta su e$, der lediglich 51,4 % des beim Wildtyp gemessenen Wertes erreichte. Die Teildeletionen zeigten mit 82,2 % (Su e₁₋₆₅) und 68,8 % (Su e₁₋₄₆) des Wildtyps Stabilitätsabhängig gestaffelte Membranpotentiale. Die Absolutwerte sind relativ zu dem anderen Farbstoff leicht erhöht, was vermutlich auf unterschiedliche Eigenschaften der Farbstoffe zurückzuführen ist. Die relative Reduktion des Membranpotentials der verschiedene Su e-Konstrukte war sowohl vom Farbstoff als auch von der eingesetzten Proteinkonzentration weitestgehend unabhängig (Abb. 3.1.7).

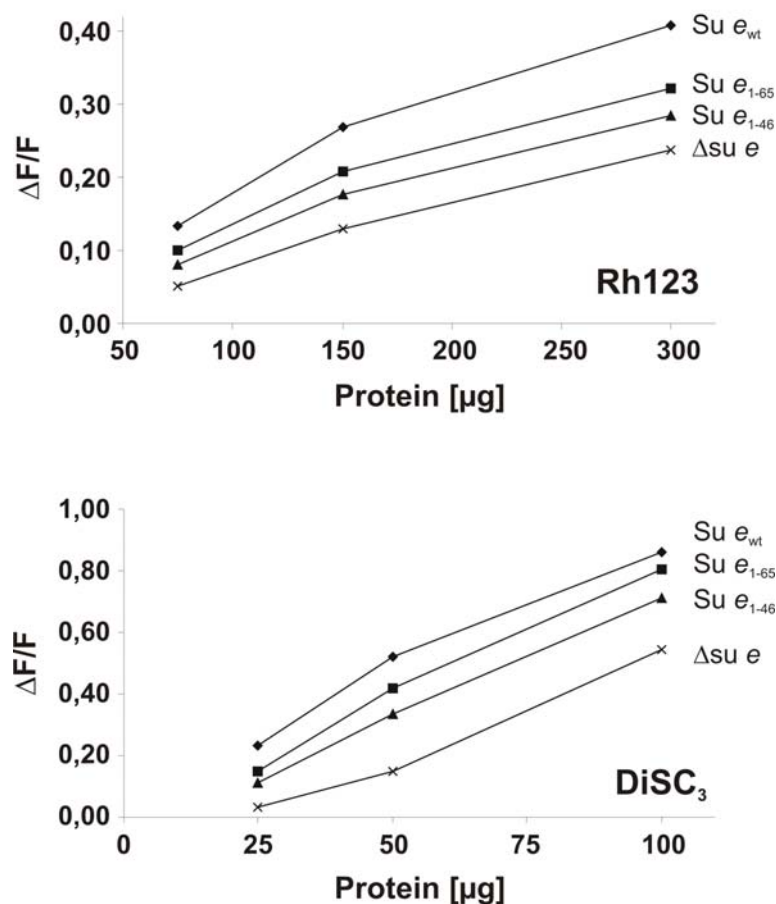


Abb. 3.1.7: Die gemessenen Membranpotential-Unterschiede sind unabhängig von der eingesetzten Proteinmenge. Die $\Delta F/F$ -Werte der angegebenen Stämme wurden jeweils bei drei verschiedenen Proteinmengen ermittelt.

3 Ergebnisse

	Su e _{wt}	Su e ₁₋₆₅	Su e ₁₋₄₆	Δsu e	Su e _{18A}	Δsu g
Membranpotential (ΔΨ) (ΔF/F in % von Wildtyp) mit R123	100 (n=2)	65,6 (n=2)	51,4 (n=2)	32,5 (n=2)	59,6	56,7
Membranpotential (ΔΨ) (ΔF/F in % von Wildtyp) mit DiSC ₃	100 (n=5)	82,2 ± 13,5 (n=5)	68,8 ± 14,5 (n=5)	51,6 ± 16,6 (n=5)	n.d.	n.d.

Tab.3.1.1: **Mutanten der F₁F₀-ATP Synthase Oligomerisierung weisen reduzierte Membranpotentiale auf.** Die ΔF/F-Werte von bis zu fünf unabhängigen Mitochondrienpräparationen wurden bei gleichen Proteinmengen ermittelt und ein Durchschnitt für den jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoff gebildet.

3.1.6 Reduktion des Membranpotentials oder verlängerte Verdopplungszeiten sind nicht durch den Verlust von mtDNA bedingt

Eine der Erklärungen für eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen kann ein erhöhter Anteil an Tochterzellen sein, die ihre mitochondriale DNA (mtDNA) vollständig (rho⁰) oder teilweise (rho⁻) verloren haben. Mit der mtDNA verlieren diese Zellen die Fähigkeit, auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen, da sie keine funktionsfähige Atmungskette für die Produktion von ATP mehr besitzen.

Um die Tendenz des mtDNA-Verlustes zu ermitteln, wurden 150-250 Zellen einer exponentiell wachsenden Laktat-Flüssigkultur auf eine Glycerin-Agar-Platte verteilt. Zusätzlich enthielt das Agar-Medium 0,1% Glukose, so dass alle Zellen zu kleinen Kolonien wachsen konnten. Kolonien, die aus einer rho^{0/-}-Zelle hervorgegangen waren stellten jedoch das Wachstum, nachdem die Glukose aufgebraucht war, ein. Es entstehen kleine Kolonien, die einer rho⁻⁰-Zelle entstammen und große Kolonien, die aus einer Zelle mit vollständiger mtDNA hervorgegangen sind. Anhand des Größenunterschieds ließ sich die genaue Anzahl der rho^{0/-}-Zellen der Flüssigkultur ermitteln.

In den Stämmen, Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆, wird ein dem Wildtyp ähnlich geringer Verlust an mtDNA beobachtet (Abb. 3.1.8). Dagegen weist die Insertionsmutante Su e_{18A} eine ungewöhnlich große Tendenz zur rho^{0/-}-Bildung auf. Aufgrund des wildtypähnlichen geringen Anteils an rho^{0/-}-Zellen in den Kulturen der Teildeletionen Su e₁₋₄₆ und Su e₁₋₆₅ kann dieser nicht verantwortlich sein für die erhöhten Verdopplungszeiten und das verringerte Membranpotential in diesen Stämmen, sondern muss auf andere Faktoren zurückzuführen sein.

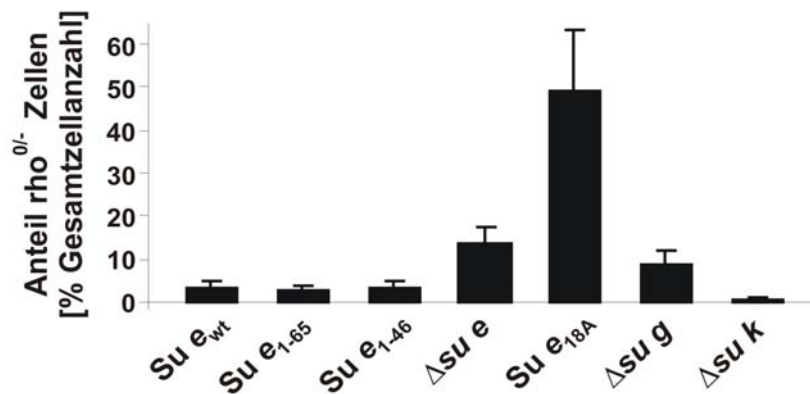


Abb. 3.1.8: Die Reduktion des Membranpotentials sowie die erhöhten Verdopplungszeiten der Teildeletionen Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆ lassen sich nicht durch den Verlust der mtDNA erklären. Der prozentuale Anteil an Zellen einer exponentiellen Flüssigkultur (SLaktat), die ihre mtDNA teilweise oder ganz verloren haben, wurde ermittelt. Dazu wurden 150-250 Zellen auf selektiven Glycerin-Agar-Platten mit 0,1% Glukose ausgestrichen. Nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurde der Anteil der kleinen (Petit) Kolonien an der Gesamtkolonienzahl bestimmt. Für jeden Stamm sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.1.7 Su e-Mutanten weisen ein tubuläres Netzwerk der Mitochondrien auf

Das tubuläre Netzwerk der Mitochondrien wird durch im Gleichgewicht stehende Fusions- und Teilungsprozesse aufrechterhalten. Überwiegt der eine oder der andere Prozess, so kommt es zu fragmentierten bzw. extensiv fusionierten ('fischernetzartig' gestalteten) Mitochondrien (Shaw and Nunnari, 2002). Der Fusionsprozess ist vom ATP-Gehalt der Mitochondrien und vom Membranpotential abhängig (Legros et al., 2002), (Meeusen et al., 2004). Ob das beobachtete Ausmaß der Reduktion des Membranpotentials die Morphologie der Mitochondrien in den Teildeletionen (Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆) und der Deletionsmutante (Δsu e) beeinflusst, wurde untersucht. Erste Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B-Hexylester, das membranpotentialabhängig in die Mitochondrien aufgenommen wird, konnten aufgrund inhomogener und teilweise diffuser Färbungen des mitochondrialen Netzwerkes bei den Deletionsmutanten Δsu e und Δsu g nicht ausgewertet werden (nicht gezeigt). Jedoch deutet die geringe, diffuse Färbung auf ein verringertes Membranpotential auch *in vivo* hin. Eine gleichmäßigere Färbung der Mitochondrien wurde erzielt durch die Expression eines Matrix-lokalisierten GFP (mtGFP) (Westermann and Neupert, 2000). Die Stämme wurden unter gleichen Bedingungen in selektivem Laktat-Flüssigmedium angezogen und 200 Zellen entsprechend ihrer mitochondrialen Morphologie in tubulär und fragmentiert kategorisiert (Abb. 3.1.9). Die Einteilung der Zellen in die verschiedenen Klassen erfolgte ohne Kenntnis des jeweiligen Stammes. Es konnten jedoch keine

Unterschiede in der mitochondrialen Morphologie bei den verschiedenen *Su e*-Mutanten festgestellt werden. Die Suprakomplex-Bildung hat keinen Effekt auf das mitochondriale Netzwerk.

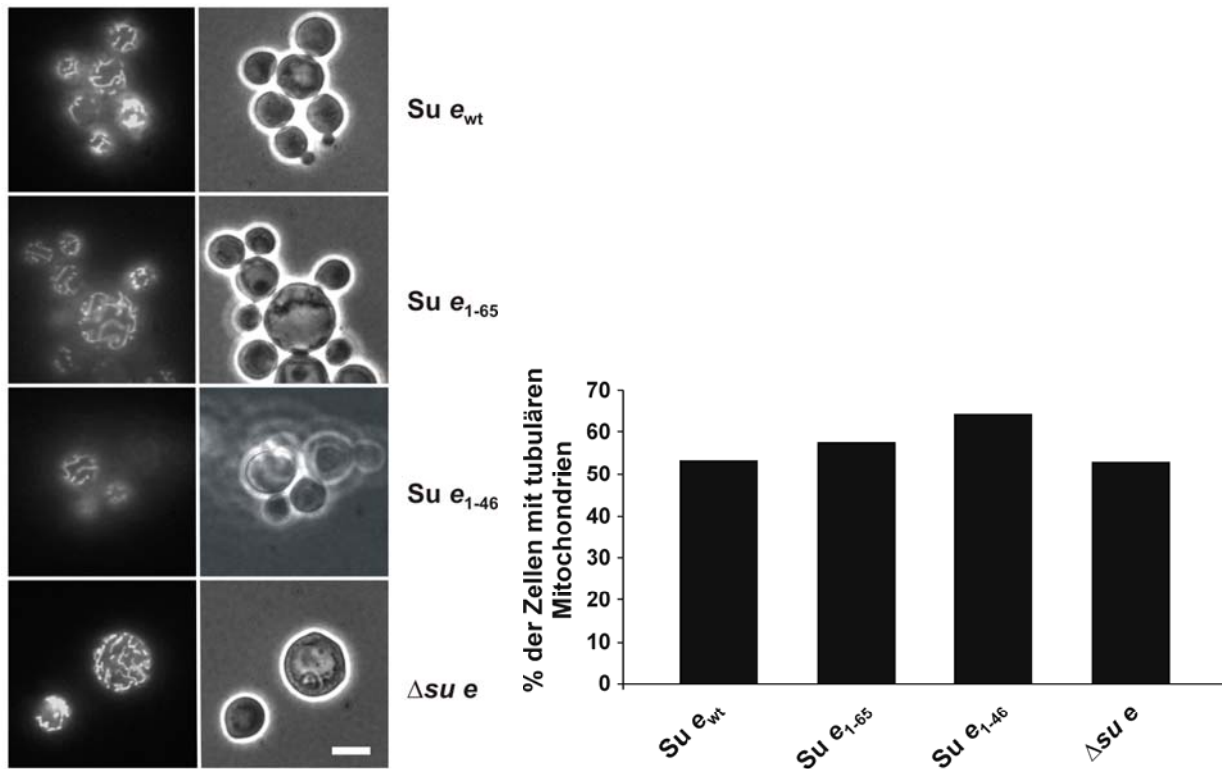


Abb. 3.1.9: **Das tubuläre Netzwerk der Mitochondrien in den verschiedenen *Su e*-Mutanten ist nicht verändert.** Zum Anfärben der Mitochondrien wurde in den angegebenen Stämmen ein Matrix-lokalisiertes GFP (mtGFP) exprimiert und mit Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet. Jeweils 200 Zellen wurden in zwei Kategorien, fragmentierte und tubuläre Mitochondrien eingeteilt. Die Auszählung erfolgte ohne Kenntnis des jeweils untersuchten Stammes. Der Balken entspricht 5 μm .

3.1.8 Die Cristaestrukturen in den Teildeletionen der Untereinheit *e* entsprechen denen des Wildtyps

Die Ausbildung eines ATP-Synthase Suprakomplexes ist notwendig für die normale Ultrastruktur der Mitochondrien (Paumard et al., 2002), (Soubannier et al., 2002), (Arselin et al., 2003). In elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen war festgestellt worden, dass die Mitochondrien der Deletionsmutanten $\Delta su e$ und $\Delta su g$ sowie der Insertionsmutante *Su e_{18A}* keine Cristaestrukturen haben, sondern die Membranen (AM und IM) eine Art Zwiebelmuster aufweisen (Paumard et al., 2002). Weiterhin konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Stabilität der Oligomere aufgrund der Deletionen der ‚coiled-coil‘-Domänen in *Su e* betroffen sind. Anhand von EM-Aufnahmen der vier *Su e*-Stämme wurden daher die Auswirkungen der verringerten Stabilität auf die Ultrastruktur untersucht (Abb. 3.1.10).

Der $Su e_{1-65}$ exprimierende Stamm zeigte keine Veränderungen in seiner Ultrastruktur im Vergleich mit dem Wildtyp. Auch die Deletion der C-terminalen 51 Aminosäuren ($Su e_{1-46}$) zeigte in der Regel normale Cristastrukturen. Nur wenige Zellen (<10 %) wiesen Zwiebelstrukturen auf, wie sie bei der Deletionsmutante auftraten ($\Delta su e$). Dieser Anteil kann auf eine geringere Expression in einzelnen Zellen zurückgeführt werden. Anhand der EM-Aufnahmen sind die ‚coiled-coil‘-Domänen von $Su e$ nicht notwendig für die Ausbildung der Cristastrukturen.

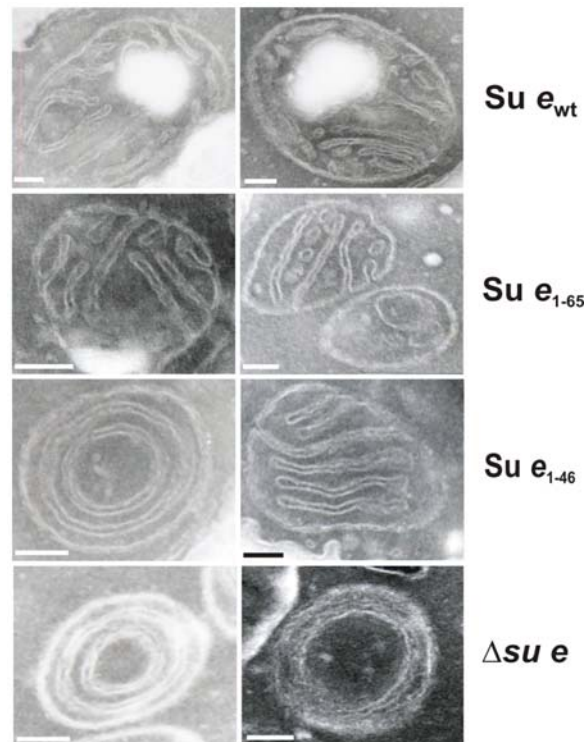


Abb. 3.1.10: Die Ultrastruktur der Cristae ist in den Stämmen, die die Konstrukte $Su e_{1-65}$ und $Su e_{1-46}$ exprimierten, im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Die verschiedenen Hefestämme wurden in selektivem Flüssigmedium (SLaktat) in der exponentiellen Phase angezogen, bevor die Zellen chemisch mit Formaldehyd (4 %) und Glutaraldehyd (0,5 %) fixiert und transmissions-elektronen-mikroskopisch (TEM) untersucht wurden. Der Balken entspricht 100 nm.

3.1.9 Effekte der ‚coiled-coil‘-Deletionen auf die Aktivitäten der OXPPOS-Komplexe und die Integrität der inneren Membran

Ein verringertes Membranpotential kann durch geringere enzymatische Aktivitäten, der daran beteiligten Komplexe oder aufgrund von unkontrolliertem Protonentransport über die Innenmembran (Entkopplung) entstehen. Um die am Aufbau beteiligten Komplexe näher zu untersuchen, wurden die enzymatischen Aktivitäten der F_1F_0 -ATP Synthase, der Cytochrom *c* Oxidase sowie die maximale Atmungsaktivität gemessen. Zusätzlich wurde der Gehalt an Cytochromen in isolierten Mitochondrien ermittelt.

3 Ergebnisse

Zur Bestimmung der Funktionalität der F_1F_0 -ATP Synthase wurde deren ATP-Hydrolyse-Aktivität bestimmt. Es konnten keine veränderten F_1F_0 -ATPase Aktivitäten bei den verschiedenen Su e-Mutanten ermittelt werden (Abb. 3.1.11). Eine funktionelle Notwendigkeit der Oligomerisierung scheint daher für die ATP-Synthese/Hydrolyse-Aktivität der F_1F_0 -ATP Synthase nicht gegeben.

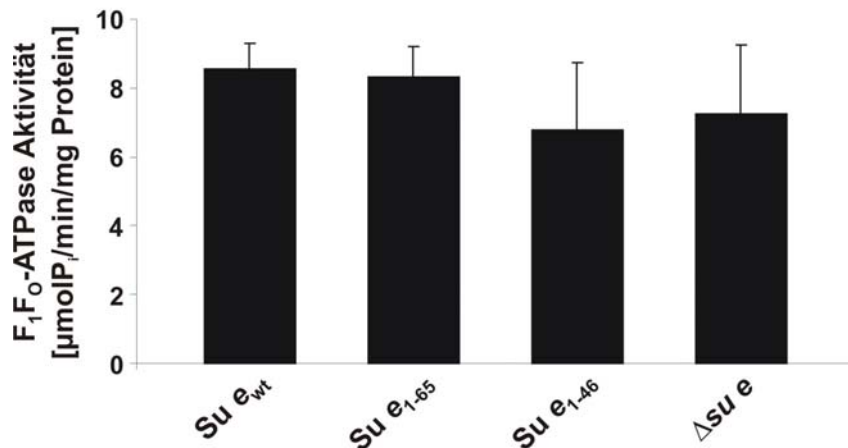


Abb. 3.1.11: Die Hydrolyse-Aktivität der F_1F_0 -ATP Synthase wird durch die Deletionen der ‚coiled-coil‘-Domänen nicht beeinflusst. Die Oligomycin-sensitive Hydrolysegeschwindigkeit von ATP wurde anhand von fünf unabhängigen Mitochondrien-Präparationen ermittelt. Es konnten keine signifikanten Aktivitäts-Unterschiede bei den getesteten Stämmen ermittelt werden. Für jeden Stamm sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität (Komplex IV) wurde mit zwei verschiedenen Messmethoden an isolierten Mitochondrien ermittelt. Zum einen wurde die Aktivität direkt über die Oxidation von Cytochrom *c* gemessen und zum anderen über den Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von Ascorbat/TMPD. Bei letzterem werden die Elektronen des Ascorbat über TMPD auf Cytochrom *c* übertragen, welches dann über die Cytochrom *c* Oxidase die Elektronen auf Sauerstoff überträgt. Mit beiden Methoden konnten bei den Mitochondrien aus Zellen, die die ‚coiled-coil‘-Teildeletionen (Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆) exprimierten nur eine geringe Reduktion gegenüber der Wildtyp-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3.1.12; Tab. 3.1.2). Dagegen zeigte die Deletionsmutante $\Delta\text{su e}$ eine signifikante Reduktion der Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität bei beiden Messmethoden. Letzteres kann jedoch mit dem unter diesen Wachstumsbedingungen festgestellten, hohen Anteil an rho⁰-Zellen erklärt werden, da Untereinheiten (Cox1, Cox2 und Cox3) der Cytochrom *c* Oxidase auf der mtDNA kodiert sind.

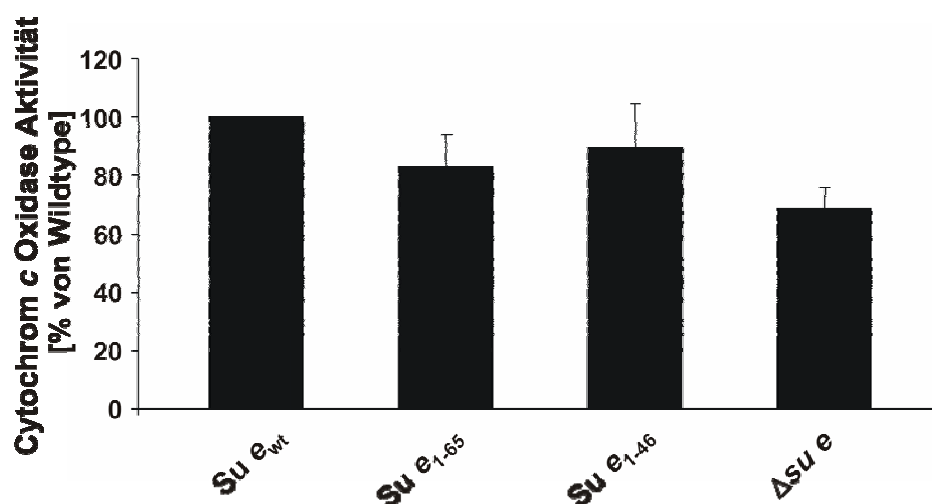


Abb. 3.1.12: Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase wird durch die Deletion der ‚coiled-coil‘-Domänen von Su e nicht signifikant beeinflusst. Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität wurde anhand von vier unabhängigen Mitochondrienpräparationen gemessen. Es konnte lediglich eine leichte Reduktion der Aktivität der aus dem Deletionsstamm ($\Delta su e$) gewonnenen Mitochondrien festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Reduktion könnte der beobachtete Verlust der mtDNA sein. Die Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆ exprimierenden Stämme wiesen nur eine leicht verminderte Cytochrom c Oxidase-Aktivität auf. Für jeden Stamm sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

	Su e _{wt}	Su e ₁₋₆₅	Su e ₁₋₄₆	Δsu e	Su e _{18A}	Δsu g
O ₂ -Verbrauch nach Ascorbat/TMPD-Gabe (% von Wildtyp)	100 (n=2)	86 (n=2)	85 (n=2)	76 (n=2)	n.d.	n.d.

Tab. 3.1.2: Die ‚coiled-coil‘-Deletionen haben einen geringen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien. Mit isolierten Mitochondrien aus den angegebenen Stämmen wurde der Sauerstoffverbrauch nach Ascorbat/TMPD-Gabe ermittelt. Die Sauerstoffumwandlung der Mitochondrien mit den Su e₁₋₆₅- und Su e₁₋₄₆-Konstrukten fiel nur etwas geringer aus als im Wildtyp. Die Deletionsmutante ($\Delta su e$) ist dagegen deutlich betroffen. Dies lässt sich auf den teilweisen Verlust der mtDNA im Deletionsstamm zurückführen.

