

**Untersuchungen zur Charakterisierung der Zusammensetzung,
Biogenese und des Mechanismus der Proteintranslokase der
mitochondrialen Außenmembran von *Neurospora crassa***

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

von
Markus Dembowski
aus
Berlin

München
2001

Dissertation eingereicht am 23. Oktober 2001

Erstgutachter:	Prof. Dr. Wolfhard Rüdiger
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Jürgen Soll
Sondergutachter:	Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Februar 2002

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AAC	ADP/ATP-Carrier
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	Calvine Intestine Phosphatase
CCHL	Cytochrom c-Häm-Lyase
CTP	Cytosintriphosphat
Cyt <i>b</i> 2	Cytochrom <i>b</i> 2
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
DDM	Dodecylmaltosid
ddNTP	Didesoxinucleosidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSG	Disuccinimidylglutamat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreductase
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
$\Delta\psi$	Membranpotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Hsp	Hitzeschockprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
IDF	Intermediate Density Fraction
IgG	Immunglobulin G
IM	Innenmembran
IMS	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kDa	kilo-Dalton

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

KPi	Kaliumphosphat
LB	Nährmedium nach Luria und Bertani
β-ME	β-Mercaptoethanol
7mGpppG	7-Methyl-Guanosintriphosphat
min	Minute
MOPS	N-Morpholinoethansulfonsäure
MPP	Matrixprozessierungspeptidase
MSF	mitochondrial import stimulation factor
MTX	Methotrexat
MW	Molekulargewicht
NADP	Nicotinsäureamid-adeninnucleotid-phosphat
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran
OMV	Außenmembranvesikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmenserum
PITC	Phenylisothiocyanat
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
Rnase	Ribonuclease
RNAsin	Ribonuclease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten
SSC	
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer
STE	Saccharose-Tris-EDTA-Puffer
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Sulfo-MBS	m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester
Su9	Untereinheit 9 der mitochondrialen FO-ATPase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tim	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
Tom	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
TOM	Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
TX-100	Triton X-100
UTP	Uridintriphosphat
v/v	Volumen pro Volumen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YPD	Hefemedium aus Hefeextrakt, Pepton und Dextrose

4. EINLEITUNG	1
<u>1.1. Funktionen der Mitochondrien und deren Bedeutung für die Zelle</u>	1
<u>1.2. Der Transport von Proteinen in die Mitochondrien</u>	2
1.2.1. Die Proteintranslokasen der Mitochondrien	3
1.2.2. Der generelle Importweg mitochondrialer Proteine	6
1.2.3. Import von Intermembranraum- und Innenmembranproteinen	8
1.2.4. Import von Außenmembranproteinen	11
<u>1.3. Tom5, Tom6 und Tom7 und ihre Rolle im TOM-Komplex</u>	14
<u>1.4. Der Mechanismus der Interaktion von Matrixproteinen mit dem TOM-Komplex</u>	16
<u>1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</u>	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
<u>2.1. Molekularbiologische Methoden</u>	19
2.1.1. Verwendete Plasmide	19
2.1.2. Isolierung von Plasmid- DNA aus <i>E.coli</i>	19
2.1.3. Polymerasekettenreaktion PCR	20
2.1.4. Liste der verwendeten Primer	21
2.1.5. T/A- Klonierung von PCR- Produkten	22
2.1.6. Enzymatische Modifikation von DNA	23
2.1.7. Reinigung und Analyse von DNA	24
2.1.8. Durchmusterung von DNA- Bibliotheken	29
2.1.9. Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	31
2.1.10. Klonierungsstrategien	31
2.1.11. λ -Zap Phagen	32
<u>2.2. Zellbiologische Methoden</u>	34
2.2.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus <i>Neurospora crassa</i>	34
2.2.2. Isolierung von Mitochondrien aus <i>Neurospora crassa</i>	34
2.2.3. Isolierung von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.2.4. Subfraktionierung von Mitochondrien	35
2.2.5. Isolierung der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran	37
2.2.7. Proteasebehandlung von Mitochondrien	38
2.2.8. Import in vitro synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien	39
2.2.9. Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine	39
<u>2.3. Proteinbiochemische Methoden</u>	40
2.3.1. Präparation von Proteinen	40
2.3.2. Etikettierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	42
2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.3.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	43
2.3.5. Trennung von Proteinen durch Elektrophorese	43
2.3.6. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	45
2.3.7. Transfer von Proteinen auf Membranen	47
2.3.8. Autoradiographie und Laserdensitometrie	47
2.3.8. Gelfiltration	47
<u>2.4. Biophysikalische Methoden</u>	48
2.4.1. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	48
2.4.2. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	49

<u>2.5. Immunologische Methoden</u>	50
2.5.1. Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Tom6 und Tom7	50
2.5.2. Präparation gereinigter Immunglobuline (IgG)	51
2.5.3. Immunologischer Nachweis von auf Nitrocellulose bzw. PVDF- Membranen immobilisierten Proteinen	51
2.5.4. Immunfällung	52
<u>2.6. Mikrobiologische Methoden</u>	53
2.6.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	53
2.6.2. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	53
2.6.3. Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i>	54
<u>2.7. Geräte, Chemikalien und Enzyme</u>	54
2.7.1 Geräte	54
2.7.2. Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien	55
3. ERGEBNISSE	58
<u>3.1. Klonierung von <i>Neurospora crassa</i> TOM6 und TOM7</u>	58
3.1.1. Strategie zur Klonierung der kleinen Tom-Proteine	58
3.1.2. Der TOM-Komplex aus <i>N.crassa</i> enthält 2 bislang unbekannte Proteine, Tom6 und Tom7.	61
3.1.3. Bestimmung der Sequenz der cDNA und der genomischen DNA von <i>Neurospora crassa</i> Tom6	62
3.1.4. Bestimmung der Sequenz der cDNA und der genomischen DNA von <i>Neurospora crassa</i> Tom7	67
<u>3.2. Charakterisierung von Tom6 und Tom7 aus <i>Neurospora crassa</i></u>	71
3.2.1. Tom6 und Tom7 sind Bestandteil des TOM-Core Komplexes	71
3.2.2. Tom6 steht in engem Kontakt zu Tom22 und Tom40	75
3.2.3. Tom7 kann mit Tom40 quervernetzt werden	75
<u>3.3. Insertion und Assemblierung von <i>in vitro</i> synthetisierten