Anhand des Cytochromgehaltes kann indirekt auf den entsprechenden Komplexgehalt geschlossen werden. Daher wurde der Gehalt an den Cytochromen a/a_3 , b_L/b_H und c/c_1 der isolierten Mitochondrien gemessen (Abb. 3.1.13). Der Gehalt an Cytochrom b_L/b_H und $(c)/c_1$, Kofaktoren des Komplexes III, waren in keiner der Mutanten (Su e₁₋₆₅, Su e₁₋₄₆ oder $\Delta su e$) signifikant betroffen. Bei den Kofaktoren a/a_3 , Komplex IV, wies nur die Deletionsmutante $\Delta su e$, einen geringeren Gehalt auf. Der Gehalt an Cytochrom a/a_3 in den Stämmen Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆ war dagegen leicht erhöht. Eine solche geringe Erhöhung an Cytochromen kann vermutlich bei Mutanten mit betroffener Atmungskette, als Folge der Rückkopplungsregulation, beobachtet werden. Trotz eines leicht erhöhten Cytochrom a/a_3 -Gehaltes in Kombination mit einer nicht signifikanten Reduktion der Cytochrom c Oxidase-Aktivität kann anhand dieser

3 Ergebnisse

Ergebnisse ein Effekt der ‚coiled-coil‘-Deletionen auf die Cytochrom c Oxidase nicht ausgeschlossen werden.

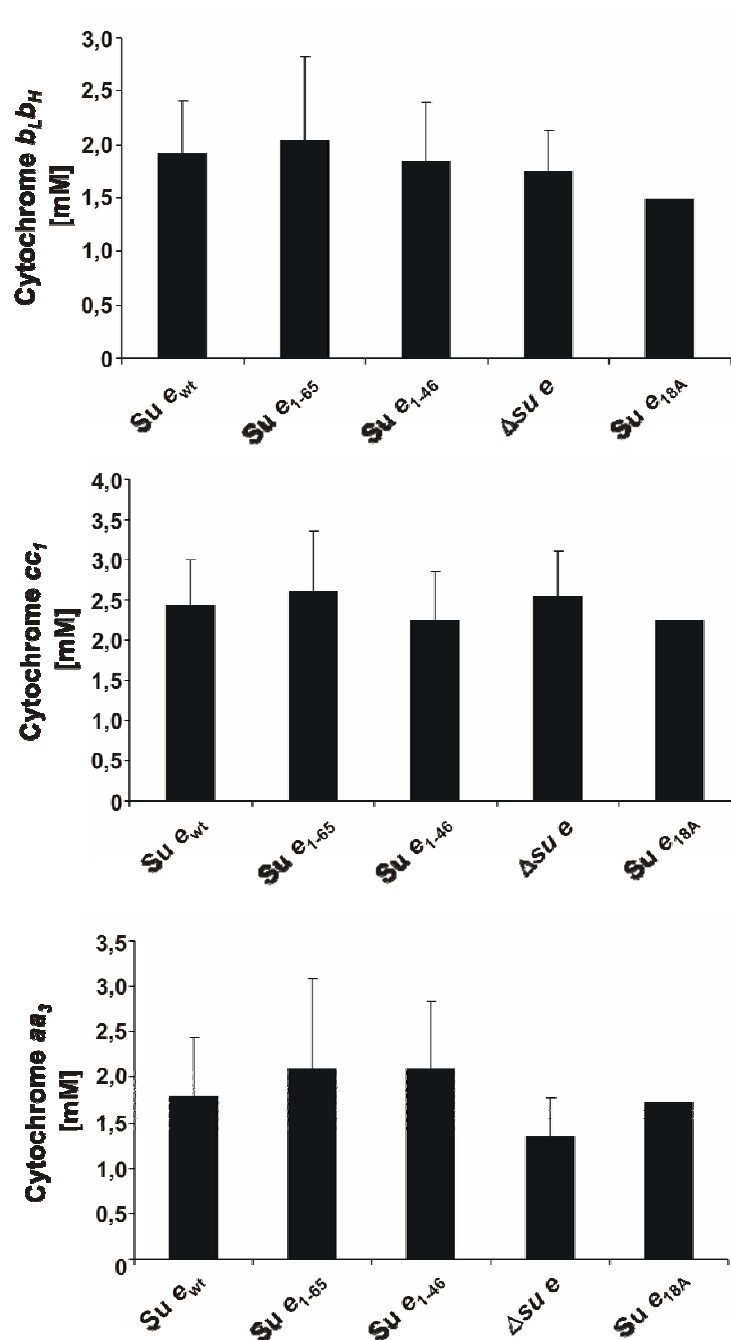


Abb. 3.1.13: **Bestimmung der Menge der Komplexe III und IV der Atmungskette über den Gehalt an Cytochrome *aa₃*, *b_H/b_L* und *c/c₁*.** Es wurde ein Differenz-Absorptionsspektrum von reduzierten und oxidierten Cytochromen aufgenommen. Über die spezifischen Absorptionskoeffizienten konnte der Gehalt der einzelnen Cytochrome errechnet werden. Lediglich für die *Su e* Deletionsmutante konnte eine signifikante Reduktion der Cytochrome *aa₃* und *b_H/b_L* festgestellt werden. Die Teildeletionen dagegen wiesen leicht erhöhte Werte auf. Für jeden Stamm ist der Mittelwert und ggf. die Standardabweichung angegeben.

Um die Effizienz des Elektronentransfers der Atmungskettenkomplexe zu messen, wurde der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien in der Gegenwart des Entkopplers CCCP ermittelt. CCCP kann im protonierten wie deprotonierten Zustand Membranen passieren und führt dadurch zu einem Ausgleich des Protonengradienten. Das Zusammenbrechen des Membranpotentials führt zu einer maximalen Aktivität der Atmungskettenkomplexe, da diese nicht gegen ein vorhandenes Membranpotential arbeiten müssen. Anhand der Messungen zeigte sich, dass lediglich die Deletionsmutante $\Delta su e$ mit 75 % der Wildtyp-Respiration eine verringerte Aktivität aufwies (Abb. 3.1.14). Wiederum kann der in diesem Stamm ermittelte relativ hohe Anteil an ρ^0 -Zellen dies erklären. Die $Su e_{1-65}$ und $Su e_{1-46}$ exprimierenden Stämme zeigten dagegen keine signifikant veränderten maximalen Atmungsaktivitäten. Somit konnte keine verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe unter diesen Bedingungen gezeigt werden. Eine Reduktion des Membranpotentials aufgrund verminderter Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe unter diesen Bedingungen (Substratsättigung) kann damit ausgeschlossen werden.

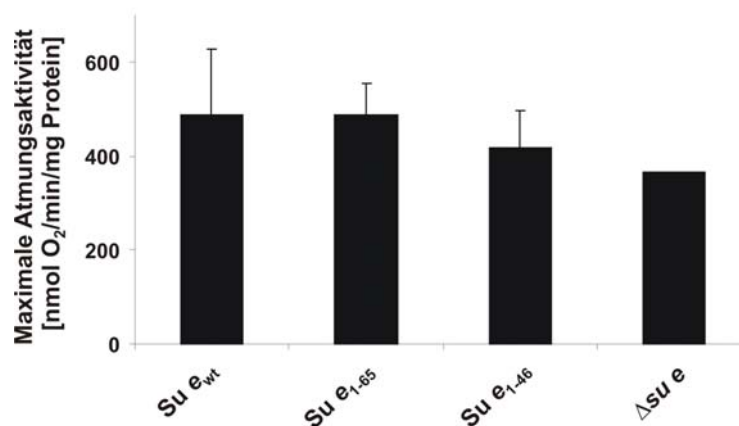


Abb. 3.1.14: **Die Reduktion von Sauerstoff über die gesamte Atmungskette ist in den ‚coiled-coil‘-Teildeletions-Mutanten nicht verändert.** Maximaler Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien wurde in Gegenwart von CCCP gemessen. Die Mitochondrien wurden mit Succinat und NADH als Substrate der Atmungskettenkomplexe energetisiert. Durch die Zugabe von CCCP wurde das Membranpotential aufgehoben, wodurch die Atmungskettenkomplexe entkoppelt vom Membranpotential mit maximaler Aktivität arbeiten. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Stämme außer dem Deletionsstamm angegeben.

Um auf einen unspezifischen Protonentransport über die Innenmembran zu testen, wurde untersucht, ob ein Membranpotential durch Gabe von ATP aufgebaut werden kann. Dabei wird die F_1F_0 -ATP Synthase Aktivität umgekehrt, und es kommt zum ATP-Hydrolyse abhängigen Export von Protonen. Das aufgebaute Membranpotential wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin123 gemessen (Abb. 3.1.15). Bei allen $Su e$ -Mutanten konnten auf diese Weise ein gleich hohes Membranpotential aufgebaut werden und damit ein unspezifischer Protonentransport ausgeschlossen werden.

3 Ergebnisse

Zusätzlich wurde der Sauerstoffverbrauch von energetisierten Mitochondrien (nach Zugabe von Substraten: Succinat/NADH), ‚State III‘, und mit zusätzlicher ADP-Gabe, ‚State IV‘, gemessen. Im ‚State IV‘ wird durch die ATP-Synthase der F_1F_0 -ATP Synthase und der damit einhergehenden Reduktion des Membranpotentials die Aktivität der Atmungskettenkomplexe gesteigert. Das Ausmaß der Steigerung im Sauerstoffverbrauch vom ‚State III‘ zu ‚State IV‘ spiegelt das Maß für die Kopplung der Atmungskette mit der ATP-Synthase wider. Ein unspezifischer Protonenfluss würde die Atmungskettenaktivität von der ATP-Synthase entkoppeln. Es konnten keine Unterschiede im Verhältnis von ‚State IV‘ zu ‚State III‘, bei den *Su e*-Mutanten festgestellt werden (Abb. 3.1.16). Somit kann mit mehreren Methoden gezeigt werden, dass die Innenmembran vollständig in Takt ist und ein unspezifischer Protonenfluss für die Reduktion des Membranpotentials nicht verantwortlich ist.

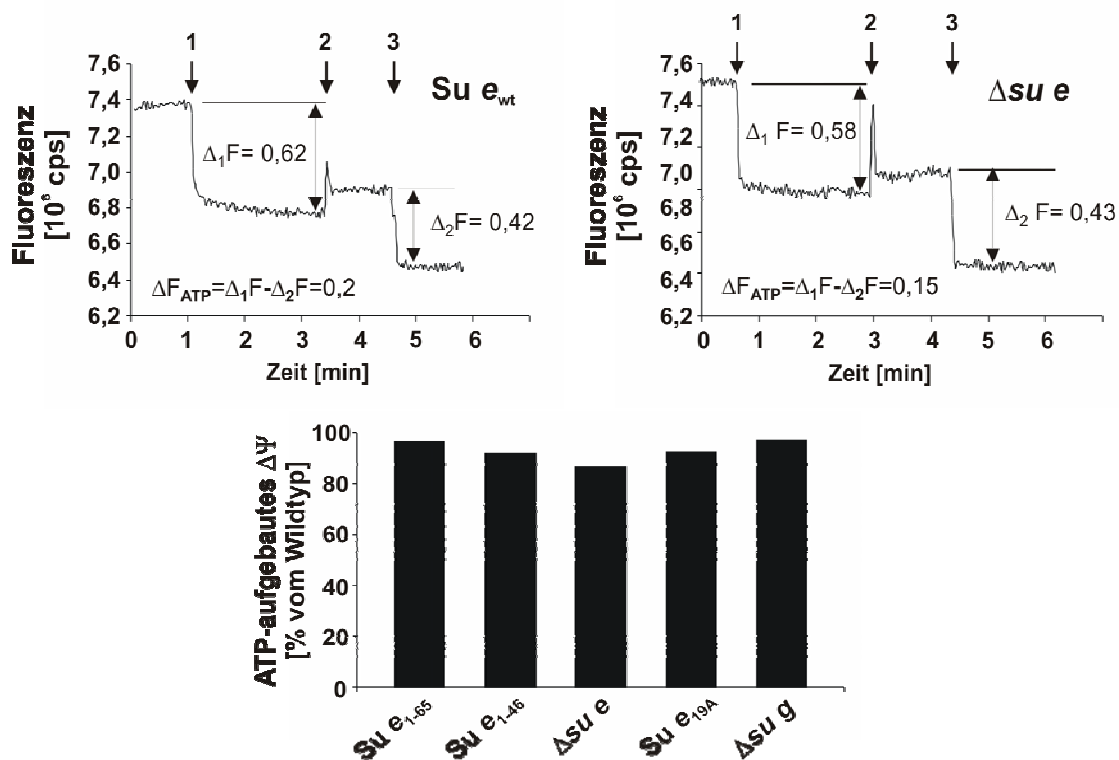


Abb. 3.1.15: Das reduzierte Membranpotential von Mitochondrien mit den Teildeletionen der ‚coiled-coil‘-Domänen von *Su e* kann nicht durch unspezifische Protonentranslokation erklärt werden. Um einen möglichen unspezifischen Protonenfluss in die Matrix als Ursache des verringerten Membranpotentials festzustellen, wurde durch Zugabe von ATP (1 und 3) ein Membranpotential in isolierten Mitochondrien erzeugt. Die Höhe des Membranpotentials wurde mit Rhodamin123 ermittelt. Die Zugabe von ATP führt auch ohne Membranpotential zu einem unspezifischen ‚quenching‘ des Fluoreszenz-Signals. Um das Ausmaß der unspezifischen Reduktion der Fluoreszenz zu bestimmen, wurde nach Aufhebung des durch die erste ATP-Zugabe (1) erzeugten Membranpotentials (durch Zugabe von CCCP (2)) erneut ATP zugegeben (3). Die Differenz aus der Fluoreszenzabnahme nach der ersten ATP-Zugabe und der Abnahme nach der zweiten ATP-Zugabe entspricht dem mit ATP aufgebauten Membranpotential.

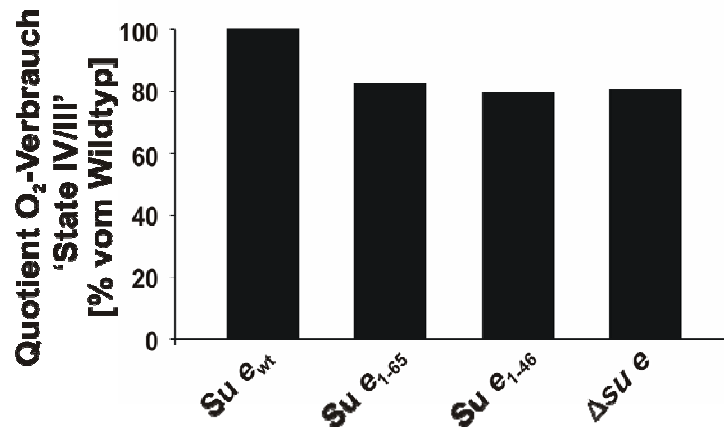


Abb.3.1.16: **Das Verhältnis des Sauerstoffverbrauchs mit und ohne ATP-Synthese wurde bestimmt.** Anhand der Kopplung des Sauerstoffverbrauchs mit der ATP-Synthese kann die Integrität der Innenmembran untersucht werden. Dazu wurden die Sauerstoffverbrauchsraten von isolierten energetisierten (Succinat/NADH) Mitochondrien mit ADP (State IV) und ohne ADP (State III) ermittelt. Die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch die Zugabe von ADP spiegelt den Kopplungsgrad der Atmungskette mit der ATP-Synthese wider.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente keine signifikanten Effekte der Su e-Teildeletionen auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe sowie auf die Integrität der Innenmembran. Jedoch weisen auch die ‚coiled-coil‘-Mutanten tendenziell eine verringerte Aktivität der Cytochrom c Oxidase auf. Ein Effekt der ‚coiled-coil‘-Domäne auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden.

3.1.10 Die endogene Kontrolle der F₁F₀-ATP Synthase Aktivität durch das Inhibitorprotein (Inh1) wird durch die Suprakomplex-Bildung nicht beeinflusst

Eine weitere mögliche Erklärung, wie es zu einem reduzierten Membranpotential, trotz unveränderter Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe, kommen kann, ist eine veränderte Regulation der Aktivität der F₁F₀-ATP Synthase. Bei der Nutzung des Membranpotentials gelangen Protonen vom Intermembranraum in die Matrix. Dies führt zum Absinken des pH-Wertes in der Matrix. Das Inhibitorprotein Inh1 bildet bei niedrigen pH-Werten in der Matrix Dimere, die an die F₁F₀-ATP Synthase binden und dessen ATPase-Aktivität inhibiert (Panchenko and Vinogradov, 1989), (Walker, 1994). Bei pH-Werten um 8,4 liegt das Inhibitorprotein als Tetramer vor und bindet nicht an die F₁F₀-ATP Synthase (Cabezon et al., 2001). Somit wird stets ein bestimmtes Membranpotential für Import und Transportprozesse aufrechterhalten und ATP wird unter Bedingungen mit limitierenden Substratmengen nicht unnötig hydrolysiert (Pullman and Monroy, 1963), (Green and Grover, 2000).

Angesichts der ebenso erfolgenden Dimerisierung der F₁F₀-ATP Synthase lag es nahe zu untersuchen, ob die Inhibition der F₁F₀-ATP Synthase in Abhängigkeit vom pH-

3 Ergebnisse

Wert im Deletionsstamm $\Delta su e$ verändert ist. Dazu wurden Aktivitätsmessungen der F_1F_0 -ATP Synthase bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (Abb. 3.1.17). Es konnten keine Abweichungen der Inhibitorwirkung bei den verschiedenen pH-Werten zwischen pH 6 und 8,5 festgestellt werden. Dies zeigt, dass obwohl es durch die Deletion der Untereinheit *e* nicht mehr zur Dimerbildung der F_1F_0 -ATP Synthase kommt, die Wirkung des Inhibitorproteins nicht beeinträchtigt wird. Eine veränderte Inhibition der F_1F_0 -ATP Synthase kann damit als Ursache für das reduzierte Membranpotential ausgeschlossen werden.

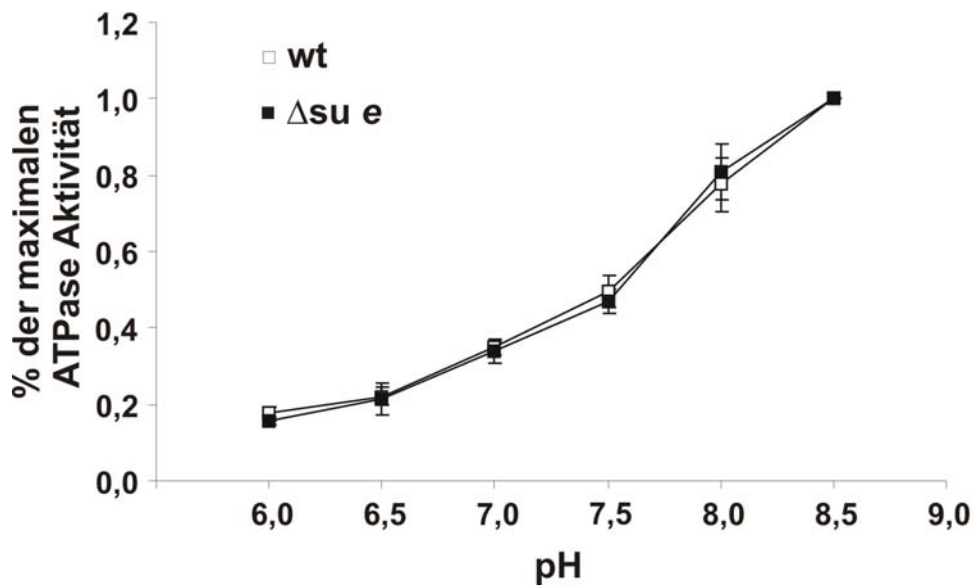


Abb.:3.1.17: **Die Inhibition der F_1F_0 -ATP Synthase durch Inh1 ist in der Deletionsmutante $\Delta su e$ nicht betroffen.** Eine veränderte Inhibition der F_1F_0 -ATP Synthase durch ein verändertes Bindungsverhalten des Inhibitorproteins an die monomere ATP-Synthase im *Su e* Deletionsstamm wurde untersucht. Dazu wurde dessen Aktivität an isolierten Mitochondrien bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Messungen angegeben.

3.2 Charakterisierung der rhomboid-ähnlichen Protease Pcp1

3.2.1 Pcp1 ist ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrien-Membran

Zum Verständnis der Funktionsweise hinsichtlich der Substraterkennung und spezifischen proteolytischen Aktivität von Pcp1 ist die genaue Lokalisierung und Topologie von besonderem Interesse. Die Charakterisierung der beiden bekannten Substrate von Pcp1 (Ccp1, Mgm1) legen eine Lokalisierung in der inneren Mitochondrienmembran nahe (Esser et al., 2002), (Herlan et al., 2003).

3.2.1.1 Pcp1 wird in der mitochondrialen Fraktion angereichert

Zur subzellulären Lokalisation von Pcp1 wurden Zellen von *S. cerevisiae* W303 α angezogen und in Zytosol, Mikrosomen sowie Mitochondrien subfraktioniert. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Als Antikörper-Kontrolle wurde Gesamtzellextrakt aufgetragen. Zur Kontrolle der verschiedenen Anreicherungen wurde das zytosolische Protein Bmh2, das sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) befindende Protein Erp1 und sowie das mitochondriale Matrixprotein Mge1 verwendet. Die Immundekoration mit Antikörpern gegen Pcp1 sowie den Kontrollproteinen zeigt die Kofraktionierung von Pcp1 mit dem mitochondrialen Kontrollprotein Mge1 (Abb. 3.2.1). Da Mikrosomen und Mitochondrien sich nicht vollständig voneinander trennen lassen, können geringe Mengen mitochondrialer Proteine (Mge1) in der Mikrosomen-Fraktion sowie mikrosomaler Proteine (Erp1) in der Mitochondrien-Fraktion nachgewiesen werden. Dies erklärt auch die schwache Bande von Pcp1 in der mikrosomalen Fraktion.

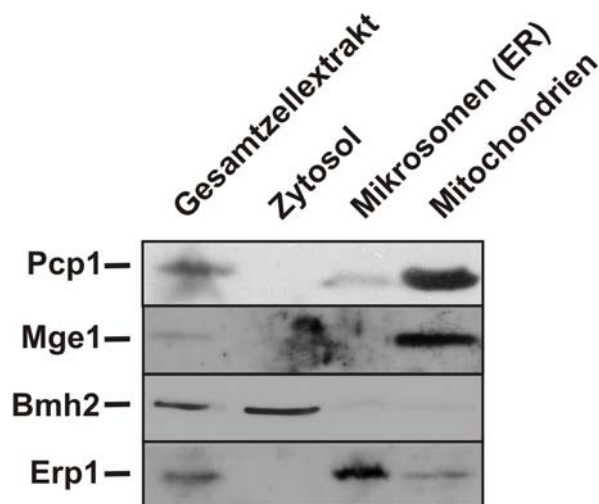


Abb. 3.2.1: **Pcp1** wird in der mitochondrialen Subfraktion angereichert. Wildtyp Hefezellen (W303 α) wurden einer Zellfraktionierung in Zytosol, Mikrosomen und Mitochondrien unterzogen. Als Antikörper-Kontrolle diente Gesamtzellextrakt. Gleiche Proteinmengen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immundekoration analysiert. Die Anreicherungen wurden anhand von Markerproteinen überprüft. Dazu diente das zytosolische Protein Bmh2, das Protein Erp1 aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER, Mikrosomen) und das in der mitochondrialen Matrix gelegene Protein Mge1.

3.2.1.2 In Mitoplasten kann Pcp1 proteolytisch abgebaut werden

Um die submitochondriale Lokalisation von Pcp1 zu bestimmen, wurden Proteolyse-Experimente mit Proteinase K (PK) durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien direkt mit PK behandelt, wodurch nur die Proteine, die von Außen zugänglich sind, durch die Protease verdaut werden. Proteine des Intermembranraums, der inneren Membran und der Matrix bleiben geschützt. Parallel dazu wurde vor der PK-Zugabe osmotisch die äußere Membran selektiv geöffnet (Mitoplasten), wodurch auch Proteine des Intermembranraums und die innere Membran durchspannende Proteine proteolytisch prozessiert werden können. Die Proteine der Matrix bleiben dabei geschützt. Im Anschluss an die Behandlung mit Proteinase K wurden die Proteine und Proteinfragmente über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot und Immundekoration analysiert. Die Immundekoration mit einem Antikörper spezifisch für den C-Terminus von Pcp1 zeigte, dass die Zugabe von Proteinase K zu intakten Mitochondrien keinen proteolytischen Effekt auf Pcp1 hat (Abb. 3.2.2). Jedoch zeigte sich eine drastische Reduktion des Signals, wenn Mitoplasten mit Proteinase K behandelt wurden. Durch Zugabe von 1 % Triton TX-100 wurden beide Membranen permeabilisiert und Pcp1 konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Die Integrität der Membranen sowie zur Kontrolle des osmotischen Schwellens wurden dieselben Western-Blots mit Antikörpern gegen Proteine der mitochondrialen Innenmembran (ADP/ATP-Transporter, Aac-2) sowie der Matrix (Mge1) dekoriert (Pfanner and Neupert, 1987). Die unvollständigen Prozessierung des Aac-2 zeigt, dass das selektive Öffnen der Außenmembran unvollständig war. Dies erklärt auch die unvollständige Prozessierung von Pcp1. Da keine Fragmente mit dem C-terminalen Antikörper gegen

Pcp1 nachgewiesen werden können muss sich der C-Terminus von Pcp1 im Intermembranraum befinden.

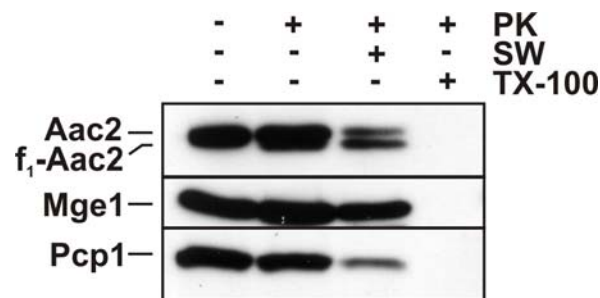


Abb. 3.2.2: **Der C-Terminus von Pcp1 ist im Intermembranraum für Proteasen zugänglich.** Um die submitochondriale Lokalisation von Pcp1 zu untersuchen wurden isolierte Mitochondrien, Mitoplasten sowie solubilisierete Mitochondrien mit Proteinase K (PK) behandelt. Zur Kontrolle wurden PK-unbehandelte Mitochondrien aufgetragen. Pcp1 konnte nach dem selektiven Öffnen der Außenmembran (SW) nur noch in geringeren Mengen nachgewiesen werden. Der ADP/ATP-Transporter Aac2 ist ein integrales Membranprotein der inneren Membran. Aac2 wird durch die äußere Membran vor der Prozessierung geschützt. Nach dem Schwellen (SW) wird das Protein für die PK zugänglich und ein typisches Fragment entsteht (f_1 -Aac2). Mge1 ist ein Protein in der mitochondrialen Matrix und wird erst durch die Zerstörung der inneren Membran durch Detergenz (TX-100) für die PK zugänglich.

3.2.1.3 Pcp1 ist ein integrales Protein der inneren Membran

Da Rhomboidproteasen Ihre Substrate innerhalb der Membran spalten, ist eine Membran durchspannende Topologie wahrscheinlich. Um eine solche Membranassoziation zu überprüfen, wurden Extraktionsexperimente mit 1 M NaCl (Salzextraktion) und 0,1 M Na_2CO_3 (alkalische Extraktion pH 11.5) durchgeführt. Pcp1 konnte unter diesen Bedingungen nicht aus der Membran extrahiert werden, sondern blieb, ähnlich wie der ADP/ATP-Transporter (Aac-2), der sechsmal die Innenmembran durchspannt, mit der Membran assoziiert (Abb. 3.2.3). Für die D-Laktatdehydrogenase (DLD) wurde gezeigt, dass dieses Protein nur mit einer Transmembran-Domäne in der Innenmembran verankert ist (Rojo et al., 1998). DLD konnte im Gegensatz zu Pcp1 mit 0,1 M Na_2CO_3 partiell extrahiert werden. Über die Salzextraktion (1 M NaCl) werden Proteine, die über ionische Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert sind, von der Membran gelöst. DLD konnten bei der Salzextraktion jedoch nicht von den Membranen gelöst werden. Aus diesen Ergebnissen kann eine dem Aac-2 ähnliche Membranassoziation für Pcp1 geschlossen werden. Dies wird durch Sequenz-Homologie-Studien von Rhomboidproteasen, die sieben Transmembransegmente für Pcp1 vorhersagen bestätigt (Esser et al., 2002), (Koonin et al., 2003). Zusammen mit dem vorherigen Experimenten ist Pcp1 daher ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran.

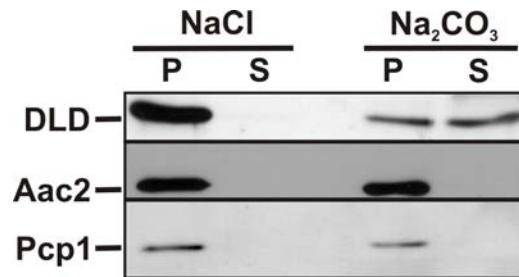


Abb. 3.2.3: **Pcp1 ist ein integrales Membranprotein.** Um die Membranassoziation von Pcp1 zu untersuchen, wurden Extraktionsexperimente mit isolierten Mitochondrien von Wildtyp W303 α durchgeführt. Als Kontrolle dienen DLD und Aac2. (P= Pellet, S= Überstand).

3.2.2.1 Pcp1 wird durch die beiden Matrix-Proteasen MPP und MIP prozessiert

Der N-Terminus (Aminosäuren 1-106) von Pcp1 weist eine hohe Anzahl positiver und eine geringe negative Ladungen auf. Zusätzlich enthält dieser N-terminale Abschnitt viele hydrophobe Aminosäuren. Die positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren können eine amphipatische α -Helix ausbilden. Eine solche Anordnung ist ein typisches Merkmal einer N-terminalen Signalsequenz (Abe et al., 2000), (Heijne, 1986), (Wang and Weiner, 1994). Solche Signalsequenzen werden meist in der Matrix entfernt. Zumeist erfolgt nur eine Prozessierung durch die mitochondriale MPP (matrix prozessing peptidase), jedoch kann dieser eine weitere Prozessierung durch die MIP (mitochondrial intermediate protease) erfolgen, durch diese werden weitere acht Aminosäuren vom N-Terminus entfernt (Branda and Isaya, 1995).

Anhand der Aminosäuresequenz von Pcp1 können zwei solcher Prozessierungsstellen für die MPP vorhergesagt werden (nach der ‚R-2 rule‘) (Gakh et al., 2002). Die erste Schnittstelle liegt bei der 39. Aminosäure und würde ein ca. 30 kDa großes C-terminales Fragment ergeben (Abb. 3.2.4). Die zweite mögliche Schnittstelle liegt bei Position 65, die aufgrund der Sequenz-Vorhersage wahrscheinlich mit einer zusätzlichen Prozessierung durch die MIP verbunden ist [R-10-Motiv: R-X-(F/L/I)-X-X-(T/S/G)-X-X-X-X] (Branda and Isaya, 1995), (Gakh et al., 2002). Bei dieser Prozessierung durch beide Proteasen entsteht für die reife Form von Pcp1 eine vorhergesagte Größe von ca. 26 kDa, dies entspricht der endogen beobachteten Größe von Pcp1.

MSGVSSVMLG LRPATRIFFR SNISVSPSRT FVSYIG**RSQ/S** TSILKNAPNL
 EDNVTNLQKI IPK**RFFSQT** **ILK**/SRWKPIF NEETTNRYYR LNRFAQYQQQ
 RSGGN**PLGSM** **TILGLSLMAG** **IYFGSPYLFE** HVPPFTYFKT HPK**NLVYALL**
GINVAVFLGW **QLPKCWRFLQ** KYMLLQKDYV TSKIS**IIGSA** **FSHQEFWHLG**
MNMLALWSFG TSLATMLGAS **NFFSLYMNSA** **IAGSLFSLWY** PKLARLAIVG
PSLGASGALF **GVLGCFSYLF** PHAKILLFVF **PVPGGAWVAF** **LASVAWNAAG**
 CALRWGS**FDY** **AAHLGGSM**MMG **VLYGWYIS**KA VEKQRQRRLQ AAGRWF

Abb. 3.2.4: **Aufgrund der Aminosäure-Sequenz von Pcp1 lassen sich MPP bzw. MIP-Prozessierungsstellen voraussagen.** Die N-terminale Aminosäure-Sequenz von Pcp1 wurde auf typische MPP-Schnittstellen untersucht („R-2 rule“). Dabei konnten zwei mögliche Schnittstellen (*I*) gefunden werden (mögliche Erkennungssequenzen dick gedruckt). Die zweite Schnittstelle entspricht einem R-10 Motiv (Gakh et al., 2002), (Branda and Isaya, 1995): R-X/(F/L/I)-X-X-(T/S/G)-X-X-X-X/. Dieses Motiv wird sequenziell von MPP und anschließend durch MIP prozessiert. Bei einer solchen Prozessierung würde ein 26 kDa großes Protein entstehen. Die sieben hydrophoben Segmente von Pcp1 sind grau unterlegt.

Um die vorhergesagte spezifische MPP- bzw. MIP-Prozessierung zu untersuchen, wurde radioaktiv-markiertes Pcp1-Vorstufenprotein mit isolierter MPP inkubiert (Cavadini et al., 2000). Zusätzlich wurden Import-Experimente mit isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp-Hefestamm und aus dem MIP-Deletionsstamm (Δ mip) durchgeführt. Das Vorstufenprotein wurde durch die Inkubation mit dem rekombinaten MPP prozessiert. Eine der dabei entstandenen Banden läuft auf der Höhe von 30 kDa (*i*-Pcp1) (Abb.2.3.4 und 2.3.5), dies entspricht der Größe von Pcp1, bei einer Prozessierung an der ersten vorhergesagten MPP-Schnittstelle. Die Bande entsteht auch beim Import in Wildtyp-Mitochondrien, jedoch wird sie nach Zugabe von PK vollständig verdaut. Es handelt sich daher um nicht vollständig transloziertes Pcp1. Dagegen läuft die zweite Bande (*i*₂-Pcp1) der *in vitro* MPP-Behandlung etwas höher (ca.1-2 kDa) als die im Wildtyp importierte Form von Pcp1 (Abb. 3.2.5 A). Dieses Fragment entsteht auch vornehmlich in der MIP-Deletionsmutante. Pcp1 wird also sowohl durch Behandlung mit isoliertem MPP als auch in der Δ mip-Mutante nicht vollständig zur endogenen Größe prozessiert. Der Größenunterschied von 1-2 kDa zum endogenen Pcp1 beruht daher auf den verbleibenden acht Aminosäuren, die normalerweise von der MIP entfernt werden. Zusammenfassend wird die N-terminale Signalsequenz von Pcp1 während der Biogenese durch zwei Prozessierungsschritte entfernt, von den Proteasen MPP und MIP.

Zusätzlich kann beim Import von Pcp1 in Wildtyp-Mitochondrien nach dem selektiven entfernen der Außenmembran durch Schwellen (SW) ein 1-2 kDa kleineres Fragment (*f*₁-Pcp1) des endogenen Pcp1 beobachtet werden (Abb. 3.2.5 A). Dies entspricht dem Verdau des C-Terminus, der nach dem Schwellen für die PK zugänglich wird. Dies unterstützt die bei den Western-Blot Analysen zuvor gemachte Beobachtung,

3 Ergebnisse

dass der C-Terminus nach Schwellen und Proteinase K-Verdau nicht mehr vom Antikörper, der gegen ein C-terminales Peptid von Pcp1 gerichtet ist, erkannt wird.

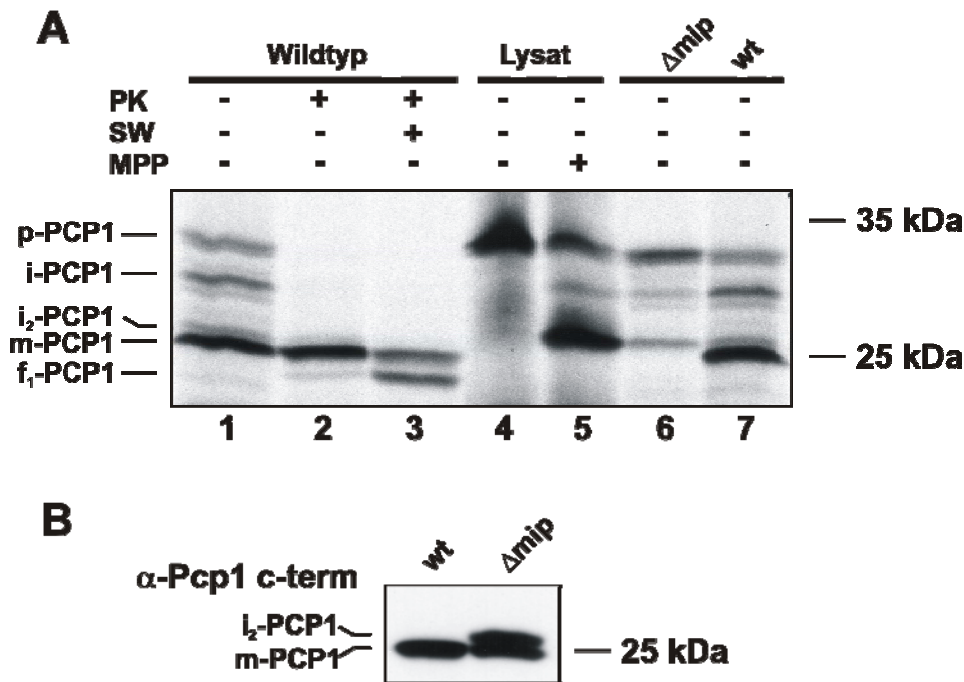


Abb. 3.2.5: **Das radioaktive Vorstufenprotein von Pcp1 wird *in vitro* durch die Matrix-Proteasen MPP und MIP prozessiert.** A: Um eine mögliche Prozessierung von Pcp1 durch die mitochondriale Prozessierungsprotease (MPP) und die mitochondriale Intermediär Protease (MIP) zu untersuchen, wurde radioaktiv markiertes Vorstufenprotein mit aus *E.coli* isolierter MPP inkubiert (Spuren 4 und 5). Zur Kontrolle wurde neben das behandelte Lysat ein Import-Experiment von Pcp1 in Mitochondrien, die aus Wildtyp-Hefe (273-10B) isoliert wurden aufgetragen (Spuren 1, 2, 3 und 7). Des Weiteren wurde radioaktives Pcp1-Vorstufenprotein in isolierte Mitochondrien des Δ mip-Hefestammes importiert (Spur 6). B: Im Vergleich wurden 50 μ g isolierter Mitochondrien parallel zu den Import-Experimenten über SDS-PAGE aufgetrennt und über Immundekoration (C-terminaler Antikörper gegen Pcp1) analysiert.

Um die sequenzielle Prozessierung von Pcp1 nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zu zeigen, wurden Mitochondrien aus dem Wildtyp- und aus dem Δ mip-Stamm über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immundekoration mit dem C-terminalen Antikörper analysiert. Wie bei den Import-Experimenten konnte in der Deletionsmutante eine Bande ca. 1-2 kDa oberhalb der im Wildtyp detektierten endogenen Form von Pcp1 nachgewiesen werden (i_2 -Pcp1) (Abb. 3.2.5 B). Zusätzlich konnte eine weitere Bande, die von der Größe der endogenen Form von Pcp1 entspricht, detektiert werden. Da zur Analyse ein Antikörper gegen ein C-terminales Peptid verwendet worden war, handelt es sich vermutlich um einen N-terminalen, nicht MIP abhängigen Abbau. Diese *in vivo* Experimente bestätigen die Ergebnisse der *in vitro* Versuche.

3.2.3 Topologie von Pcp1 in der inneren Mitochondrienmembran

Die Familie der Rhomboid-ähnlichen Proteasen weist eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz auf (Koonin et al., 2003). Auffallende Merkmale der Rhomboid-ähnlichen Proteasen ist eine aus sechs Transmembrandomänen bestehende ‚Kern‘-Domäne (Koonin et al., 2003) mit den darin konservierten Aminosäuren (Asn, Ser, His) des katalytischen Zentrums (Urban et al., 2001), (Urban et al., 2002b). Anhand des Sequenzvergleichs von Pcp1 mit den Sequenzen anderer Rhomboid-ähnlicher Proteasen zeigt sich, dass zusätzlich zur ‚Kern‘-Domäne (hydrophobe Segmente 2-7) eine weitere N-terminal gelegene hydrophobe Sequenz vorhanden sein kann (Koonin et al., 2003).

3.2.3.1 *In vitro* Import-Experimente unterstützen eine N_{in}-C_{out}-Topologie

Um die N_{in}-C_{out}-Topologie zu bekräftigen, wurden weitere Import-Experimente mit [³⁵S] radioaktiv markiertem Pcp1-Vorstufenprotein durchgeführt. Ein Teil der Mitochondrien wurden vor dem Import-Experiment mit o-Phenantrolin (o-Phe) und EDTA behandelt. Dadurch werden zweiwertige Metallionen aus dem katalytischen Zentrum von Metalloproteasen gelöst und durch Komplexierung gebunden. MPP und MIP sind Metalloproteasen und verlieren daher ihre Aktivität. Das Pcp1-Vorstufenprotein wurde beim Import in die vorbehandelten Mitochondrien nicht durch MPP und MIP prozessiert (Abb. 3.2.7). Dies unterstützt weiter die Prozessierung der Signalsequenz von Pcp1 durch diese Proteasen.

Da sich das unprozessierte Pcp1 in der Größe nicht vom Vorstufenprotein unterscheidet kann nur durch die PK-Behandlung auf eine korrekte Lokalisation geschlossen werden. Importiertes Pcp1 ist durch die Außenmembran vor dem Verdau durch die Proteinase K geschützt (Vergleich Spuren 4 mit 5). Wird jedoch die äußere Membran durch Schwellen (SW) entfernt, so entsteht wie beim Import ohne o-Phe/EDTA-Behandlung (f₁) (Spur 3) ein Fragment (f₂) (Spur 6) mit einer um 1-2 kDa verringerten Größe wie es auch bei den vorherigen Import-Experiment detektiert worden war. Die Bildung eines solch gleichen Fragmentierungsmusters kann wegen der fehlenden N-terminalen Prozessierung durch MPP/MIP nur durch eine Prozessierung des C-Terminus entstehen. Dies bekräftigt die Zugänglichkeit des C-Terminus von Pcp1 im Intermembranraum für die PK. Da trotz Schwellen keine Prozessierung am N-Terminus beobachtet werden kann, bestätigt dieses Experiment sowohl die Lokalisation des C-Terminus im IMR als auch den N-Terminus in der Matrix.

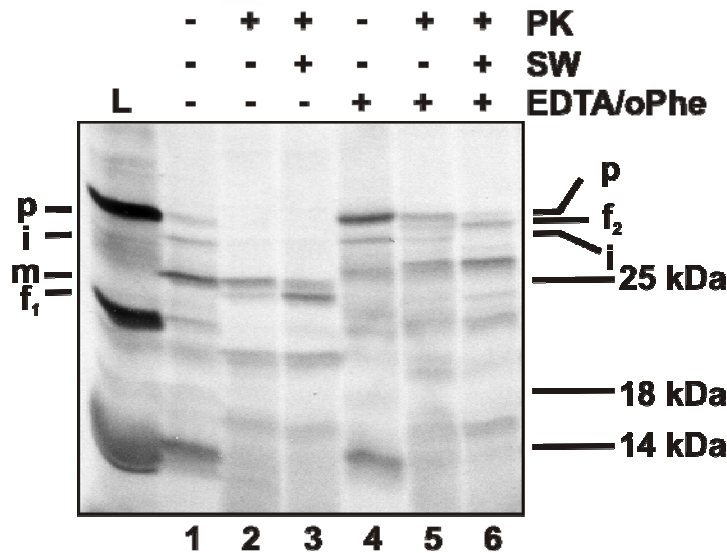


Abb. 3.2.7: **Der C-Terminus von Pcp1 wird nach dem Schwellen für den Proteinase K-Verdau zugänglich während der N-Terminus geschützt bleibt.** *In vitro* Importexperimente mit S^{35} -Methionin markiertem Vorstufenprotein von Pcp1 in isolierte Mitochondrien vom Wildtyp 273-10B zeigen eine Metalloproteasen-abhängige Prozessierung des 34 kDa Vorstufenproteins zu einem 25 kDa-Protein (Spuren 1, 2 und 3), das der Größe von endogenem Pcp1 entspricht. Das so prozessierte Protein wird durch die äußere Membran vom proteolytischen Abbau durch die Proteinase K geschützt (Spur 2). Nachdem die Außenmembran durch osmotisches Schwellen selektiv entfernt wurde, entsteht ein 1-2 kDa kleineres spezifisches Fragment (Spur 3). Dies geschieht auch in Anwesenheit von EDTA/o-Phenantrolin, welches die MPP/MIP-Prozessierung inhibiert (Spur 6). Daher handelt es sich bei den entstehenden Banden um Fragmente, die am C-Terminus verkürzt wurden (Spuren 3 und 6).

3.2.3.2 Modell der Topologie von Pcp1

Die N-terminale Präsequenz sowie die Prozessierung von Pcp1 durch die in der Matrix lokalisierten Proteasen MPP und MIP legen eine Lokalisation des N-Terminus in der Matrix nahe. Des Weiteren haben Importexperimente mit radioaktivem Vorstufenprotein und die Western-Blot Analysen des endogenen Pcp1 eine Zugänglichkeit des C-Terminus vom Intermembranraum gezeigt. Eine solche N_{in} - C_{out} -Topologie für Pcp1 in Verbindung mit den aus dem Sequenzvergleich ermittelten sieben Transmembrandomänen (Abb. 3.2.6) ergibt folgendes Modell für die Topologie von Pcp1 in der Innenmembran:

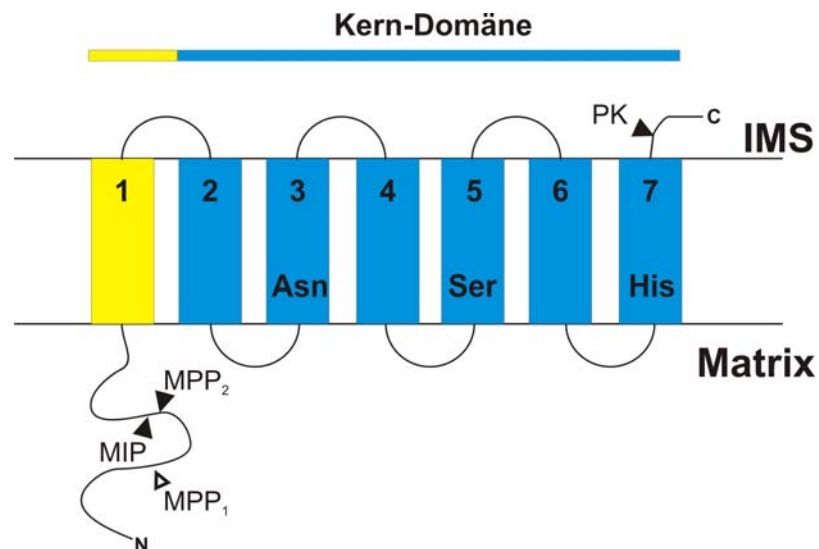


Abb. 3.2.6: **Modell der Topologie von Pcp1 in der mitochondrialen Innenmembran.** Pcp1 besitzt zusätzlich zu einer sechs Transmembrandomänen umfassende ‚Core‘-Domäne (blau) eine weitere Transmembrandomäne am N-Terminus (gelb) (Koonin et al., 2003). Das N_{in} - C_{out} -Topologiemodell beruht auf der PK-Zugänglichkeit des C-Terminus von Mitoplasten, sowie der N-terminalen Signalsequenz mit der spezifischen MPP/MIP Prozessierung (Pfeile).

3.2.4 Die Biogenese von Pcp1

3.2.4.1 Die Insertion von Pcp1 in die innere Mitochondrienmembran ist vom TIM23-Translokase-Komplex abhängig

Vorstufenproteine mit einer N-terminalen Signalsequenz werden in Mitochondrien über die TIM23-Translokase in die Innenmembran inseriert oder in die Matrix transloziert (Moro et al., 1999), (Neupert, 1997). Ob eine Translokation von Pcp1 über den TIM23-Komplex erfolgt wurde mit Import-Experimenten von radioaktiv markierten [S^{35}]-Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien untersucht. Zum Vergleich wurde auch in Mitochondrien mit herunterreguliertem Tim23-Gehalt importiert. Zur Kontrolle der Abhängigkeit wurde parallel radioaktiv markiertes Vorstufenprotein von F1 β und Aac2 importiert. F1 β ist ein bekanntes Substrat für die TIM23-Translokase, während der Import von Aac2 unabhängig von dieser Translokase ist (Abb. 3.2.8). Pcp1 wurde wie F1 β Tim23-abhängig importiert, während Aac2 nicht betroffen war.

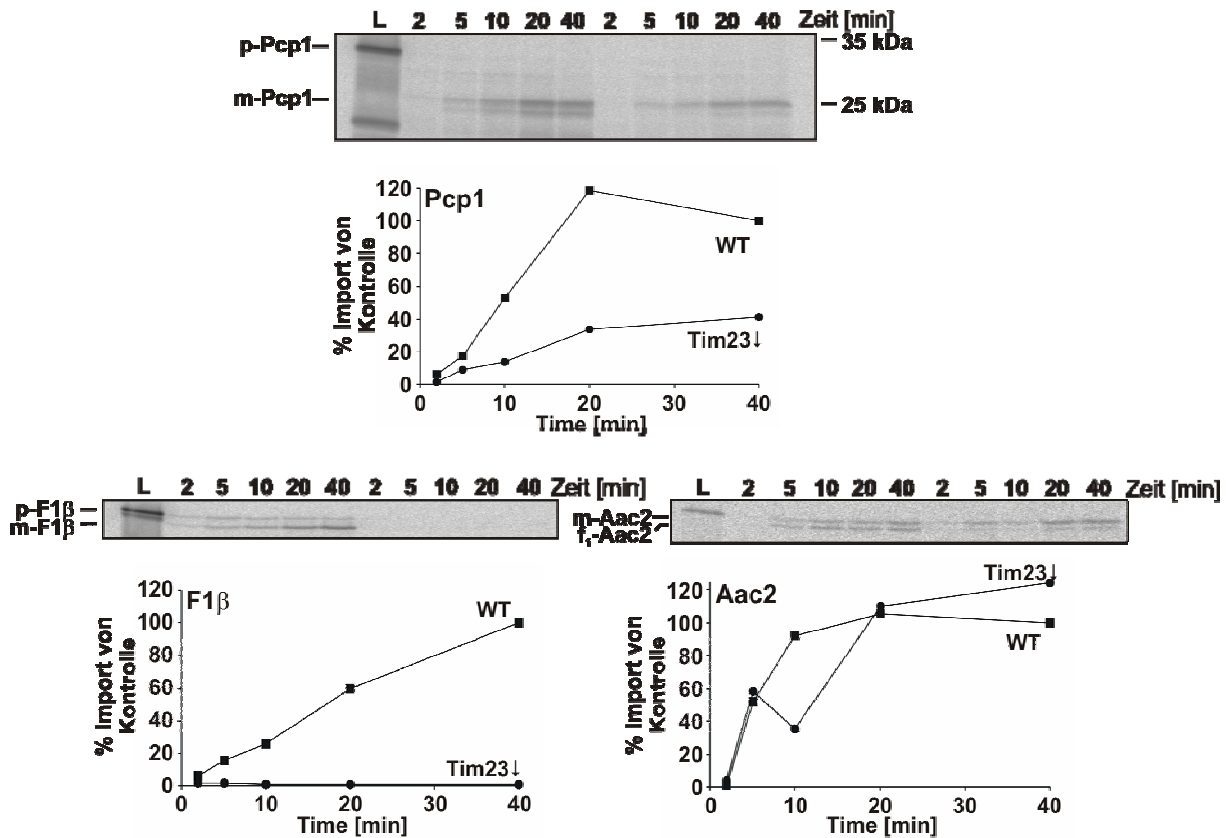


Abb. 3.2.8: Die Biogenese von Pcp1 ist von der TIM23-Translokase der inneren Mitochondrienmembran abhängig. S³⁵-Methionin markierte Vorstufenproteine von F1β, Aac2 und Pcp1 wurden in isolierte Mitochondrien importiert. Es wurden dabei Mitochondrien verwendet, die Wildtyp-Mengen an Tim23 enthielten (WT) sowie Mitochondrien, deren Tim23 Proteingehalt reduziert worden war (Tim23↓). (L, Vorstufensyntheseansatz; m, prozessierte Wildtyp-Größe; f, Fragment; p, Vorstufenprotein).

3.2.4.2 Ssc1-Aktivität ist notwendig für die Biogenese von Pcp1

Der Importmotor besteht aus den essentiellen Komponenten Tim44, mtHsp70 (Ssc1) und dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Rassow et al., 1994), (Schneider et al., 1994), (Stuart et al., 1994a), (Neupert and Brunner, 2002). Zusätzlich wurden kürzlich die essentiellen Komponenten Tim14 (Pam18) und Tim16 (Pam16) identifiziert. Um die Abhängigkeit des Imports von Pcp1 vom Importmotor zu untersuchen wurde die Ssc1-temperatursensitive Mutante *ssc1-3* verwendet. Bei nicht permissiver Temperatur von 37 °C ist die Funktion von Ssc1 gestört (Gambill et al., 1993). Bei der *ssc1-3* Mutante ist die ATP-Bindungsdomäne von Ssc1 betroffen, so dass bei restriktiver Temperatur die vom gebundenen Nukleotid-abhängige Dissoziation von Ssc1 von Tim44 verhindert wird (Schneider et al., 1994), (Voos et al., 1996). Eine nach der Isolation von Mitochondrien aus diesem bei 24°C angezogenen Stamm erfolgende Temperatur-Behandlung bei 37°C führt nur zur Inaktivierung von Ssc1. Sekundär Effekte, die bei der Herunterregulation von essentiellen Motorkomponenten auftreten können, werden daher weitgehend vermieden.

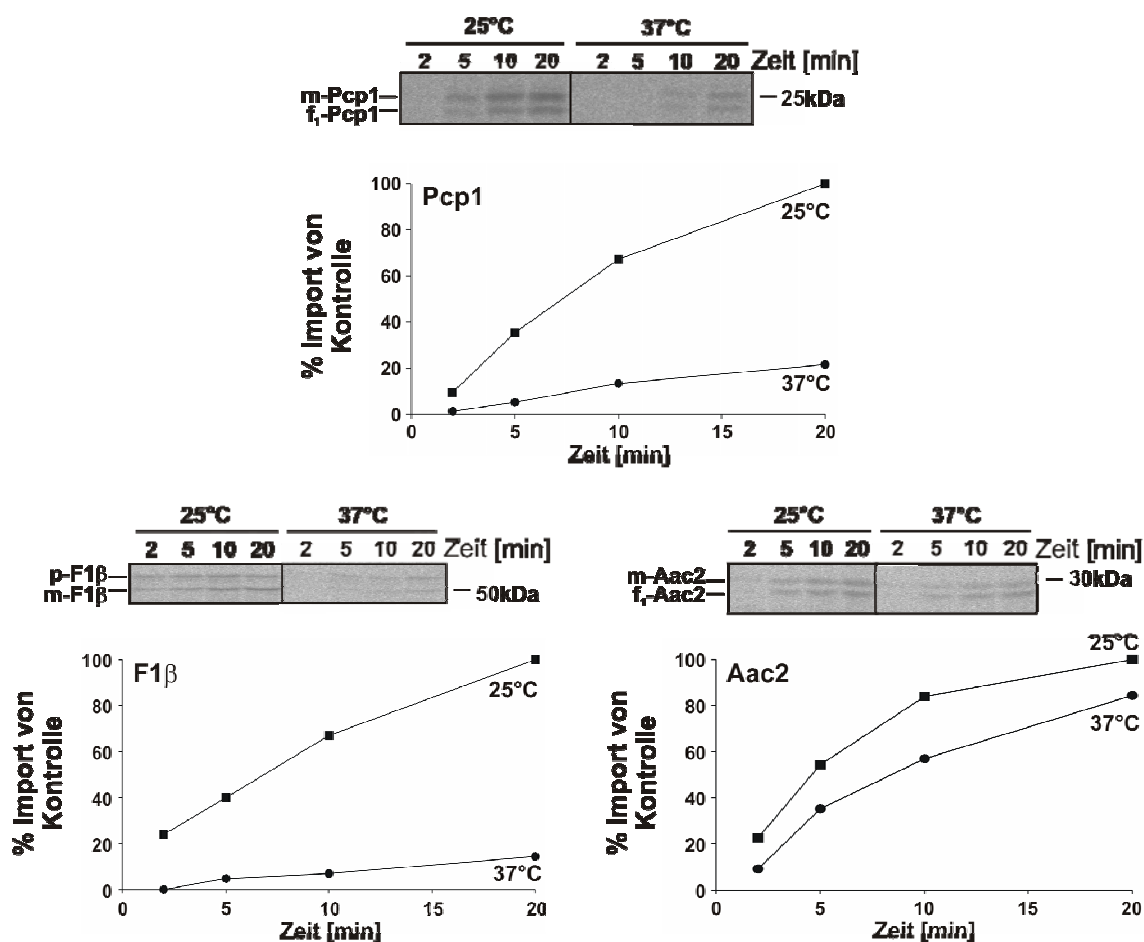


Abb. 3.2.9: Die Biogenese von Pcp1 ist abhängig vom Importmotor. Mitochondrien, die aus dem temperatur-sensitiven Stamm *ssc1-3*, bei permissiver Temperatur gewonnen worden waren, wurden 10 min bei 25 oder 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden zeitabhängige Importexperimente bei 25 °C durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Untereinheit F1β der F₁F₀-ATP Synthase und der ADP/ATP-Transporter (Aac2) importiert. (p, Vorstufenprotein; m, prozessierte Wildtyp-Größe; f, Fragment).

Der *ssc1-3*-Stamm wurde bei 24 °C angezogen und die Mitochondrien daraus isoliert. Vor den Import-Experimenten wurden die Mitochondrien 10 min bei 25 °C bzw. 37 °C vorinkubiert. Die Import-Experimente wurden dann bei 25 °C durchgeführt. In diesem Experiment wurde Pcp1 schlechter in die bei 37 °C vorinkubierten *ssc1-3*-Mitochondrien importiert als in die bei 25 °C vorbehandelten (Abb.3.2.9). Um den Funktionsverlust des Ssc1 durch die Temperaturbehandlung zu bestätigen wurde parallel das Vorstufenprotein der F1β-Untereinheit der F₁F₀-ATP Synthase in *ssc1-3*-Mitochondrien importiert. Für diese Untereinheit ist eine Abhängigkeit vom Importmotor etabliert. Zur Kontrolle des Membranpotentials, welches für den Import notwendig ist, wurde Vorstufenprotein des ADP/ATP-Transporter (Aac2) importiert. Der ADP/ATP-Transporter wird Membranpotentialabhängig über die TIM22-Translokase unabhängig vom Importmotor in die Innenmembran inseriert. Pcp1 verhält sich im Vergleich mit den beiden Kontrollproteinen ähnlich dem importmotorabhängigen F1β. Dies zeigt die Abhängigkeit vom Importmotor für die Biogenese von Pcp1.

3.2.4.3 Die Insertion von Pcp1 in die mitochondriale Innenmembran ist ATP-abhängig

Die Translokation von Proteinen in die mitochondriale Matrix über die TIM23-Translokase ist ATP-abhängig (Cyr et al., 1993), (Gambill et al., 1993), (Stuart et al., 1994b). Das mitochondriale Hsp70 (Ssc1) des Importmotors bindet ATP-abhängig Proteine, die über den TIM23-Komplex transferiert werden. Die oben gezeigte Importmotor-Abhängigkeit von Pcp1 legt daher auch eine ATP-Abhängigkeit nahe. Um eine solche Abhängigkeit zu untersuchen, wurden Import-Experimente von radioaktiv markierten Pcp1 und Oxa1-Vorstufenproteinen in ATP-depletierte Wildtyp-Mitochondrien durchgeführt. Zur Depletion des ATP wurden die Mitochondrien mit Apyrase und Oligomycin behandelt. Die Apyrase hydrolysiert das ATP außerhalb der Mitochondrien, während Oligomycin die Neusynthese durch die F₁F₀-ATP Synthase verhindert. Der ADP/ATP Transporter (Aac2) tauscht ATP gegen ADP aus, bis die Matrix an ATP verarmt ist. Abschließend wird durch die Zugabe von Atractylosid der Eintransport von ATP unter den Bedingungen der Importreaktion in die Matrix durch den ADP/ATP-Transporter verhindert (Stuart et al., 1994b). Zur Kontrolle der Importkompetenz der Mitochondrien wurden parallel Vorstufenproteine in unbehandelte Mitochondrien importiert. Die Import-Experimente zeigen, dass die Pcp1-Biogenese, ähnlich der Biogenese von Oxa1, ATP-abhängig ist (Abb. 3.2.10). Zusätzlich ist dies eine indirekte Bestätigung der oben gezeigten Importmotorabhängigkeit für die Insertion von Pcp1 in die innere Mitochondrienmembran.

Für die Biogenese von Oxa1 ist eine ATP-Abhängigkeit gezeigt worden (Herrmann et al., 1997). Oxa1 wird über den konservativen Biogeneseweg importiert, dabei gelangt das Vorstufenprotein über den TIM23-Komplex vollständig in die Matrix und wird von dort durch den Oxa-Komplex in die Innenmembran inseriert. Für die vollständige Translokation von Oxa1 in die Matrix durch den Import-Motor ist ATP nötig.

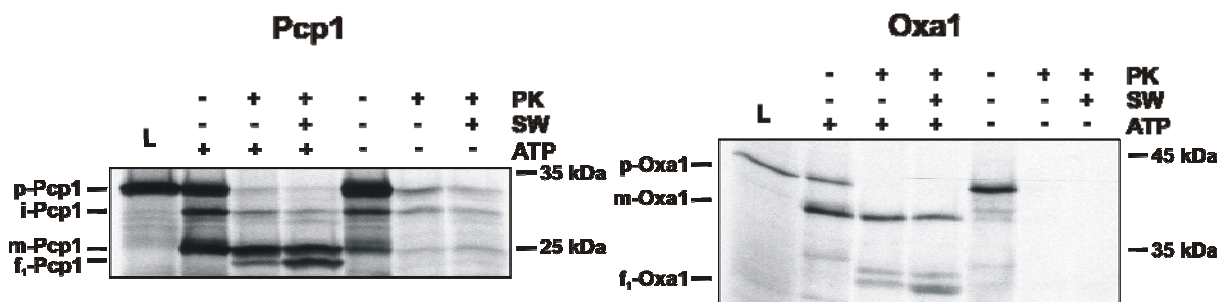


Abb. 3.2.10: Die Biogenese von Pcp1 ist ATP-abhängig. Import-Experimente mit [³⁵S] markierte Vorstufenproteinen von Pcp1 und Oxa1 wurden mit ATP-depletierten (- ATP) und unbehandelten Wildtyp-Mitochondrien (+ ATP) durchgeführt. Die korrekte Lokalisation in den Mitochondrien wurden mit Proteinase K Behandlung (PK) mit und ohne osmotisches Schwellen (SW) überprüft. (L, Vorstufensyntheseansatz; p, Vorstufenprotein; m, prozessierte Wildtyp-Größe; f, Fragment)

Eine Abhängigkeit vom Import-Motor und damit von ATP ist nur für Substrate des TIM23-Translokase-Komplexes bekannt. Damit wird der Biogeneseweg von Pcp1 über die TIM23-Translokase indirekt über die Abhängigkeit von ATP und Ssc1 bekräftigt.

3.2.4.4 Anhand des Hydrophobizitätsprofils wird Pcp1 bis zum letzten hydrophoben Segment in die Matrix transloziert

Für die Biogenese mitochondrialer Innenmembranproteine sind drei verschiedene Sortierungswege beschrieben worden. Besonders hydrophobe Proteine, wie die Proteine der Carrier-Familie (Aac2), werden über den TIM22-Komplex in die innere Membran inseriert (Sirrenberg et al., 1996), (Endres et al., 1999). Alternativ können monotopie Proteine durch einen ‚Stop-transfer‘ Mechanismus lateral in die innere Membran entlassen werden (Glaser et al., 1990), (Glick et al., 1992). Der dritte bekannte Mechanismus ist der vollständige Transfer des Vorstufenproteins in die Matrix, die Insertion erfolgt aus der Matrix in die Innenmembran in einer vom Oxa-Komplex abhängigen Reaktion (konservative Biogenese) (Hartl et al., 1987), (Herrmann et al., 1997), (Herrmann and Neupert, 2003). Wie die TIM23-Translokase zwischen einem ‚Stop-Transfer‘ Substrat und einem für die konservative Sortierung bestimmten Substrat unterscheidet, ist nicht genau bekannt. Jedoch wurden für die Erkennung drei verschiedene mögliche Mechanismen beschrieben. Zum einen sollen die Transmembran-Domäne flankierende Ladungen einen Arrest der Translokation (D-Laktatdehydrogenase, (Rojo et al., 1998)) unterstützten. Weiterhin wurde vor kurzem die Abhängigkeit der Translokation von einer Kombination von Prolinresten und der Hydrophobizität der Transmembrandomäne beschrieben (Meier et al., 2005). Entsprechend ist eine hohe Hydrophobizität und die Abwesenheit von Prolinresten in einer Transmembrandomäne ein häufig beobachtetes Charakteristikum für einen ‚Stop-Transfer‘. Proline dagegen können einen Arrest selbst von stark hydrophoben Segmenten verhindern. Um zu untersuchen, ob ein ‚Stop-Transfer‘ Mechanismus für die Biogenese von Pcp1 möglich ist, wurden die hydrophoben Segmente von Pcp1 auf ihre Hydrophobizität und Anzahl an Prolinen untersucht.

Durch die nach Kyte und Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982) ermittelten Hydrophobizitäten für die vermuteten Transmembransegmente von Pcp1 scheint es, entsprechend den Daten von Meier *et al.*, kein ‚Stop-Transfer‘-Signal beim Pcp1 zu geben (Tab. 3.2.1). Die beiden hydrophoben Segmente, die die höchsten Hydrophobizitätswerte aufweisen und damit potentielle Kandidaten für einen ‚Stop-Transfer‘ sind, haben Prolinreste in der Sequenz, die einen Arrest verhindern könnten (Tab. 3.2.1). Von der Vorhersage ausgehend scheint daher der konservative Sortierungsweg für Pcp1 wahrscheinlich. Dies bedeutet, dass das Pcp1-

3 Ergebnisse

Vorstufenprotein zunächst in die Matrix transloziert wird und anschließend, vermutlich mit der Hilfe des OXA1-Komplexes, in die Innenmembran inseriert wird.

Da aber nicht nur die Hydrophobizitäten und die Abwesenheit von Prolinen alleine für einen Arrest verantwortlich sind, sondern auch, wie oben bereits erwähnt, die Anzahl der die hydrophoben Segmente flankierenden Ladungen (Rojo et al., 1998), wurden diese für die Biogenese-Vorhersage berücksichtigt. Dabei fallen besonders die sechs positiven Ladungen am C-Terminus von Pcp1 auf. Auch wenn aufgrund der Hydrophobizitäts/Prolin-Vorhersage kein Stop-Transfer Signal gefunden werden konnte, so scheint jedoch aufgrund der Akkumulation von positiven Ladungen am C-Terminus ein Arrest der siebten Transmembrandomäne möglich.

TMD	Sequenzen	Hydrophobizität w: 5/17	Prolinreste	C-terminale Ladungen
1	LGSMTILGLSLMAGIYF	2,32 / 1,635 (T/X)	0 (A)	2 + 1 - (A)
2	NLVYALLGINVAVFGLWQL	2,7 / 1,688 (X/X)	0 (A)	5 + 1 - (A)
3	IIGSAFESHQEFWHLG	2,5 / 1,147 (X/T)	0 (A)	0 + 0 - (T)
4	SNFFSLYMNSAIAGSLFSLWY	1,78 / 1,259 (T/T)	0 (A)	2 + 0 - (A)
5	PSLGASGALFGVLGCFSYLFP	2,8 / 1,629 (X/X)	2 (T)	1 + 0 - (A)
6	PVPGGAWVAFLASVAWNAA	3,48 / 2,094 (A/A)	2 (T)	1 + 0 - (A)
7	FDYAAHLGGSMGMVLYGWYIS	2,28 / 0,859 (T/T)	0 (A)	6 + 1 - (A)

Tabelle 3.2.1: **Hydrophobizitäten der Transmembrandomänen von Pcp1.** Die Hydrophobizität der einzelnen Transmembrandomänen wurden nach Kyte und Doolittle ermittelt. Dabei wurden Rahmen (w) mit 5 und 17 Aminosäuren verwendet. Aufgrund der ermittelten Hydrophobizitäten wurde nach Meier *et al.* entweder ein Transfer (T) oder Arrest (A) für das hydrophobe Segment vorhergesagt. Konnte anhand der Hydrophobizität keine genaue Vorhersage getroffen werden, so blieb diese unbestimmt (X). Zusätzlich wurden die Anzahl der Proline im hydrophoben Segment und die C-terminalen Ladungen bestimmt. Daraus abgeleitete Vorhersagen wurden analog zur Hydrophobizität mit T, A oder X beurteilt.

3.2.5.1 Der C-Terminus von Pcp1 gelangt während der Biogenese nicht in die Matrix

Um jedoch experimentell zu untersuchen, ob ein ‚Stop-Transfer‘-Mechanismus bei der Biogenese von Pcp1 vorliegt, wurden in die Schlaufe zwischen der zweiten und der dritten Transmembran (Pcp1 TMD2-TCS-TMD3) sowie an den C-Terminus (Pcp1 C-term TCS) eine TEV-spezifische Schnittstelle (TCS) eingeführt (Abb. 3.2.12) (Dougherty and Semler, 1993). Zusätzlich wurde in diesen Stämmen eine TEV-Protease exprimiert, die entweder über eine Su9-Präsequenz aus *Neurospora crassa* in die Matrix transportiert oder durch eine Cytb₂-Präsequenz aus *S.cerevisiae* in den Intermembranraum transloziert wird. Anhand von spezifischen proteolytischen Fragmenten kann somit gezeigt werden, in welchem der beiden Kompartimente sich der jeweilige Proteinabschnitt mit der TCS befunden hat. In Hefe wurde diese Strategie bereits *in vivo* erfolgreich zur Bestimmung der Lokalisation und Topologie von

peroxisomalen und mitochondrialen Proteinen angewandt (Faber et al., 2001), (Wong et al., 2003), (Kondo-Okamoto et al., 2003).

Die beiden TCS-Konstrukte von Pcp1 wurden zunächst alleine in den Deletionsstamm ($\Delta pcp1$) transformiert. Beide Varianten werden ausreichend synthetisiert (Abb. 3.2.12) und sind in Bezug auf die Generierung von s-Mgm1 funktionell (Abb. 3.2.11). Demnach wird die Biogenese und die Funktion von Pcp1 durch die Einführung der TCS nicht beeinträchtigt.

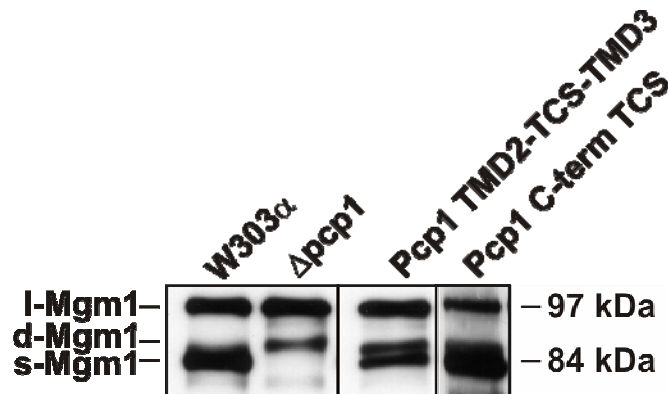


Abb. 3.2.11: Die Insertion einer spezifischen TEV Proteasen Schnittstelle (TCS; TEV cleavage site) in Pcp1 hat keine Auswirkungen auf die Prozessierung von Mgm1. In die Schleifenregionen zwischen der zweiten und dritten vorhergesagten Transmembrandomäne sowie am C-Terminus wurden jeweils eine TCS-Sequenz eingeführt. Um die Funktionalität dieser Konstrukte zu untersuchen, wurde die Entstehung von s-Mgm1 überprüft. Es wurden Gesamtzellextrakte der Transformanten über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immundekoration analysiert. In den die Konstrukte exprimierenden Stämmen sind deutlich die lange (I-Mgm1) und die kurze Form von Mgm1 (s-Mgm1) zu erkennen. Zusätzlich konnte eine unspezifische Abbaubande (d-Mgm1), in der Deletionsmutante ($\Delta pcp1$) sowie in den Stämmen mit TCS-Konstrukt detektiert werden. Zum Vergleich dienten Extrakte des Wildtyp W303 α und der Deletionsmutante $\Delta pcp1$.

Die Pcp1-TCS-Konstrukte wurden zusammen mit der matrix- oder intermembranlokalisierten TEV-Protease im $\Delta pcp1$ -Stamm exprimiert. Die Expression der beiden TEV-Proteasen wird über einen Gal₁₀-Promotor reguliert. Von diesen Stämmen wurden Mitochondrien aus glukose- (-Gal) und galaktosehaltigen (+Gal) Flüssigkulturen isoliert und über SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Das Pcp1-TMD2-TCS-TMD3 Konstrukt wurde nur durch die in der Matrix lokalisierte Su9-TEV-Protease prozessiert, jedoch nicht durch das Cytb₂-TEV-Konstrukt, welches sich im Intermembranraum befindet (Abb. 3.2.12 A). Dies zeigt, dass dieser Teil von Pcp1 durch die im IMR gelegene TEV-Protease (Cytb₂-TEV) nicht erreicht wird. Demnach hält sich dieser Teil vermutlich nur kurzzeitig, während des Imports, im Intermembranraum auf und kann dabei nicht von der TEV im IMR prozessiert werden. Dagegen ist dieser Abschnitt in der Matrix von der TEV erreichbar. Dies bestätigt das zuvor vorgestellte Topologiemodell.

Im Vergleich dazu wird das Pcp1 C-term TCS-Konstrukt nur durch die im Intermembranraum befindliche Protease (Cytb₂-TEV) geschnitten (Abb. 3.2.12 B). Eine

3 Ergebnisse

solche Zugänglichkeit dieses Proteinabschnitts für diese TEV-Protease stimmt ebenfalls mit der oben beschriebenen Topologie überein. Dagegen kann die in der Matrix lokalisierte TEV-Protease (Su9-TEV) den C-Terminus von Pcp1 nicht prozessieren, dieser scheint daher nicht in die Matrix zu gelangen. Mit diesem Ergebnis wird der postulierte Arrest von Pcp1 in der TIM23-Translokase während des Imports bekräftigt.

Als Prozessierungskontrolle dienten HA-TCS-GFP-Konstrukte, die ebenfalls durch die Präsequenzen von Su9 und Cytb₂ in die beiden Subkompartimente importiert werden. Diese Konstrukte wurden analog zu den Pcp1-TCS-Konstrukten mit den TEV-Proteasen im $\Delta pcp1$ -Stamm exprimiert (Kondo-Okamoto et al., 2003). Bei Kolokalisation der HA-TCS-GFP Konstrukte mit den entsprechenden TEV-Proteasen wurden diese induktionsabhängig (+Gal) prozessiert (Abb. 3.2.12 C). Waren dagegen die HA-TCS-GFP Konstrukte in ein anderes Kompartiment als die TEV-Protease lokalisiert worden, so kam es nur zu einem geringen Teil zur Prozessierung.

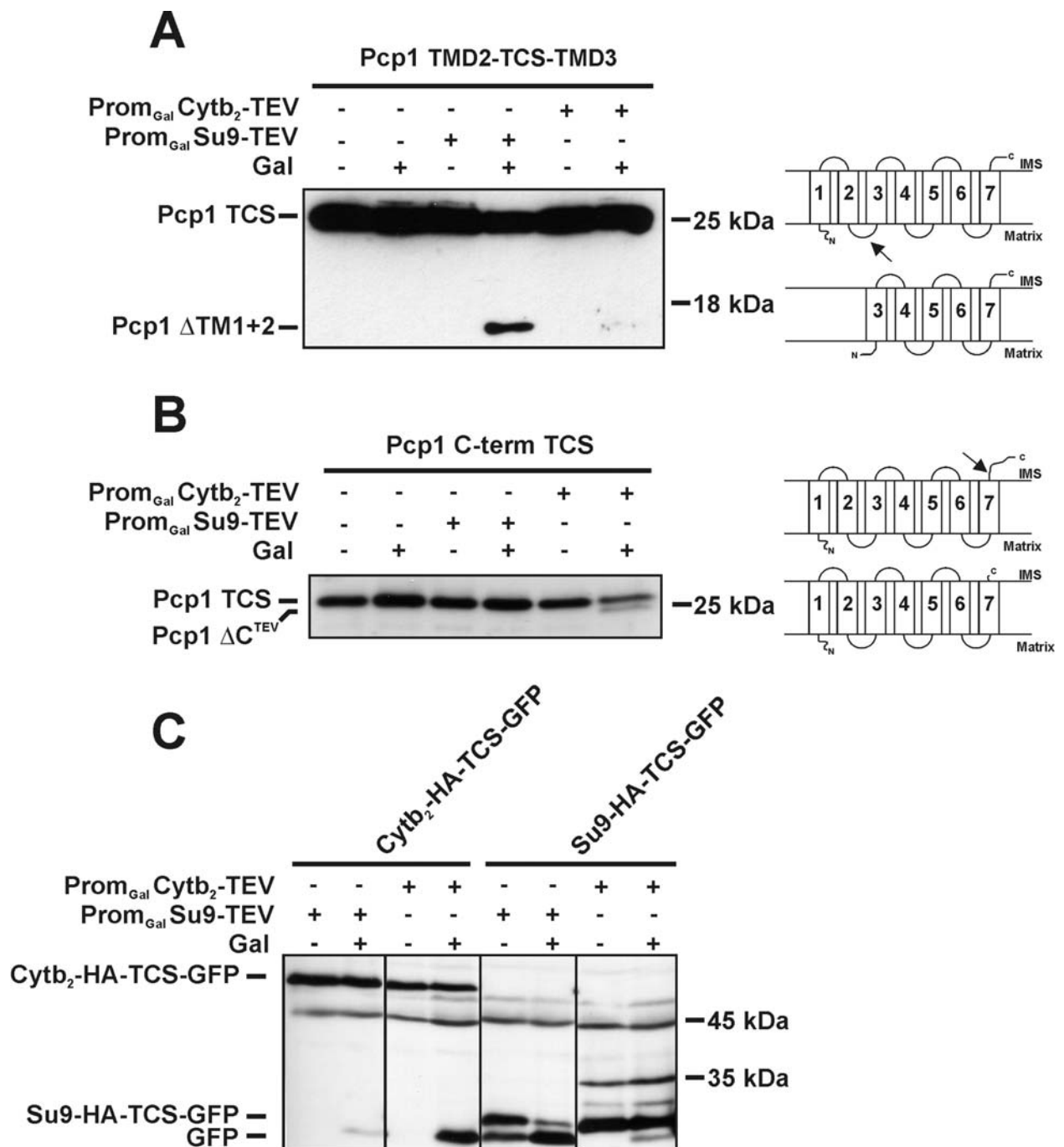


Abb.3.2.12: **Der C-Terminus von Pcp1 wird nicht von der Matrix-lokalisierten TEV-Protease geschnitten.** Zur genauen Analyse der Pcp1 Biogenese wurden Pcp1-Konstrukte verwendet, die in der Schleifenregion zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (Pcp1 TMD2-TCS-TMD3) und am C-Terminus (Pcp1 C-term TCS) eine TEV-Protease Schnittstelle enthielten (TCS). Durch Koexpression zweier unterschiedlich lokalisierter TEV-Proteasen konnten die jeweiligen Kompartimente, in denen sich die beiden Proteinabschnitte längere Zeit befunden haben ermittelt werden. Eine der TEV-Proteasen wurde mit einer Su9-Präsequenz aus *N.crassa* in die Matrix lokalisiert, während beim anderen Konstrukt die Protease durch eine Cytb₂-Präsequenz von *S.cerevisiae* in den Intermembranraum lokalisiert wurde. Die Expression der Proteasen wurde über den Gal₁₀-Promotor reguliert. Die kotransformierten Stämme wurden sowohl in glukosehaltigen (-Gal) als auch galaktosehaltigen (+Gal) Medium angezogen und die Mitochondrien isoliert. Zur Kontrolle wurden HA-TCS-GFP-Konstrukte, die ebenfalls über die Präsequenzen von Su9 und Cytb₂ in die entsprechenden Kompartimente transloziert wurden mit den Protease-Konstrukten koexprimiert. In der Zeichnung ist die TEV-Protease-Schnittstelle mit einem Pfeil markiert.

3.2.6 Funktionsanalyse der vorhergesagten katalytischen Triade

Die Sequenzanalysen von Rhomboid-ähnlichen Proteasen untereinander führten zur Identifizierung von drei stark konservierten Aminosäuren (Asn, Ser, His), die möglicherweise die katalytische Triade von Rhomboidproteasen darstellen (Koonin et al., 2003), (Urban et al., 2002b), (Urban et al., 2001).

3.2.6.1 Untersuchung der an der proteolytischen Aktivität von Pcp1 beteiligten Aminosäuren

Um die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von Pcp1 von den drei konservierten Aminosäuren zu testen, wurden entsprechende Punktmutationen (N202A, S256A und H313A) erzeugt. Die Vektoren mit den veränderten Pcp1-Konstrukten wurden in den $\Delta pcp1$ -Stamm transformiert. Zum Vergleich wurde Pcp1_{wt} in den $\Delta pcp1$ -Stamm transformiert. Für die Analyse wurden Gesamtzellextrakte der verschiedenen Punktmutanten über SDS-PAGE aufgetrennt und die Prozessierung von Mgm1 über Immundekoration nachgewiesen. Gesamtzellextrakte vom Wildtyp W303 α und dem Deletionsstamm ($\Delta pcp1$) dienten dem direkten Vergleich. Beim Wildtyp W303 α konnte die prozessierte Form von Mgm1 (s-Mgm1) deutlich nachgewiesen werden (Abb. 3.2.13). Der Pcp1-Deletionsstamm wies dagegen eine stärkere nicht prozessierte l-Mgm1-Bande auf und eine zusätzliche Abbaubande (d-Mgm1), die etwas höher als die prozessierte s-Mgm1-Bande migrierte. Eine dem Wildtyp entsprechende Prozessierung von Mgm1 wurde sowohl bei der Überexpression von Wildtyp Pcp1 im pYES2 Vektor, als auch bei der Expression mit dem endogenen Promotor (pRS315) beobachtet. Wurden jedoch die Aminosäuren Ser-256 oder His-313 gegen Alanin ausgetauscht, so konnte keine prozessierte Form von Mgm1 nachgewiesen werden. Der Austausch der dritten konservierten Aminosäure Asn-202 gegen Alanin führte zwar zur Reduktion der Prozessierung von Mgm1, dennoch wurde ein Teil umgesetzt. Die Abbaubande d-Mgm1, wie sie im $\Delta pcp1$ -Stamm detektiert wurde, konnte in diesem Stamm auch nachgewiesen werden. In Pcp1 scheinen daher die beiden Aminosäuren Ser-256 und His-313 für die Aktivität essentiell, während die Aminosäure Asn-202 nur partiell notwendig ist.

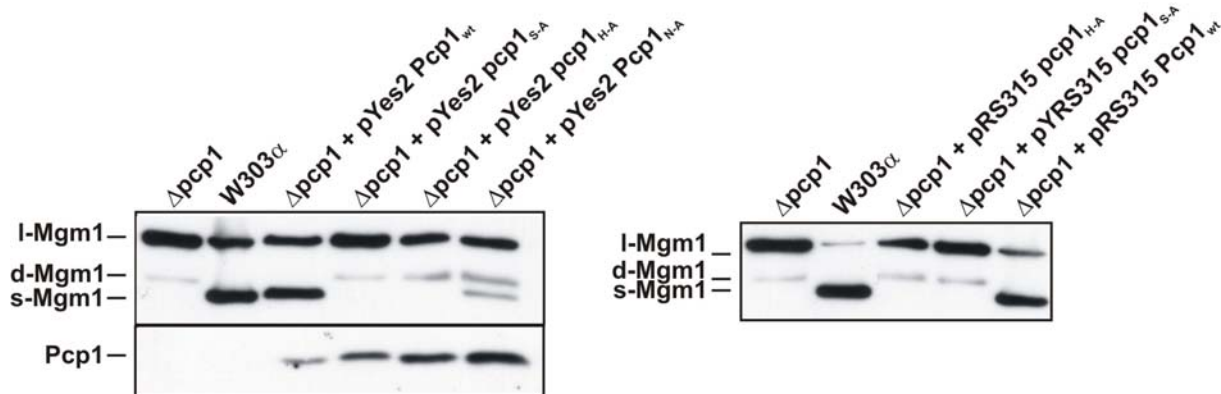


Abb. 3.2.13: **Serin-256 und Histidin-313 bilden die katalytische Diade von Pcp1.** Pcp1 wurde in die Vektoren pYES2 und pRS315 kloniert. Im pYES2 Vektor wurden die Konstrukte über den Gal₁₀-Promotor überexprimiert, während in den pRS315-Vektor zusätzlich der endogene Promotor kloniert wurde. Die Überexpression von Pcp1 konnte durch Immundekoration gezeigt werden (links-unten). Aufgrund des niedrigen endogenen Gehalts an Pcp1 kann es in Gesamtzellextrakten nicht detektiert werden. Die Aminosäuren der vermuteten katalytischen Triade wurden einzeln gegen Alanine ausgetauscht und die resultierenden Konstrukte im $\Delta pcp1$ -Stamm exprimiert. Die Prozessierung von Mgm1 wurde über Western-Blot und Immundekoration analysiert.

3.2.7 Der C-Terminus mit seinen positiven Ladungen ist nicht essentiell für die Prozessierung von Mgm1

Der C-Terminus von Pcp1 enthält eine Häufung an positiven Ladungen. Eine mögliche Funktion könnte im oben diskutierten Arrest der letzten Transmembrandomäne bei der Biogenese von Pcp1 sein. Weiterhin könnten die positiven Ladungen bei der Substraterkennung oder bei der Bindung des Substrates eine Funktion übernehmen.

Um dies zu untersuchen wurde der komplette C-Terminus nach der siebten Transmembrandomäne entfernt. Lediglich eine positive Ladung, ein endogenes Lysin, mit dem die Transmembrandomäne abschließt, wurde in der Sequenz belassen. Das resultierende Konstrukt, Pcp1- Δ C, wurde in der Deletionsmutante ($\Delta pcp1$) exprimiert und die Prozessierung von Mgm1 analysiert. Für die Analyse wurden Gesamtzellextrakte über SDS-PAGE aufgetrennt und Mgm1 durch Immundekoration detektiert. Zum Vergleich wurden Gesamtzellextrakte vom Wildtyp W303 α und vom Deletionsstamm $\Delta pcp1$ aufgetragen. Im Wildtyp ist deutlich die prozessierte s-Mgm1 Bande zu erkennen. Auch in dem Pcp1- Δ C exprimierenden Stamm kann die Prozessierung von Mgm1 beobachtet werden (Abb. 3.2.14). Die Abbau-Bande von Mgm1 (d-Mgm1) wurde nur im Deletionsstamm detektiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Deletion des C-Terminus keinen Einfluss auf die Biogenese und Aktivität von Pcp1, zumindest in Bezug auf Mgm1, hat.

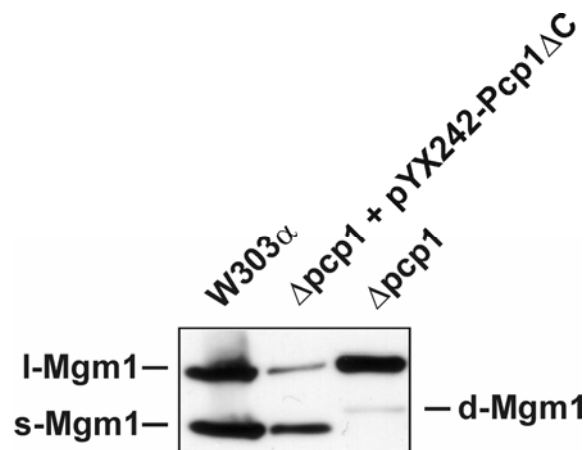


Abb. 3.2.14: **Die Deletion des C-Terminus hat keinen Effekt auf die Aktivität von Pcp1.** Die letzten 17 C-terminalen Aminosäuren von Pcp1 wurden deletiert und das Konstrukt wurde in der Pcp1-Deletionsmutante exprimiert. Mit Gesamtzellextrakten wurde die Funktionalität im Bezug auf die Prozessierung von Mgm1 analysiert. Zum Vergleich dienten Gesamtzellextrakte vom Wildtyp W303 α und vom $\Delta pcp1$ Stamm.

Die Substraterkennung oder die Bindung des Substrates im Fall von Mgm1 über die positiven Ladungen kann somit ausgeschlossen werden. Obwohl die Deletion der positiven Ladungen des C-Terminus primär keinen Effekt auf die Prozessierung des Substrates (Mgm1) hat, wäre es dennoch denkbar, dass ein Teil des Pcp1- Δ C aufgrund der Hydrophobizität der letzten Transmembrandomäne korrekt in der Membran arretiert wird. Eine geringe Menge des korrekt inserierten Pcp1 würde ausreichen Mgm1 zu prozessieren. Entsprechend wäre ein Teil des Pcp1- Δ C in die Matrix mislokalisiert. Um dies zu untersuchen wurden Mitochondrien aus dem Pcp1- Δ C exprimierenden Stamm isoliert und einer Carbonat-Extraktion unterzogen. Lösliche Proteine der Matrix befinden sich im Überstand (S) und membranassoziierte Proteine im Sediment (P). Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und über Immundetektion mit dem N-terminalen Antikörper analysiert. Zum Vergleich wurden Mitochondrien aus dem Wildtyp W303 α und dem Δmip Stamm aufgetragen. Es konnte bei keinem der Proben ein Anteil des Pcp1 im Überstand mit den löslichen Proteinen gefunden werden (Abb.3.2.15). Dies bedeutet entweder, dass die siebte Transmembrandomäne mit dem letzten Lysinrest für einen vollständigen Arrest ausreicht oder Pcp1 in der Matrix, aufgrund seines stark hydrophoben Charakters, eine starke Tendenz zum Aggregieren aufweist. Eine Aggregation kann nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch weniger wahrscheinlich, da aggregiertes Pcp1 in anderen Experimenten mit Immundekoration nicht detektiert werden konnte.

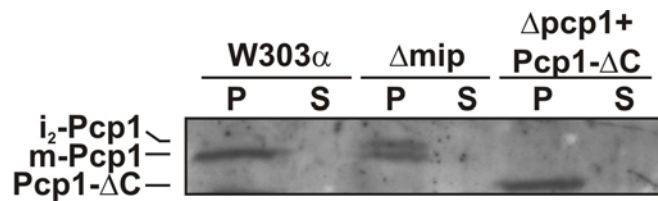


Abb. 3.2.15: **Pcp1- ΔC wird vollständig in die Membran inseriert.** Über eine Carbonat-Extraktion wurden isolierte Mitochondrien aus Wildtyp W303 α , Δmip und dem $\Delta pcp1$ -Stamm, der das Pcp1- ΔC Konstrukt exprimiert, in lösliche (S) und membranassoziierte (P) Proteine aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinfractionen über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immundekoration gegen den N-terminalen Bereich von Pcp1 analysiert.

Um die Nachweisgrenze des Pcp1- ΔC in der Fraktion der löslichen Proteine zu senken, wurde radioaktiv markiertes Pcp1- ΔC in isolierte Wildtyp-Mitochondrien importiert. Zusätzlich wurde das Vorstufenprotein in Mitochondrien, die aus dem Oxa1-Deletionsstamm isoliert worden waren, importiert. In die Matrix transloziertes Pcp1- ΔC sollte bei einem möglichen konservativen Sortierungswegs zunächst in die Matrix transloziert werden. Anschließend würde die Insertion in die Innenmembran über einen Oxa1-abhängigen Schritt erfolgen. Folglich wäre der Anteil an Pcp1- ΔC in der Fraktion der löslichen Proteine beim Import in Mitochondrien des $\Delta oxa1$ -Stammes höher, als mit Wildtyp-Mitochondrien.

Im Importexperiment kann dieselbe Prozessierung der Präsequenz des C-terminal deletierte Pcp1-Konstrukts wie beim Wildtyp Pcp1 beobachtet werden. Eine leichte Reduktion der Import-Effizienz kann bei den $\Delta oxa1$ -Mitochondrien im Vergleich mit den Wildtyp-Mitochondrien beobachtet werden. Dies kann auf die unterschiedliche Qualität der einzelnen Präparationen zurückgeführt werden. Die Intensitäten der in der Fraktion der löslichen Proteine (S) detektieren Banden zwischen dem Import-Experiment mit Mitochondrien aus dem Wildtyp (W303 α) und der Oxa1-Deletionsmutante weisen unter Berücksichtigung der generellen Import-Effizienz keine Unterschiede auf (Abb. 3.2.16). Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vivo* Experimente, dass für einen möglichen Arrest der siebten Transmembrandomäne die positiven Ladungen des C-Terminus nicht essentiell sind.

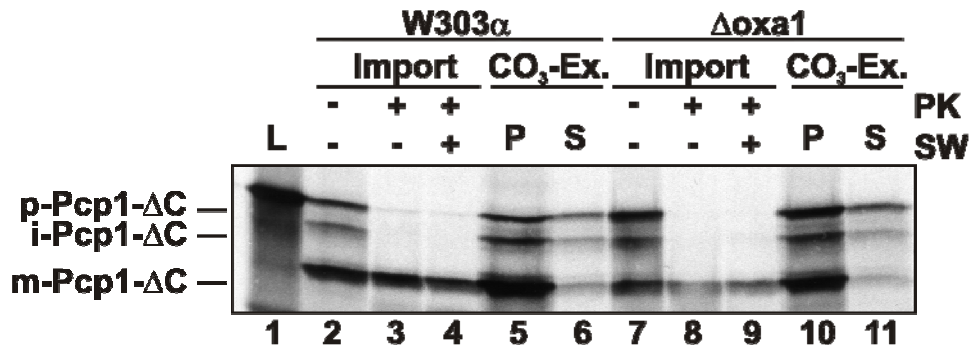


Abb. 3.2.16: Die Biogenese von Pcp1- Δ C in Δ oxa1 unterscheidet sich nicht von der im Wildtyp. Import-Experimente mit radioaktiv markiertem Pcp1- Δ C-Vorstufenprotein wurden mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp W303 α und dem Δ oxa1-Stamm durchgeführt. Das Vorstufenprotein wurde analog zu den vorherigen Experimenten mit Wildtyp-Pcp1 durch die Proteasen MPP und MIP prozessiert (Spuren 2, 3, 4 bzw. 7, 8, 9). Die Import-Effizienz unterscheidet sich nur geringfügig zwischen den Mitochondrien des Wildtyps und der Δ oxa1-Mutante (Spuren 2 und 7). Zusätzlich wurde nach dem Import eine Carbonat-Extraktion durchgeführt, durch die membranassoziierte Proteine (P) von löslichen Proteinen (S) getrennt wurden. Auch in der Fraktion der löslichen Proteine der Carbonatextraktion kann beim Import in die Mitochondrien der Oxa1-Deletionsmutante im Vergleich mit dem Wildtyp (5 und 11) keine erhöhten Mengen von Pcp1- Δ C detektiert werden.

3.2.8 Pcp1 befindet sich in einem 70-100 kDa großen Komplex

Um einen detaillierteren Einblick in die Funktionsweise von Pcp1 zu bekommen, wurde zunächst durch Größenausschlußchromatographie die Größe vom nativen Pcp1-Komplex untersucht. Dazu wurden Mitochondrien in DDM-haltigen Puffer solubilisiert und mit einer Superose-6-Säule aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurden Standardproteine unter gleichen chromatographischen Bedingungen einer Fraktionierung unterzogen. Die Proteine der mitochondrialen Fraktionen wurden durch TCA-Fällung aufkonzentriert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde der Blot mit Antikörpern gegen Mgm1 und Pcp1 dekoriert. Der Hauptteil von Pcp1 wurde in Fraktionen gefunden, die einer Protein- oder Komplexgröße von ca. 100 kDa entspricht (Abb. 3.2.17). Pcp1 kann daher in einem Komplex aus mehreren Untereinheiten vorliegen. Die Größe könnte einem Homotetramer (100 kDa) entsprechen. Auch ein Komplex mit einem oder mehreren anderen Proteinen kann nicht ausgeschlossen werden. Für die beiden Mgm1-Isoformen konnten zwei unterschiedliche Maxima gefunden werden. Zum einen befindet sich die lange Isoform von Mgm1 (l-Mgm1) in einem Komplex von ca. 500 kDa, während die kurze Isoform (s-Mgm1) sich in einem Komplex von ca. 200 kDa befindet. Pcp1 wird jedoch mit keinem der Isoformen von Mgm1 in einem Komplex gefunden.

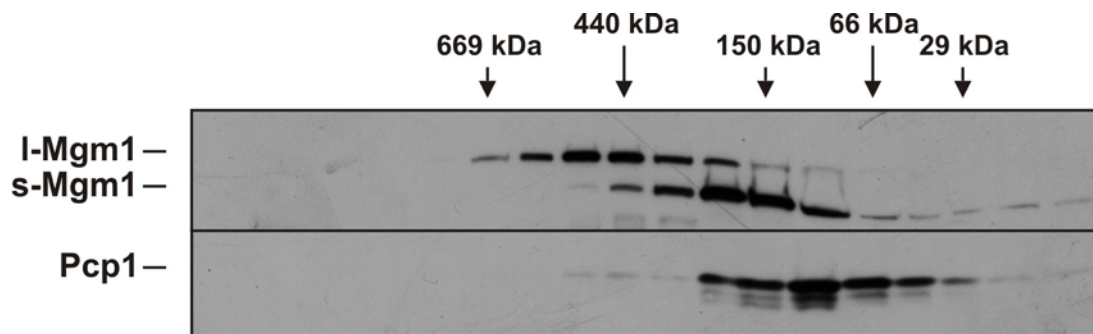


Abb. 3.2.17: **Pcp1 eluiert bei einer Größenausschlußchromatographie in einer Fraktion, die einem ca. 100 kDa-Komplex entspricht.** In DDM-haltigem Puffer solubilisierte Wildtyp-Mitochondrien wurden einer Größenausschlußchromatographie unterzogen. Die Proteine der Fraktionen wurden über TCA-Fällung angereichert und anschließend mit SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Durch Dekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Pcp1 wurden die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt dieser Proteine ermittelt.

3.2.9 Die Koexpression zweier Punktmutanten komplementiert nicht die Funktion von Pcp1

Bei einer Komplexbildung mit mehreren Pcp1-Untereinheiten, wäre eine Ausbildung des katalytischen Zentrums durch zwei Pcp1-Proteine denkbar. Um eine solche Möglichkeit zu untersuchen wurden die Punktmutationen (Asn-202, Ser-256 und His-313) von Pcp1 im Deletionsstamm koexprimiert und die proteolytische Aktivität durch Detektion von s-Mgm1 analysiert (Abb. 3.2.18). Durch die Expression der beiden nicht funktionellen Punktmutanten könnte sich eine funktionelle katalytische Diade formieren und damit zur Prozessierung von Mgm1 führen. Eine solche Aktivität ließ sich in den koexprimierenden Stämmen nicht nachweisen. Die bereits bei der einfachen Expression der N202A-Mutation beobachtete schwache Prozessierung konnte in den Stämmen, die dieses Konstrukt enthielten nachgewiesen werden. Dies schließt eine Komplexbildung aus mehreren Pcp1-Untereinheiten nicht aus, jedoch kann sich ein funktionelles katalytisches Zentrum nicht durch die Koexpression bilden.

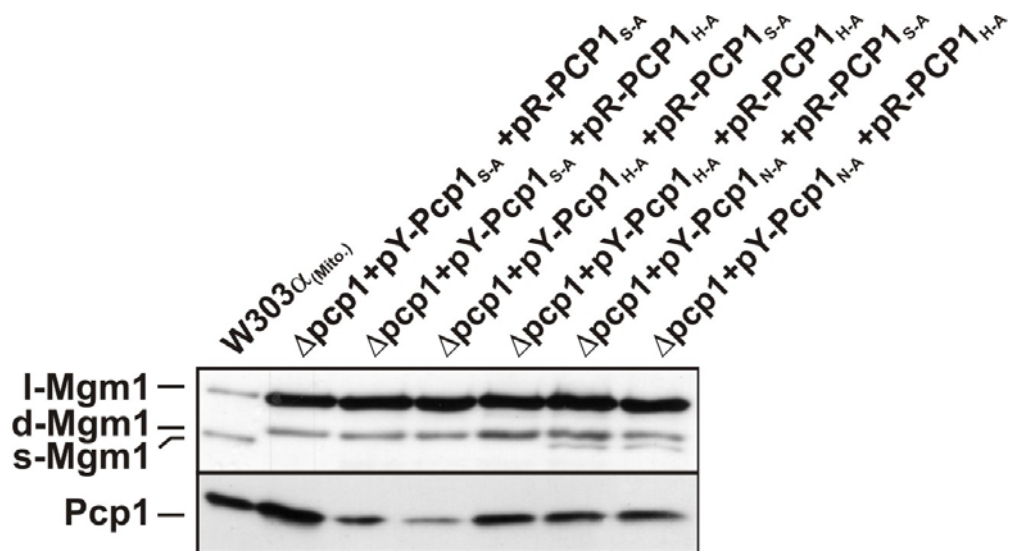


Abb. 3.2.18: **Koexpression der Pcp1-Punktmutanten.** Um die Ausbildung des katalytischen Zentrums durch Aneinanderlagerung von zwei Pcp1-Untereinheiten zu untersuchen, wurden verschiedene Pcp1-Punktmutanten-Konstrukte gleichzeitig im Deletionsstamm exprimiert. Bei den Punktmutanten war jeweils eine der drei im katalytischen Zentrum vorhergesagten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht worden. Die Konstrukte waren zum einem im pYes2 (pY)- (Gal₁₀-Promotor) aber auch im pRS315 (pR)-Vektor (endogener Promotor) kloniert worden. Die Zellen wurden auf galaktosehaltigem Medium angezogen und deren Gesamtzellextrakt auf ein Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden 50 µg isolierter Mitochondrien des Wildtyps W303α aufgetragen. Analysiert wurde der Western-Blot mit Antikörpern gegen Mgm1 und Pcp1.

4 Diskussion

4.1 Destabilisierung der Suprakomplexe der F_1F_0 -ATP Synthase führt zu reduzierter Bioenergetisierung der Mitochondrien

Die fundamentale Rolle der F_1F_0 -ATP Synthase bei der Synthese der Hauptmenge an zellulären ATP ist detailliert beschrieben worden (Velours and Arselin, 2000), (Pedersen et al., 2000), (Senior et al., 2002). Weniger klar dagegen ist die Funktion des F_1F_0 -ATP Synthase-Komplexes beim Erhalt der Ultrastruktur von Mitochondrien. Ohne die Fähigkeit, des Komplexes Oligomere ausbilden zu können, kommt es zu einer veränderten Cristaemorphologie. Die Morphologie der Innenmembran bestimmter Deletionsstämme ($\Delta su e$, $\Delta su g$, Su 4- $\Delta TM1$) wurde als zwiebelmusterartig beschrieben. (Paumard et al., 2002), (Soubannier et al., 2002), (Giraud et al., 2002), (Arselin et al., 2003), (Arselin et al., 2004). Jedoch ist der eigentliche Mechanismus, über den die Oligomerisierung des F_1F_0 -ATP Synthase-Komplexes zur Ausbildung der Cristae führt, genauso unbekannt, wie der Nutzen der Ultrastruktur für die allgemeinen Funktionen der Mitochondrien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der C-terminalen ‚coiled-coil‘-Domänen der F_1F_0 -ATP Synthase-Untereinheit *e* und der Effekt der Oligomer-Destabilisierung auf den bioenergetischen Zustand der Mitochondrien untersucht.

4.1.1 Funktionsanalyse der ‚coiled-coil‘-Domänen

Zur Funktionsanalyse der vorhergesagten ‚coiled-coil‘-Domäne der Untereinheit *e* (Su *e*) wurden C-terminal verkürzte Varianten von Su *e* erzeugt und im Deletionsstamm exprimiert. Eine vollständige Komplementation des Deletionsphänotyps konnte durch die Expression des Wildtyp-Konstruktes erzielt werden. Die beiden verkürzten Varianten (Su *e*₁₋₆₅ und Su *e*₁₋₄₆) zeigten im Vergleich mit der Deletionsmutante eine Stabilisierung der F_1F_0 -ATP Synthase-Dimere in BN-PAGE-Experimenten. Die Stabilität der Oligomere/Dimere war jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp weit geringer. Dies zeigt eine stabilisierende Funktion der ‚coiled-coil‘-Domänen von Su *e* auf die Oligomerbildung. Die Expression der teildeletierten Su *e*-Konstrukte war ausreichend, die im Deletionsstamm veränderten Ultrastrukturen der Mitochondrien wieder herzustellen. Des Weiteren zeigten diese Stämme im Gegensatz zu den Deletionsstämmen keine Neigung zum Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die mit Hämagglutinin (HA) markierten ähnlichen Su *e*-Deletionskonstrukten durchgeführt worden sind (Everard-Gigot et al., 2005). Weiterhin konnte die starke Abhängigkeit der Oligomerisierung aufgrund des in der Transmembran gelegenen konservierten Dimerisierungsmotiv

GXXXG gezeigt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Arselin et al., 2003).

Prinzipiell wirken sowohl die ‚coiled-coil‘-Domänen als auch die Transmembrandomäne stabilisierend auf die Suprakomplex-Bildung. Jedoch sind die Auswirkungen der ‚coiled-coil‘-Deletionen wesentlich schwächer als die Modifikation des GXXXG-Motivs in der Transmembrandomäne, die dem Phänotyp des $\Delta su e$ Stammes gleicht. Gerade diese abgeschwächte bioenergetische Phänotyp, der keinen Verlust der mtDNA aufweist, lässt eine genaue Untersuchung der Vorteile des oligomeren Zustands der F_1F_0 -ATP Synthase zu.

Der destabilisierende Effekt auf die Suprakomplexe scheint zu einer erhöhten Dynamik der F_1F_0 -Dimere zu führen. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Stabilität der Untereinheit *g* einem erhöhten Proteinabbau unterliegt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Destabilisierung zu einer Verschiebung des Assemblierungsgleichgewichts in Richtung Monomere führt. Dabei werden vermehrt nicht angelagerte dimerspezifische Untereinheiten (*Su e* und *Su g*) (Arnold et al., 1998) einem proteolytischen Angriff durch Proteasen ausgesetzt. Dies wird durch die starke Abhängigkeit der Untereinheiten *Su e* und *Su g* bestätigt (Arselin et al., 2004). Das Ausmaß der Oligomerbildung in den ‚coiled-coil‘-Mutanten reicht unter normalen Wachstumsbedingungen aus Cristaestrukturen zu bilden. Jedoch reichte die Stabilität des $Su e_{1-46}$ -Konstrukts nicht, die Cristaestrukturen in allen Zellen zu erhalten.

Eine veränderte Struktur des mitochondrialen Netzwerks aufgrund der Oligomer-Destabilisierung konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks wurde durch Expression eines mitochondrial lokalisierten Grün-Fluoreszierenden-Proteins (mtGFP) untersucht. Damit wurden farbstoffspezifische und membranpotentialabhängige Signalschwankungen umgangen. Bei der Verwendung des membranpotentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin B-Hexylester konnten keine verlässlichen Aussagen über die Morphologie des Netzwerks getroffen werden. Die beobachtete diffuse Färbung kann mit dem *in vitro* ermittelten reduzierten Membranpotential erklärt werden. Dies steht im Widerspruch zu einer anderen Studie, in der eine veränderte Morphologie des mitochondrialen Netzwerkes beobachtet worden war (Everard-Gigot et al., 2005). Allerdings wurde in dieser Studie der membranpotentialabhängige Farbstoff DiOC₆ verwendet.

4.1.2 Auswirkung der reduzierten Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomere auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe

Bereits in anderen Arbeiten wurde ein reduziertes Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen für F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomer defiziente Stämme beschrieben ($\Delta su e$, $\Delta su g$, *Su 4- Δ TM1*, *Su e_{18A}*) (Paumard et al., 2002), (Soubannier et al., 2002), (Arselin et al., 2003). Dieser Wachstumsdefekt wurde zum

einen mit einer verstärkten Neigung, die mtDNA zu verlieren, erklärt (Arnold et al., 1998), (Soubannier et al., 2002), zum Teil aber auch mit einer reduzierten Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase (Boyle et al., 1999). Die unterschiedlichen Erklärungsansätze beruhen auf stark abweichenden Werten bei der Bestimmung des Anteils an Zellen, die ihre mtDNA verlieren. So wiesen 41 % der Zellen einen teilweisen oder kompletten Verlust der mtDNA beim Su *e*-Deletionsstamm auf (Paumard et al., 2002), während beim Verlust von Su *g* nur 1-2 % rho^{0/-}-Zellen beobachtet wurden (Boyle et al., 1999). Auch beim Verlust der ersten Transmembrandomäne der Untereinheit 4 der F₁F₀-ATP Synthase, die auch für die Oligomerbildung notwendig ist, wurden bei 32 % der Zellen ein Verlust der mtDNA festgestellt (Soubannier et al., 2002).

Diese starken Abweichungen sind womöglich auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten dazu beitragen, die kontroverse Diskussion aufzuklären. Die Deletionsstämme der Untereinheiten *e* oder *g* wiesen 9-14 % rho^{0/-}-Zellen auf und liegen damit zwischen den veröffentlichten Werten. Da die Bildung von rho^{0/-}-Zellen stark von den Wachstumsbedingungen abhängt, sind solche Abweichungen nicht verwunderlich.

Die im Vergleich mit dem Wildtyp reduzierten Cytochrom *c* Oxidase-Aktivitäten der Deletionsstämme können alleine durch den Verlust der mtDNA bedingt sein. Die Su *e*₁₋₆₅ oder Su *e*₁₋₄₆ exprimierenden Stämme, die keinen Verlust der mtDNA aufweisen, hatten mit einer Aktivität um 85% des Wildtyps eine durchschnittlich geringere Cytochrom *c* Aktivität. Diese Reduktion war jedoch nicht signifikant. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit keinen signifikanten direkten Effekt auf die Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase durch den Verlust der Untereinheiten *e* oder *g* zeigen, kann ein solcher nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen, die gleichermaßen keine signifikanten Aktivitätsänderungen der Atmungskettenkomplexe durch verminderte Oligomerisierung der F₁F₀-ATP Synthase zeigen konnten (Arnold et al., 1998), (Soubannier et al., 2002), (Arselin et al., 2003), (Arselin et al., 2004).

Die Integrität der Innenmembran war in den verschiedenen Deletionsmutanten unverändert und kann als Ursache für den Wachstumsphänotyp ausgeschlossen werden. Dies steht im Einklang mit anderen Studien (Giraud et al., 2002), (Soubannier et al., 2002), (Paumard et al., 2002), (Arselin et al., 2003).

Des Weiteren wurde über einen weiten pH-Bereich kein verminderter inhibitorischer Effekt durch das F₁F₀-ATP Synthase Inhibitorprotein Inh1 gefunden. Ähnliche Ergebnisse stammen von einer anderen Arbeitsgruppe, die jedoch lediglich bei zwei pH-Extrema gemessen hatte (Dienhart et al., 2002).

4.1.3 Abhängigkeit des Membranpotentials in Mitochondrien von der Suprakomplex-Bildung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Abhängigkeit des Membranpotentials vom oligomeren Zustand der F_1F_0 -ATP Synthase gezeigt werden. Das Membranpotential wurde an isolierten Mitochondrien durch Aufnahme von membranpotential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen gemessen. Dabei korrelierte die Höhe des Membranpotentials mit der Stabilität der Oligomere. Zusätzlich kann von einem veränderten Membranpotential auch *in vivo* ausgegangen werden, da Morphologiestudien mit membranpotentialabhängigen Farbstoffen lediglich diffuse Signale lieferten. Das reduzierte Membranpotential könnte eine direkte Ursache für das beobachtete verlangsamte Wachstum, sowohl der Deletions- als auch der Teildeletionsmutanten, sein. Die ‚coiled-coil‘-Teildeletionsstämme Su e₁₋₆₅ und Su e₁₋₄₆ weisen im Gegensatz zu den Deletionsmutanten keine Neigung zum Verlust der mtDNA auf, haben jedoch eine entsprechend der Deletion und damit der Stabilität der Oligomere reduzierte Wachstumsgeschwindigkeiten. Dagegen spielt die Bildung von rho^{0/-}-Zellen für das verzögerte Wachstum keine Rolle. Auch ein Effekt dieser Destabilisierung auf die Ultrastruktur der Mitochondrien erwies sich als sekundär. Erst ein stark reduziertes Membranpotential und eine komplette Destabilisierung, wie es bei den Deletionsmutanten beobachtet wurde, hat einen Effekt auf die Cristae-Struktur und den Erhalt der mtDNA.

Ein solcher Zusammenhang von Membranpotential und Erhalt der mtDNA konnte indirekt über Fusionsexperimente gezeigt werden. Die Fusion von Mitochondrien in Säugerzellen (Legros et al., 2002), (Ishihara et al., 2003), (Meeusen and Nunnari, 2005) und in der Hefe *S.cerevisiae* (Malka et al., 2005) wurde durch die Aufhebung des Membranpotentials inhibiert. Zusätzlich verlieren fusionsdefiziente Zellen ihre mtDNA (Nunnari et al., 1997), (Rapaport et al., 1998). Daher wäre es möglich, dass ein Unterschreiten eines bestimmten Membranpotentialschwellwertes zum Fragmentieren der Mitochondrien führt und dies in Folge der Morphologieänderung den Verlust der mtDNA bewirkt. In Bezug auf diese Arbeit reicht die Veränderung der Ultrastruktur, der Verlust der Cristaestrukturen, aus einen partiellen Verlust der mtDNA zu bewirken. Die Reduktion des Membranpotential dagegen fällt nicht unter den Schwellenwert, bei dem es zu einer Fragmentierung der Mitochondrien käme.

Zusammengefasst geht aus dieser Arbeit hervor, dass der primären Effekt der reduzierten Oligomerstabilität Auswirkungen auf das Membranpotential hat, die erst sekundär zusammen mit der veränderten Ultrastruktur zum Verlust der mtDNA führt. Diese Ergebnisse konnten nur durch die besonderen Eigenschaften der Teildeletionen erzielt werden, die ein reduziertes Membranpotential in Verbindung mit einer Destabilisierung der Suprakomplexe aufweisen ohne die mtDNA zu verlieren.

4.1.4 Optimierung bioenergetischer Prozesse in Mitochondrien durch die Ausbildung von OXPHOS-Suprakomplexe

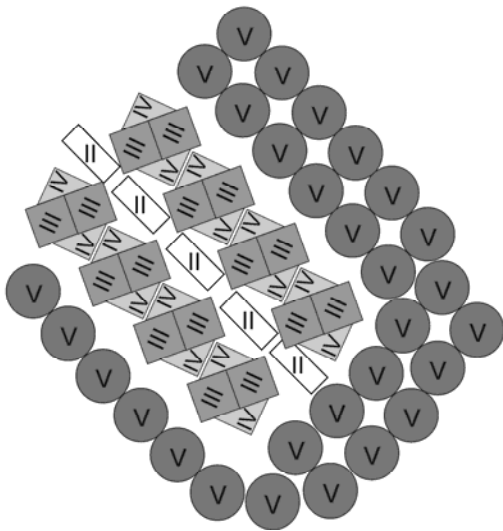
Anhand der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente kann die reduzierte Wachstumsrate sowie das reduzierte Membranpotential nicht durch geringere Aktivitäten der OXPHOS-Komplexe erklärt werden. Auch eine erhöhte mtDNA-Verlustrate sowie eine unspezifische Protonentranslokation können als Ursache für das reduzierte Membranpotential ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist die Summe mehrerer allein gesehen nicht signifikanter Aktivitätsänderungen die Ursache für den Phänotyp der Mutanten. Insbesondere der Ausschluss von sekundär Effekten, wie sie durch den Verlust der mtDNA auftreten, sind für die Interpretation essentiell. Damit können die Ergebnisse als klares Indiz für eine Suprakomplex abhängige Optimierung des energetischen Zustands der Mitochondrien betrachtet werden. Dies ist mit einem Modell, bei dem die Komplexe der OXPHOS durch einen höheren Grad der Ordnung effizienter arbeiten, zu vereinbaren.

In diesem Modell bildet das F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomer eine Grundstruktur, an der die Assemblierung der Atmungskettenkomplexe zur Bildung eines Suprakomplexes erfolgen kann. Demnach führt die reduzierte Oligomerbildung der F_1F_0 -ATP Synthase zu einer insgesamt höheren Fluidität und Dynamik der inneren Membran und dies wiederum beeinflussen die Organisation und Mobilität der anderer Membrankomplexe. Eine erhöhte Dynamik der F_1F_0 -ATP Synthase-Dimere aufgrund der Suprakomplexdestabilisierung konnte durch die erhöhte Abbaurrate der Untereinheit *g* gezeigt werden. Mikrodomänen aus OXPHOS-Komplexen der Innenmembran würden durch veränderten Membran-Eigenschaften und die erhöhte Dynamik zerstört. Im Speziellen kann eine gestörte Anordnung der Atmungskettenkomplexe, des ADP/ATP-Transporters und der F_1F_0 -ATP Synthase zueinander zu einer reduzierten Substratweiterleitung oder einem gehemmter kooperativen Effekt führen. Dieses wiederum führt zu einem reduzierten Elektronenfluss innerhalb der Atmungskette oder zu einer ungünstigen ‚feedback‘-Regulation. Dadurch wirken Kontrollmechanismen erst bei einem niedrigen Membranpotential und der Protonen-Export der Atmungskettenkomplexe wird limitierend gegenüber der F_1F_0 -ATP Synthase-Aktivität. Alternativ könnte deren Synthase-Aktivität erst bei niedrigeren Membranpotential gestoppt werden. Folglich könnte nur ein gegenüber dem Wildtyp reduziertes Membranpotential aufgebaut werden. Für einen veränderten Regulationsmechanismus sprechen die Ergebnisse der maximalen Atmungsaktivität, die bei gleicher Kopplung unverändert ist. Demnach arbeiten die Atmungskettenkomplexe unter Substratsättigungsbedingungen gleich gut wie der Wildtyp. Ohne unspezifische Protonentranslokation sollten diese ein gleich großes Membranpotential aufbauen können, es sei denn der Protonengradient wird ungleich stark (unkontrolliert) genutzt.

4 Diskussion

Eine solche Interpretation ist ausreichend, um die beobachtete Reduktion des Membranpotentials zu erklären. Gleichzeitig verdeutlicht dies eine neue grundlegende bioenergetische Funktion der F_1F_0 -ATP Synthase Suprakomplex-Bildung. Eine solche Funktion der OXPHOS-Suprakomplexe wurde bereits in anderen Arbeiten vorgeschlagen (Schagger and Pfeiffer, 2000), (Schagger, 2002), jedoch konnte erst mit diesen Mutanten eine von sekundären Effekten freie Interpretation vorgenommen werden. Als Nachteil dieser Mutanten muss der milde Phänotyp im Vergleich mit der Deletionsmutante eingeräumt werden. Damit fallen die Effekte auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe für eine genaue Analyse zu gering aus. Eventuelle Effekte könnten daher aufgrund methodischer Schwächen unterschätzt oder übersehen werden.

Suprakomplex-Bildung der OXPHOS-Komplexe



Veränderte Anordnung der OXPHOS-Komplexe ohne F_1F_0 -ATP Synthase Dimere

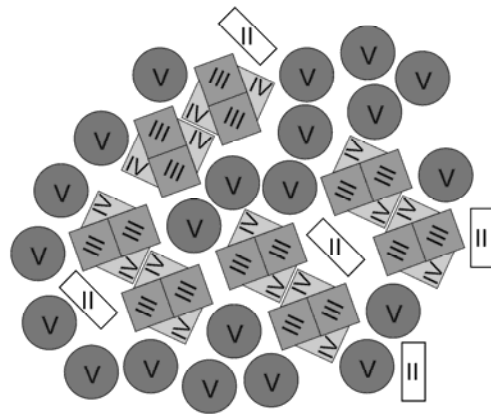


Abb. 4.1.1 **Modell der F_1F_0 -ATP Synthase abhängigen OXPHOS-Suprakomplex-Bildung.** Eine stabile Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP Synthase könnte zur Ausbildung von Mikrodomänen aus OXPHOS-Komplexen führen (links). Beim Verlust der F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomere, wie es für die Deletionsmutanten der Untereinheiten *e* oder *g* beschrieben wurde, kommt es zur erhöhten Fluidität und Flexibilität der Innenmembran und die Mikrodomänen der OXPHOS-Komplexe können nicht mehr ausgebildet werden. Über die Mikrodomänen vermittelte Substratweitergabe oder kooperative Effekte führen zu verlangsamer Substratumsetzung. Aufgrund der verlangsamt Substratumsetzung wird der Protonen-Export der Atmungskettenkomplexe limitierend in Bezug auf die Nutzung des Gradienten durch die F_1F_0 -ATP Synthase. Somit ist ein Aufbau eines normalen Membranpotentials nicht möglich. Alternativ könnten auch regulatorische Rückkopplungen durch den Verlust der Mikrodomänen betroffen sein und eine normale Kontrolle der OXPHOS-Komplexe wäre nicht mehr möglich. (II, Komplex II (Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase); III, Komplex III (Ubichinol-Cytochrom *c* Oxidoreduktase); IV, Komplex IV (Cytochrom *c* Oxidase); V, Komplex V (F_1F_0 -ATP Synthase)).

4.2 Die Rhomboidprotease Pcp1

Auch Mgm1 wurde als Protein, das an der Cristaebildung beteiligt ist vorgeschlagen. Dieses Protein kommt in *S.cerevisiae* Mitochondrien in zwei Isoformen vor, l-Mgm1 und s-Mgm1. Die kurze s-Mgm1-Form entsteht durch die Prozessierung durch die Rhomboidprotease Pcp1 (Herlan et al., 2003), (McQuibban et al., 2003), (Sesaki et al., 2003). Anhand der Sequenz-Homologien wurde Pcp1 der Familie der Rhomboidproteasen zugeordnet. Diese sind membranständige Serinproteasen, die ihre Substrate innerhalb eines Transmembransegments schneiden (Koonin et al., 2003). Mitglieder der Rhomboidproteasen können in allen drei Reichen des Lebens gefunden werden (Koonin et al., 2003). Für Pcp1 wurde ein zweites Substrat, Ccp1, welches am Abbau von Sauerstoffradikalen im IMR beteiligt ist beschrieben (Esser et al., 2002).

4.2.1 Lokalisation und Topologie von Pcp1

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation in der Zelle durch Zellfraktionierung und Subfraktionierung von Mitochondrien des endogenen Pcp1 bestimmt. Pcp1 ist ein integrales Membranprotein der inneren mitochondrialen Membran. Dies steht im Einklang mit der Lokalisation der beiden Substrat-Proteine, Mgm1 (Herlan et al., 2003), (McQuibban et al., 2003) und Ccp1 (Esser et al., 2002). Des Weiteren unterstützen die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Import-Experimente die anhand des endogenen Proteins gemachte Lokalisierung. Eine mitochondriale Lokalisation wird auch durch eine anderen Studie unterstützt in der durch *in vitro* Import-Experimente eine membranpotentialabhängige Translokation von Pcp1 in Mitochondrien gezeigt wurde (Steinmetz et al., 2002). In dieser Arbeit wird zusätzlich zur Lokalisation in der Innenmembran auch die Topologie von Pcp1 genauer beschrieben. So befindet sich der C-Terminus im IMR, da dieser proteolytisch zugänglich wird, nachdem selektiv die äußere Membran entfernt wurde. Zusammen mit der Prozessierung der N-terminalen Signalsequenz durch die in der Matrix lokalisierten Proteasen MPP und MIP geht aus diesen Daten eine $N_{in}-C_{out}$ -Topologie für Pcp1 hervor.

Anhand der Homologien zu anderen Mitgliedern der Rhomboidprotease-Familie, für die eine ‚Core‘-Domäne mit sechs Transmembransegmenten charakteristisch ist, und den Hydrophobizitäts-Vorhersagen für Pcp1, durchspannt Pcp1 die innere Membran siebenfach. Diese Vorhersagen bestätigen die $N_{in}-C_{out}$ -Topologie, die eine ungerade Anzahl an Transmembrandomänen bedingt. Zusätzlich konnte durch spezifische proteolytische Prozessierungsexperimente mit der TEV-Protease die Topologie zusätzlich untermauert werden. Dazu wurden spezifische TEV-Protease-Schnittstellen (TCS) in die zweite Schleifenregion und am C-Terminus inseriert. Durch spezifische Lokalisation der TEV-Protease entweder in die Matrix oder den

Intermembranraum, konnte gezeigt werden, dass die zweite Schleifenregion in der Matrix und der C-Terminus im IMR liegt.

4.2.2 Biogenese-Weg von Pcp1

Zur Bestimmung des Biogeneseweges wurden Import-Experimente mit radioaktiv markierten Vorstufenproteinen durchgeführt. Experimente mit Tim23 depletierten Mitochondrien konnte die Beteiligung des TIM23-Translokasekomplexes bei der Biogenese von Pcp1 zeigen. Die N-terminal gefundene Präsequenz von Pcp1 unterstützt die gefundene Abhängigkeit von der TIM23-Translokase. Zusätzliche Bestätigung für diesen Insertionsweg konnte durch die Abhängigkeit vom Importmotor gezeigt werden, der mit der TIM23-Translokase assoziiert ist (Stuart et al., 1994b), (Neupert and Brunner, 2002). Die Notwendigkeit des Importmotors für die Biogenese von Pcp1 wurde anhand von Import-Experimenten mit temperatursensitiven Ssc1-Mutanten durchgeführt (Gambill et al., 1993). Ssc1 ist ein mitochondriales Hitzeschockprotein (mtHsp70) und eine Komponente des Importmotors. Es dient der aktiven (ATP-abhängig) Translokation von Proteinen in die Matrix oder in die innere Membran über den TIM23-Komplex. Damit im Einklang steht auch die Beobachtung, dass Pcp1 ATP-abhängig importiert wird.

Dieser TIM23-Translokase/Importmotor vermittelter Biogenese-Weg von Pcp1 lässt jedoch offen, ob das gesamte Protein zunächst in die Matrix transloziert und anschließend in die Innenmembran inseriert wird oder ob es während des Transfers von Pcp1 in die Matrix zu einem Arrest kommt. Theoretisch könnten somit schrittweise die Transmembransegmente in die Membran über die TIM23-Translokase inseriert werden. Letzteres Szenario wäre jedoch unwahrscheinlich, da es bisher kein Beispiel für ein direkt über den TIM23-Komplex inseriertes Substrat, das mehr als eine Transmembran-Domäne enthält, gibt.

Die Biogenese von Pcp1 über den konservativen Sortierungsweg, bei dem das Protein zunächst vollständig in die Matrix transloziert wird und dann in die Innenmembran inseriert wird, scheint am wahrscheinlichsten. Ein solcher Insertionsweg wird durch das evolutionär konservierte Vorkommen von Rhomboid-proteasen in Bakterien wie in höheren Säugern unterstützt (Koonin et al., 2003), (Hartl et al., 1986). Mitochondrien gelten als Endosymbionten bakteriellen Ursprungs (Gray et al., 1999) was anhand vieler Parallelen zwischen dieser Organelle und den Bakterien belegt ist. Anhand topologischer Untersuchungen von prokaryontischen Membranproteinen konnte eine spezifische Orientierung der Schleifenregionen mit erhöhter positiver Nettoladung im Zytoplasma von Bakterien gezeigt werden („Positiv-inside-rule“) (Heijne, 1986), (von Heijne, 1989), (Boyd and Beckwith, 1990). Eine dieser Regel entsprechende Orientierung konnte auch für einige mitochondriale Proteine gezeigt werden (Jennings, 1989). Insbesondere Membranproteine, die mitochondrial kodiert sind oder über den

konservativen Sortierungsweg in die Innenmembran inseriert werden, zeigen eine solche Orientierung (Rojo et al., 1999). Für Pcp1 in Hefe deutet die Verteilung der positiven Ladungen, die sich hauptsächlich in den Schleifenregionen befinden, die aufgrund der N_{in} - C_{out} -Topologie in die Matrix ragen, auf einen konservativen Sortierungsweg hin (Jennings, 1989), (Gavel and von Heijne, 1992), (Rojo et al., 1999).

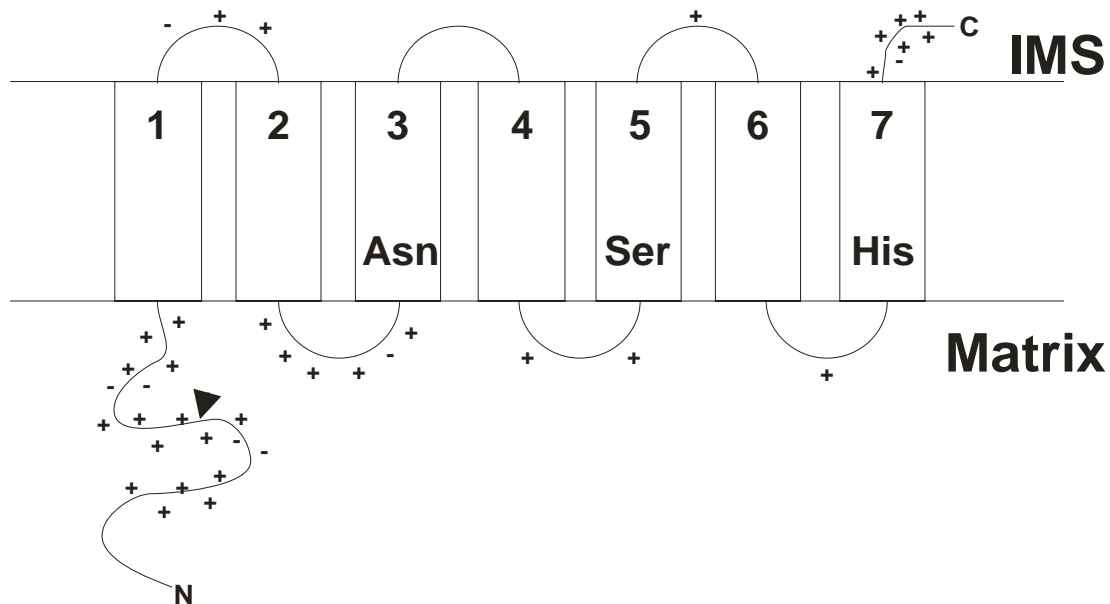


Abb. 4.2.1 **Positive Ladungen treten in den Schleifenregionen von Pcp1 bei einer N_{in} - C_{out} -Topologie vermehrt in den Schleifenregionen auf, die in die Matrix ragen.** Der starke evolutionäre Erhalt der Rhomboidproteasen in allen drei Reichen des Lebens sowie die evolutionäre Ähnlichkeit zwischen Mitochondrien und Bakterien entsprechend der Endosymbionten-Theorie, legen eine konservative Biogenese von Pcp1 nahe. Ebenso unterstützen die positiven Ladungen der Schleifenregionen in der Matrix in Bezug auf die 'positive-inside-rule' einen konservativen Sortierungs-Weg. Lediglich der positiv geladene C-Terminus befindet sich im Intermembranraum (IMS).

Bei einem konservativen Sortierungsmechanismus wird das Vorstufenprotein zunächst in die Matrix transloziert (Poyton et al., 1992), (Herrmann and Neupert, 2003). Ein Arrest, wie er für manche einfach die Innenmembran durchspannende Proteine beschrieben wurde, findet nicht statt. Für einen Halt des Transfers sind die Eigenschaften der Transmembrandomäne ausschlaggebend. Eine höhere Hydrophobizität begünstigt einen Stopp des Transfers, während Proline in der Sequenz für eine komplette Translokation sorgen (Meier et al., 2005). Anhand der Aminosäuresequenz wurden die hydrophoben Segmente auf ein solches ‚Stop-Transfer‘/Arrestsignal analysiert. Die Hydrophobizität und der Prolingehalt der Transmembransegmente von Pcp1 weisen auf keinen Arrest des Proteins hin. Lediglich die siebte Transmembrandomäne könnte aufgrund des positiv geladenen C-Terminus arretiert werden. Die Deletion der am C-Terminus akkumulierten positiven Ladungen hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Insertion und Aktivität von Pcp1.

Durch Insertion von spezifischen TEV-Protease Schnittstellen in die zweite Schleifenregion und am C-Terminus von Pcp1, verbunden mit spezifisch in die Matrix

oder in den Intermembranraum lokalisierten TEV-Proteasen (Kondo-Okamoto et al., 2003), konnte das Modell N_{in}-C_{out}-Topologie bekräftigt werden. Die C-terminale TCS (,TEV cleavage side') wurde nur durch die TEV-Protease des Intermembranraums geschnitten und wurde nicht von der in der Matrix gelegenen prozessiert. Dies weist auf einen Arrest von Pcp1 in der TIM23-Translokase und eine laterale Insertion in die Innenmembran hin. Dies widerspricht einem konservativen Sortierungsweg. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der C-Terminus für eine effiziente Prozessierung durch die in der Matrix gelegene TEV-Protease zu kurz in diesem Kompartiment befindet. Ein möglicher Arrest der siebten Transmembrandomäne wird durch die ,positive inside rule' unterstützt, da die positiven Ladungen des C-Terminus einem Export aus der Matrix widersprechen. Weiterhin konnte in keinem der durchgeführten Experimente ein lösliches Intermediat von Pcp1 gefunden werden, diese stete starke Assoziation mit der Membran während der Biogenese kann durch einen Arrest während des Imports in der Translokase erklärt werden. Allerdings konnte auch nach der Deletion des C-Terminus kein lösliches Intermediat gefunden werden. Entweder reicht hier die Hydrophobizität der siebten Transmembrandomäne für eine Arrest aus oder ein mögliches lösliches Intermediat unterliegt einem starken Abbau. Fest steht, dass ein Teil des Pcp1 trotz fehlendem C-Terminus funktionell in die Innenmembran inseriert wird und dieses für die Prozessierung von Mgm1 ausreicht.

Zusammengefasst scheint ein konservativer Sortierungsweg wahrscheinlich. Dennoch kann ein Arrest während des Imports von Pcp1 nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Daten dieser Arbeit lassen eine klare Unterscheidung dieser beiden Sortierungswege nicht zu.

Möglich wäre auch ein neuer Sortierungsweg, bei dem ein Arrest der siebten Transmembrandomäne einer Sortierung der anderen sechs Transmembrandomänen vorausgeht. Damit wäre eine membrannahe Lokalisation des Vorläuferproteins gewährleistet und die weiteren Transmembrandomänen würden Oxa1 vermittelt oder durch eine unbekanntes Translokase in die Innenmembran inseriert. Alternativ wäre eine schrittweise Insertion der hydrophoben Segmente durch die TIM23-Translokase denkbar.

4.2.3 Analyse der proteolytischen Aktivität von Pcp1

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Mitglieder der Rhomboidproteasen-Familie identifizierte zwei charakteristische Merkmale dieser Proteinfamilie. Zum einen die konservierte ,Core'-Domäne, die sechs Transmembransegmente umfasst, und zum anderen eine katalytische Triade aus Asparagin, Serin und Histidin (Urban et al., 2001), (Urban et al., 2002b), (Koonin et al., 2003). Beim Pcp1 entsprechen die Aminosäuren Asn-202, Ser-256 und His-313 dieser Triade (Koonin et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Pcp1-Aktivität eine funktionelle Abhängigkeit vom Ser-256 und His-303 gezeigt. Wurden diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht, so konnte keine Prozessierung von Mgm1 zur kurzen Isoform (s-Mgm1) mehr beobachtet werden. Dagegen konnte ein Teil von Mgm1 zu s-Mgm1 prozessiert werden, wenn die Aminosäure Asparagin-202 gegen Alanin ausgetauscht worden war. Pcp1 scheint daher im Gegensatz zur vorhergesagten katalytischen Triade über eine katalytische Diade zu verfügen, wie sie auch für bakterielle Rhomboidproteasen in neueren Studien gezeigt werden konnten (Maegawa et al., 2005), (Lemberg et al., 2005). Eine beobachtete Reduktion der Prozessierung von Mgm1 bei der Punktmutation (N202A) könnte auf eine Konformationsänderung zurückzuführen sein. Eine solche Konformationsänderung kann einen Effekt auf die Substraterkennung oder auf die Orientierung des Substrates im katalytischen Zentrum haben. Dies ist nur eine mögliche Erklärung für die partielle Prozessierung in dieser Mutante.

Die auffallende Häufung positiver Ladungen am C-Terminus, deren Deletion keinen Effekt auf den Arrest der Translokation von Pcp1 in die Matrix gezeigt hatte, könnte auch für die Substraterkennung essentiell sein, insbesondere da in der Sequenz von Mgm1 eine Häufung negativer Ladungen in einem Intermembranraum gelegenen Proteinabschnitt identifiziert werden konnte. Daher wurde die Prozessierung von Mgm1 in der Pcp1- Δ C-Mutante untersucht. Es konnte jedoch keine verminderte Bildung der kurzen Form s-Mgm1 detektiert werden. Damit kann eine Funktion für die Substraterkennung in Bezug auf Mgm1 ausgeschlossen werden. Eine Funktion der positiven Ladungen für ein bis jetzt nicht identifiziertes Substrat oder für Ccp1 wäre dennoch möglich.

4.2.4 Komplexbildung von Pcp1

Außer den entsprechenden Substraten der Rhomboidproteasen wurden bis jetzt keine weiteren Interaktionspartner gefunden. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Pcp1 in einem Größenausschlusschromatographie-Lauf mit einem oder mehreren Proteinen in einem Komplex mit einer Größe von ca. 100 kDa eluiert und damit in einem homooligomeren oder heterooligomeren Komplex vorliegen kann. Eine geringere Größe des Pcp1-Komplexes kann aufgrund der Bildung von Detergenz-Micellen, in denen auch mehrere unabhängige Pcp1-Komplexe enthalten sein können, nicht ausgeschlossen werden.

Die Koexpression von jeweils zwei verschiedenen Punktmutationen des katalytischen Zentrums führten nicht zur Prozessierung von Mgm1. Ein in *trans* zusammengesetztes katalytisches Zentrum aus zwei Pcp1-Untereinheiten ist damit unwahrscheinlich. Eine Assemblierung mehrerer Pcp1-Untereinheiten in einen

4 Diskussion

homodimeren, homotrimeren oder homotetrameren Komplex kann aber nicht ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Einfluss der F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomerisierung auf den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien

Eine wichtige Funktion der Mitochondrien besteht in der Bereitstellung von ATP, dessen Synthese durch die OXPHOS-Komplexe der Innenmembran bewerkstelligt wird. Zusätzlich besitzt die F_1F_0 -ATP Synthase eine strukturgebende Aufgabe. Dazu bildet diese Oligomere aus, die für die Ausbildung von Cristaestrukturen essentiell sind. Insbesondere die oligomer-spezifischen Untereinheiten Su_e und Su_g sind dafür, nicht jedoch für die enzymatische Aktivität der F_1F_0 -ATP Synthase, notwendig.

Der Einfluss der F_1F_0 -ATP Synthase Assemblierung auf den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien wurde in dieser Arbeit untersucht. Teildeletionen der C-terminalen ‚coiled-coil‘-Domänen von Su_e weisen eine verringerte Stabilität der Oligomere auf. Diese Destabilisierung geht mit einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und der Wachstumsrate einher, ist jedoch für die Ausbildung von Cristaestrukturen hinreichend. Des Weiteren sind die enzymatischen Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe, die Integrität der Innenmembran sowie die Verlustrate der mtDNA in diesen Mutanten nicht beeinträchtigt. Der beobachtete Phänotyp ist daher nicht auf Sekundäreffekte zurückzuführen.

Diese Arbeit unterstützt ein Modell, nach dem die Assemblierung der F_1F_0 -ATP Synthase zu Oligomeren für die räumliche Anordnung auch von anderen Proteinkomplexen in Form von Mikrodomänen für einen effizienten Substratumsatz während der oxidativen Phosphorylierung oder für deren Regulation notwendig ist. Somit hat die Stabilität der F_1F_0 -ATP Synthase-Oligomere einen Einfluss auf die bioenergetische Leistungsfähigkeit von Mitochondrien.

5.2 Charakterisierung der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1

Das Dynamin-ähnliche mitochondriale Protein Mgm1 kommt in zwei Isoformen vor, die möglicherweise an der Ausbildung von Cristaestrukturen beteiligt sind. Die kurze Isoform, s-Mgm1, entsteht in Abhängigkeit von der hochkonservierten Intramembran-Rhomboidprotease Pcp1. Zur genaueren Aufklärung dieser Prozessierung wurde die Topologie und Biogenese von Pcp1 ermittelt.

Pcp1 durchspannt die mitochondriale Innenmembran mit sieben Transmembrandomänen und besitzt eine N_{in} - C_{out} -Topologie. Untersuchungen zum Import von Pcp1 zeigen, dass dessen Import in die innere Membran von der TIM23-Translokase vermittelt und die mitochondriale Signalsequenz schrittweise durch die zwei Proteasen MPP und MIP entfernt wird.

Außerdem wird möglicherweise die C-terminale Transmembrandomäne von Pcp1, entsprechend einem ‚Stop-Transfer‘-Mechanismus, in der TIM23-Translokase arretiert

und anschließend lateral in die Innenmembran inseriert. Alternativ wird Pcp1 zunächst vollständig in die Matrix importiert und anschließend über den konservativen Sortierungsweg in die Innenmembran inseriert. Die bisherigen Ergebnisse lassen eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht zu.

Aufgrund von Sequenzvergleichen verschiedener Rhomboidproteasen wurden wie in anderen Serinproteasen drei konservierte Aminosäurereste als mögliche katalytische Triade postuliert. Um dies zu untersuchen, wurden diese Aminosäurereste jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Zwei dieser Punktmutationen, in Serin-256 oder Histidin-313, führen zur vollständigen Inaktivierung von Pcp1, während die Aminosäure Asparagin-202 für die Aktivität nur partiell notwendig ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 mit einer katalytischen Diade eine besondere Stellung unter den Serinproteasen einnimmt.

6 Summary

6.1 Role of oligomerisation of the F₁F₀-ATP synthase on the bioenergetic state of mitochondria

An important function of mitochondria is the production of ATP produced by OXPHOS-complexes in the inner membrane. In addition the F₁F₀-ATP synthase has a structural role. To achieve this oligomers are formed, which are essential for cristae formation. In particular subunits *Su e* and *Su g* are necessary for oligomerisation but not for the enzymatic activity of the F₁F₀-ATP synthase.

The influence of the F₁F₀-ATP Synthase oligomeric state on the bioenergetic properties of mitochondria was investigated in this study. Partial deletions of the C-terminal coiled-coil domains of *Su e* show a destabilization of the oligomeric state of the F₁F₀-ATP synthase. This is accompanied by a reduction in the membrane potential and the growth rate, but is sufficient for proper cristae formation. Further, the enzymatic activities of the respiratory chain, the integrity of the inner membrane as well as the inheritance of mtDNA is not altered in these mutants. Therefore the detected phenotype is not due to secondary effects.

These results support a model by which the assembly of the F₁F₀-ATP synthase into oligomers is necessary to form a spacial arrangement of protein complexes into microdomains. These are needed for efficient substrate conversion during oxidative phosphorylation or proper regulation of the enzyme complexes involved. In this way the stability of the F₁F₀-ATP synthase oligomers influences the bioenergetic competence of mitochondria.

6.2 Characterisation of the rhomboid protease Pcp1

The dynamin-like mitochondrial protein Mgm1 exists in mitochondria in two isoforms, both of which are postulated to participate in cristae formation. The short isoform, s-Mgm1, is strictly dependent on the processing by the highly conserved, intramembrane rhomboid protease Pcp1. For a more detailed analysis of the processing of Mgm1 the topology and the biogenesis of Pcp1 was determined.

Pcp1 is spanning the inner membrane with seven transmembrane domains and exhibits a N_{in}-C_{out}-topology. Studies on the import pathway of Pcp1 show a TIM23-translocase dependent import and a stepwise removal of the presequence by the two matrix proteases MPP and MIP.

The C-terminal transmembrane domain of Pcp1 is possibly stopped in the TIM23-translocase during import and then laterally inserted into the inner membrane. This corresponds to a stop transfer mechanism. Alternatively, Pcp1 is imported completely into the matrix and then gets inserted into the inner membrane by a conservative sorting

6 Summary

pathway. The experiments to date do not allow to distinguish between these two possibilities.

Based on a sequence alignment of different rhomboid proteases three conserved amino acids were postulated to form a catalytic triade. These amino acids were replaced by alanine to test this. Two of these residues, serine-256 and histidine-313, show complete inactivation of Pcp1 when mutated, while the amino acid asparagine-202 was only partially necessary for activity. All together, these results show that the mitochondrial rhomboid protease Pcp1 with its catalytic diade has a prominent position in the class of serine proteases.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. and 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. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. and Wissinger, B. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, **26**, 211-215.
- Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P. and Zorov, D.B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol*, **107**, 481-495.
- Arnold, I., Bauer, M.F., Brunner, M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Yeast mitochondrial F1F0-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Lett*, **411**, 195-200.
- Arnold, I. and Langer, T. (2002) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 89.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. and Schagger, H. (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J*, **17**, 7170-7178.
- Arselin, G., Giraud, M.F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Couлары-Salin, B., Schaeffer, J. and Velours, J. (2003) The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur J Biochem*, **270**, 1875-1884.
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M.F., Dautant, A., Brethes, D. and Velours, J. (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem*, **279**, 40392-40399.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G. and Pratje, E. (1994) PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet*, **245**, 272-278.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol*, **10**, 25-31.
- Beddoe, T. and Lithgow, T. (2002) Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 35-39.
- Bereiter-Hahn, J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*, **122**, 1-63.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, **27**, 198-219.
- Berger, K.H. and Yaffe, M.P. (2000) Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol*, **8**, 508-513.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F. and Forte, M. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, **26**, 112-117.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. and Di Lisa, F. (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*, **264**, 687-701.
- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. and 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.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1994) OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol*, **239**, 201-212.
- Boumans, H., Grivell, L.A. and Berden, J.A. (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem*, **273**, 4872-4877.

7 Literaturverzeichnis

- Boyd, D. and Beckwith, J. (1990) The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell*, **62**, 1031-1033.
- Boyer, P.D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta*, **1140**, 215-250.
- Boyer, P.D. (2002) Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett*, **512**, 29-32.
- Boyle, G.M., Roucou, X., Nagley, P., Devenish, R.J. and Prescott, M. (1999) Identification of subunit g of yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem*, **262**, 315-323.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Branda, S.S. and Isaya, G. (1995) Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. *J Biol Chem*, **270**, 27366-27373.
- Bruel, C., Brasseur, R. and Trumpower, B.L. (1996) Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc₁ complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 59-68.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V. and Stuart, R.A. (2002) Some of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem*, **277**, 48484-48489.
- Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (2001) The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *Embo J*, **20**, 6990-6996.
- Capaldi, R.A. and Aggeler, R. (2002) Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci*, **27**, 154-160.
- Caplan, A.J. and Douglas, M.G. (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J Cell Biol*, **114**, 609-621.
- Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O. and Isaya, G. (2000) Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem*, **275**, 41469-41475.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A.E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Truscott, K.N., Guiard, B., Pfanner, N. and Rehling, P. (2005) Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, **120**, 817-829.
- Chazotte, B. and Hackenbrock, C.R. (1989) Lateral diffusion as a rate-limiting step in ubiquinone-mediated mitochondrial electron transport. *J Biol Chem*, **264**, 4978-4985.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **275**, 18093-18098.
- Cyr, D.M., Stuart, R.A. and Neupert, W. (1993) A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **268**, 23751-23754.
- D'Silva, P.D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. and Craig, E.A. (2003) J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13839-13844.
- D'Silva, P.R., Schilke, B., Walter, W. and Craig, E.A. (2005) Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12419-12424.
- Dalbey, R.E. and Kuhn, A. (2000) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 51-87.
- Dalbey, R.E., Kuhn, A. and von Heijne, G. (1995) Directionality in protein translocation across membranes: the N-tail phenomenon. *Trends Cell Biol*, **5**, 380-383.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, **391**, 387-390.
- de Vries, S. and Marres, C.A. (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **895**, 205-239.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. and 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.
- Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W. and Rapaport, D. (2001) Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, **276**, 6.
- Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X. and Nagley, P. (2000) Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta*, **1458**, 428-442.

- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. and Stuart, R.A. (2002) Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem*, **277**, 39289-39295.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- Dougherty, W.G. and Semler, B.L. (1993) Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev*, **57**, 781-822.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Sakai, J. (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*, **272**, 12778-12785.
- Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S.W. (2002) Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3370-3375.
- Endo, T. and Kohda, D. (2002) Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 3-14.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *Embo J*, **18**, 3214-3221.
- Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G. and E., P. (2002) A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease pcp1. *J Mol Biol*, **323**, 835-843.
- Everard-Gigot, V., Dunn, C.D., Dolan, B.M., Brunner, S., Jensen, R.E. and Stuart, R.A. (2005) Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot Cell*, **4**, 346-355.
- Faber, K.N., Kram, A.M., Ehrmann, M. and Veenhuis, M. (2001) A novel method to determine the topology of peroxisomal membrane proteins in vivo using the tobacco etch virus protease. *J Biol Chem*, **276**, 36501-36507.
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M. and Dmitriev, O.Y. (2003) Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Lett*, **555**, 29-34.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **440**, 325-331.
- Fraering, P.C., Ye, W., Strub, J.M., Dolios, G., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., van Dorsselaer, A., Wang, R., Selkoe, D.J. and Wolfe, M.S. (2004) Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry*, **43**, 9774-9789.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*, **1**, 515-525.
- Freeman, M., Kimmel, B.E. and Rubin, G.M. (1992) Identifying targets of the rough homeobox gene of *Drosophila*: evidence that rhomboid functions in eye development. *Development*, **116**, 335-346.
- Frey, T.G. and Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **25**, 319-324.
- Frey, T.G., Renken, C.W. and Perkins, G.A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 196-203.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Gakh, O., Cavadini, P. and Isaya, G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 63-77.
- Gallio, M., Sturgill, G., Rather, P. and Kylsten, P. (2002) A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12208-12213.
- Gambill, B.D., Voos, W., Kang, P.J., Miao, B., Langer, T., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1993) A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J Cell Biol*, **123**, 109-117.
- Gavel, Y. and von Heijne, G. (1992) The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur J Biochem*, **205**, 1207-1215.
- Genova, M.L., Bianchi, C. and Lenaz, G. (2003) Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *Ital J Biochem*, **52**, 58-61.
- Gibson, B.W. (2005) The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 927-934.

7 Literaturverzeichnis

- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002) Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 174-180.
- Glaser, S.M., Miller, B.R. and Cumsky, M.G. (1990) Removal of a hydrophobic domain within the mature portion of a mitochondrial inner membrane protein causes its mislocalization to the matrix. *Mol Cell Biol*, **10**, 1873-1881.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R.L. and Schatz, G. (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69**, 809-822.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Green, D.W. and Grover, G.J. (2000) The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1458**, 343-355.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T.K. and Deschenes, R.J. (1993) Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet*, **24**, 141-148.
- Gupte, S.S. and Hackenbrock, C.R. (1988) The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport. *J Biol Chem*, **263**, 5248-5253.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*, **194**, 1-270.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, **18**, 331-368.
- Hales, K.G. and Fuller, M.T. (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121-129.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B. and Neupert, W. (1987) Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell*, **51**, 1027-1037.
- Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. and Neupert, W. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, **47**, 939-951.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, **54**, 1015-1069.
- Heijne, v. (1986) Mitochondrial targeting sequences, v. may form amphiphilic helices. *EMBO J.*, **5(6)**, 1335-1342.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, **418**, 367-370.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J*, **20**, 1281-1288.
- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2004) Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*, **165**, 167-173.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2003) Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem*, **278**, 27781-27788.
- Herrmann, J.M. (2003) Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol*, **11**, 74-79.
- Herrmann, J.M. and Bonnefoy, N. (2004) Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J Biol Chem*, **279**, 2507-2512.
- Herrmann, J.M. and Hell, K. (2005) Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **30**, 205-211.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 210-214.

- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life*, **55**, 219-225.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J*, **16**, 2217-2226.
- Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 483-519.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and 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.
- Huppert, S. and Kopan, R. (2001) Regulated intramembrane proteolysis takes another twist. *Dev Cell*, **1**, 590-592.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. and Mihara, K. (2003) Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 891-898.
- Jennings, M.L. (1989) Topography of membrane proteins. *Annu Rev Biochem*, **58**, 999-1027.
- Jensen, R.E. and Dunn, C.D. (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 25-34.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J. and Zha, J. (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, **16**, 1543-1554.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D. and Johnson, M.K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem*, **74**, 247-281.
- Jones, B.A. and Fangman, W.L. (1992) Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev*, **6**, 380-389.
- Jones, P.C. and Fillingame, R.H. (1998) Genetic fusions of subunit c in the F₀ sector of H⁺-transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. *J Biol Chem*, **273**, 29701-29705.
- Karbowski, M. and Youle, R.J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, **10**, 870-880.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Kondo-Okamoto, N., Shaw, J.M. and Okamoto, K. (2003) Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes, and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J Biol Chem*.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Davidovic, L., Letellier, M.C. and Pellegrini, L. (2003) The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol*, **4**, R19.
- Kozany, C., Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2004) The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 234-241.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. and 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.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R. and Dalbey, R.E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, **13**, 510-516.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Kuwana, T. and Newmeyer, D.D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 691-699.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, J.R., Urban, S., Garvey, C.F. and Freeman, M. (2001) Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*, **107**, 161-171.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2004) Roles of the Mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, **15**, 5001-5011.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*, **13**, 4343-4354.

7 Literaturverzeichnis

- Lemberg, M.K., Menendez, J., Misik, A., Garcia, M., Koth, C.M. and Freeman, M. (2005) Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases. *Embo J*, **24**, 464-472.
- Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **25**, 352-356.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, **30**, 133-141.
- Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Proteolytic Action of GlpG, a Rhomboid Protease in the Escherichia coli Cytoplasmic Membrane. *Biochemistry*, **44**, 13543-13552.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. and Rojo, M. (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep*, **6**, 853-859.
- Mannella, C.A. (2005) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta*.
- Mannella, C.A., Marko, M. and Buttle, K. (1997) Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci*, **22**, 37-38.
- Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, I., Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K. and Marko, M. (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, **52**, 93-100.
- Matouschek, A., Pfanner, N. and Voos, W. (2000) Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep*, **1**, 404-410.
- McConnell, S.J. and Yaffe, M.P. (1992) Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *J Cell Biol*, **118**, 385-395.
- McKenzie, M., Liolitsa, D. and Hanna, M.G. (2004) Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res*, **29**, 589-600.
- McQuibban, G.A., Saurya, S. and Freeman, M. (2003) Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*, **423**, 537-541.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. and Nunnari, J. (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, **305**, 1747-1752.
- Meeusen, S.L. and Nunnari, J. (2005) How mitochondria fuse. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 389-394.
- Meier, S., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2005) Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol*, **170**, 881-888.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2004) Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem*, **279**, 22781-22785.
- Milisav, I., Moro, F., Neupert, W. and Brunner, M. (2001) Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 25856-25861.
- Miller, J.F., Dower, W.J. and Tompkins, L.S. (1988) High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 856-860.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften*, **191**, 144-148.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N. and 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. and 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.
- Mokranjac, D. and Neupert, W. (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1019-1023.
- Mokranjac, D., Popov-Celeketic, D., Hell, K. and Neupert, W. (2005a) Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem*, **280**, 23437-23440.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2003) Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 4945-4956.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Celeketic, D.A., Berg, A., Hell, K. and Neupert, W. (2005b) The import motor of the yeast mitochondrial TIM23 preprotein translocase contains two different J proteins, Tim14 and Mdj2. *J Biol Chem*.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J*, **18**, 3667-3675.
- Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1459**, 370-382.

- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I. and Hayashi, J.I. (2001) Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*, **7**, 934-940.
- Nargang, F.E., Preuss, M., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2002) The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, **277**, 12846-12853.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 555-565.
- Nicholls, D.G. (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, **38**, 311-317.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. and Walter, P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*, **8**, 1233-1242.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J*, **21**, 3659-3671.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. and Hayashi, J.I. (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet*, **28**, 272-275.
- Panchenko, M.V. and Vinogradov, A.D. (1989) [Kinetics of the interaction of ATPase of submitochondrial fragments and a natural protein-inhibitor]. *Biokhimiia*, **54**, 569-579.
- Paschen, S.A. and Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life*, **52**, 101-112.
- Paschen, S.A., Neupert, W. and Rapaport, D. (2005) Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci*.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and 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. and Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, **426**, 862-866.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J*, **21**, 221-230.
- Pedersen, P.L., Ko, Y.H. and Hong, S. (2000) ATP synthases in the year 2000: defining the different levels of mechanism and getting a grip on each. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 423-432.
- Pelham, H.R. and Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247-256.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. and Frey, T. (1997) Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*, **119**, 260-272.
- Perkins, G.A. and Frey, T.G. (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, **31**, 97-111.
- Perkins, G.A., Renken, C.W., van der Klei, I.J., Ellisman, M.H., Neupert, W. and Frey, T.G. (2001) Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *Eur J Cell Biol*, **80**, 139-150.
- Perkins, G.A., Song, J.Y., Tarsa, L., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. and Frey, T.G. (1998) Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr*, **30**, 431-442.
- Pfanner, N. and Neupert, W. (1987) Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J Biol Chem*, **262**, 7528-7536.
- Ponting, C.P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K. and Golde, T.E. (2002) Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet*, **11**, 1037-1044.
- Poyton, R.O., Duhl, D.M. and Clarkson, G.H. (1992) Protein export from the mitochondrial matrix. *Trends Cell Biol*, **2**, 369-375.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D. and Steinmetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*, **2**, E160.
- Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) A Naturally Occurring Inhibitor Of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem*, **238**, 3762-3769.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. and Schatz, G. (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *Embo J*, **12**, 4115-4123.

7 Literaturverzeichnis

- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 20150-20155.
- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, **127**, 1547-1556.
- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell*, **1**, 47-57.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. and Pfanner, N. (2003) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, **299**, 1747-1751.
- Reichert, A.S. and Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 41.
- Reichert, A.S. and Neupert, W. (2004) Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet*, **20**, 555-562.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D. and Soll, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev*, **19**, 583-592.
- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem*, **273**, 8040-8047.
- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1999) N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic "positive-inside" rule of membrane protein topology. *J Biol Chem*, **274**, 19617-19622.
- Rothstein, R.J. and Sherman, F. (1980) Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics*, **94**, 871-889.
- Ryan, M.T., Wagner, R. and Pfanner, N. (2000) The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 13-21.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, **283**, 1488-1493.
- Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 154-159.
- Schagger, H., Cramer, W.A. and 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.
- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*, **19**, 1777-1783.
- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, **276**, 37861-37867.
- Scheffler, I.E. (2001) Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev*, **49**, 3-26.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogel, B., Go, N.E., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (2005) Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J Biol Chem*, **280**, 14499-14506.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Selkoe, D.J. and Schenk, D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 545-584.
- Senior, A.E., Nadanaciva, S. and Weber, J. (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, **1553**, 188-211.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E. and Jensen, R.E. (2003) Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 276-283.

- Shaw, J.M. and Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, **12**, 178-184.
- 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. and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**, 582-585.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L. and DiMauro, S. (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet*, **2**, 342-352.
- Soubannier, V., Vaillier, J., Paumard, P., Coulary, B., Schaeffer, J. and Velours, J. (2002) In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J Biol Chem*, **277**, 10739-10745.
- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J. and Davis, R.W. (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*, **31**, 400-404.
- Stock, D., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (1999) Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, **286**, 1700-1705.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. and Schagger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*, **279**, 5000-5007.
- Stuart, J.A., Brindle, K.M., Harper, J.A. and Brand, M.D. (1999) Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr*, **31**, 517-525.
- Stuart, R.A., Cyr, D.M. and Neupert, W. (1994a) Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia*, **50**, 1002-1011.
- Stuart, R.A., Gruhler, A., van der Klei, I., Guiard, B., Koll, H. and Neupert, W. (1994b) The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. *Eur J Biochem*, **220**, 9-18.
- Sturtevant, M.A., Roark, M. and Bier, E. (1993) The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev*, **7**, 961-973.
- Truscott, K.N., Brandner, K. and Pfanner, N. (2003a) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*, **13**, R326-337.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, **8**, 1074-1082.
- Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N. (2003b) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*, **163**, 707-713.
- Urban, S., Lee, J.R. and Freeman, M. (2001) *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*, **107**, 173-182.
- Urban, S., Lee, J.R. and Freeman, M. (2002a) A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *Embo J*, **21**, 4277-4286.
- Urban, S., Schlieper, D. and Freeman, M. (2002b) Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Curr Biol*, **12**, 1507.
- 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. and Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
- Velours, J. and Arselin, G. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*, **32**, 383-390.
- 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., von Ahsen, O., Muller, H., Guiard, B., Rassow, J. and Pfanner, N. (1996) Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *Embo J*, **15**, 2668-2677.
- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W. and Rapaport, D. (2004) Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep*, **5**, 704-709.
- Walker, J.E. (1994) The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol*, **4**, 912-918.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wang, Y. and Weiner, H. (1994) Evaluation of electrostatic and hydrophobic effects on the interaction of mitochondrial signal sequences with phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **33**, 12860-12867.

7 Literaturverzeichnis

- Wasserman, J.D., Urban, S. and Freeman, M. (2000) A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev*, **14**, 1651-1663.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K. and Martoglio, B. (2002) Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*, **296**, 2215-2218.
- Weihofen, A. and Martoglio, B. (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol*, **13**, 71-78.
- Westermann, B. (2003) Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, **1641**, 195-202.
- Westermann, B. and 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., Frazier, A.E. and Pfanner, N. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 14473-14476.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, **424**, 565-571.
- Williamson, D.H. and Fennell, D.J. (1979) Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol*, **56**, 728-733.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T. and Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, **398**, 513-517.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Nunnari, J. (2000) The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, **151**, 341-352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinske, T.J., Cassidy-Stone, A. and Nunnari, J. (2003) The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol*, **160**, 303-311.
- Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4819-4823.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J. and Hartl, F.U. (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, **112**, 41-50.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2003) Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem*, **278**, 27781-8.

Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2004) Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*, **165**, 167-73.

Adam, A. C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W. und Hell, K (2005) The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *Embo J*, **25**, 174-83.

Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2006) Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F₁F₀-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem*, **281**, 13990-8.

8 Abkürzungsverzeichnis

α	Antikörper
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BNGE	Blaue Nativgelelektrophorese
C	Cytosin
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
Ccp1	Cytochrom-c Peroxidase
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DAPI	4',-6-Diamidino-2-phenylindol
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltosid
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DLD	d-Laktatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM	'dynamin related'
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherischa coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	'Epidermal Growth Factor'
EGFR	'Epidermal Growth Factor Receptor'
ER	Endoplasmatische Retikulum
f	Fragment
FIS	'mitochondrial fission'
Fzo1	'fuzzy onion'
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
G	Guanin
GFP	'green flurescent protein'
GTP	Guanin-5'-triphosphat
<i>H.sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IM	Innenmembran
Imp1	'mitochondrial inner membrane protease' Untereinheit 1
IMR	Intermembranraum
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MIP	'mitochondrial intermediate protease'
I-Mgm1	große Isoform von Mgm1
MGM	'mitochondrial genome maintenance'
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
<i>N.crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermminus
OD	Optische Dichte

8 Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARL	„presenilin associated rhomboid like protease“
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Pcp1	„processing of cytochrome-c Peroxidase“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rh123	Rhodamin123
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	selektives Laktat-Medium
s-Mgm1	kleine Isoform von Mgm1
Su9	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATP Synthase
SW	osmotische Schwellung von Mitochondrien
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCS	„TEV-Protease cleavage site“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	„tabacco etch virus“
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translokationskomplex der inneren Membran
TMPD	Tetramethyl-p-Phenylendiamin
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	Translokationskomplex der äußeren Membran
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	enzymatische Einheit (Unit)
U	Uridin
Ugo1	Fusion (japanisches Wort)
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt, Pepton, Dextrose
YPG	Hefeextrakt, Pepton, Glycerol
YPGal	Hefeextrakt, Pepton, Galaktose
z.B.	zum Beispiel

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, für die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu können. Insbesondere die Freiheiten, die einem als Doktorand im Labor bei der Wahl der Methoden und Themen gelassen wurden, führen zu einer fundierten guten Ausbildung. Daran beteiligt war nicht zuletzt auch die international zusammengesetzte Arbeitsgruppe, die nicht nur das Methodenspektrum, sondern auch den Diskussionshorizont erweiterte.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Reichert, in dessen Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit entstanden ist. Die zahlreichen Ideen und Diskussionen bildeten die Grundlage für das Voranschreiten meiner Arbeit. Die stete Flut an neuen Versuchs- und Projektvorschlägen ließ zu keiner Zeit Monotonie im Labor aufkommen. Der insbesondere bei neuen Methoden erwachende Forschergeist und die Begeisterung, die neue ‚Ergebnisse‘ lieferten, waren Antriebskraft und Motivation für mich.

Bei Christiane Kotthoff möchte ich mich ganz herzlich für ihre ausgezeichnete Mitarbeit bedanken. Sie hat durch ihre herausragende Arbeit einen nicht unerheblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Insbesondere in kritischen Phasen hat sie es verstanden mich wieder aufzubauen. Nicht nur für mich, sondern auch für die restliche Arbeitsgruppe stand sie mit Rat und Tat jederzeit (außer am Wochenende, daran arbeite ich noch) zur Verfügung.

Dr. Mark Herlan danke ich für die exzellente Aufnahme ins ‚Neupert‘-Labor, die über die Wissenschaft hinaus reichende Freundschaft und die hervorragende Zusammenarbeit im Labor. Viele interessante und produktive Diskussionen haben meine Arbeit unterstützt, fokussiert und bereichert. Dr. Stéphane Duvezin-Caubet, Gabriele Ludwig, Regina Rabl, Nadine Rehn, Anja Schäfer, Dr. Vincent Soubannier und Michael Zick danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor und für die schönen Stunden bei gemeinsamen Unternehmungen auch außerhalb des Laborbetriebs. Viele wissenschaftliche, philosophische und profane Diskussionen haben den Laboralltag aufgelockert. Maßgeblich haben auch die anderen Mitarbeiter unseres Labors, Dr. Alexander Adam, Ulrike Gärtner, Iris Haag, Dr. Kai Hell und Dr. Stefan Paschen zur ausgezeichneten Atmosphäre im Labor beigetragen.

9 Danksagung

Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ‚Neupert‘, die ich hier nicht im einzelnen erwähnen kann, danke ich für ihre Bereitschaft sowohl ihr Wissen als auch ihre Materialien zu teilen.

Frau Döge, Frau Farsen, Frau Hauck und Frau Werner danke ich für die Hilfe, die sie mir in allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten zukommen ließen.

Allen nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern der Werkstatt, des Tierstalls und der Spülküche, die für einen reibungslosen Ablauf des Laboralltags gesorgt haben, danke ich herzlich.

Prof. Dr. Jean Velours danke ich für die Bereitstellung des Su e_{18A}-Stammes.

Dr. Frank Vogel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die exzellenten Bilder vom EM.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern danken, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Ihre umfassende Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung haben mir den nötigen Rückhalt gegeben. Sie waren mir zu jeder Zeit eine stete Stütze.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank Dir, Stella. Du warst und bist meine zweite Stütze („auf einem Bein kann man nicht stehen“). Dein Verständnis für meine Arbeit und Geduld, wenn ‚ich komme gleich‘ wieder ‚in 1-2 Stunden‘ bedeutete. In schweren Phasen meiner Arbeit hast Du mir den Rücken gestärkt und mich mit Deiner Liebe und Deinem Vertrauen in mich aufgebaut.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carsten Bornhövd
Geburtsdatum: 21.04.1972
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1979-1983 Besuch der Grundschule in Frankfurt/M-Hausen
1983-1989 Besuch des Bettinaschule-Gymnasiums in Frankfurt/M
1989-1990 Besuch der Cedar-Cliff-High-School, Pennsylvania, USA
1990-1993 Besuch des Bettinaschule-Gymnasiums in Frankfurt/M
1993 Abitur am Bettinaschule-Gymnasium in Frankfurt/M

Hochschulausbildung:

1995-2001 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
1995-1997 Grundstudium Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
1998-1999 Praktikumsjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried bei München und an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
2000-2001 Diplomarbeit im Friedrich-Miescher Laboratorium der Max-
Planck Gesellschaft in Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr.
Anne Spang
Thema „Analyse zum bidirektionellen Transport zwischen ER
und Golgi-Apparat am Beispiel zweier homologer
Membranproteine mit unterschiedlichen Sortierungssignalen“
2001 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für
Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München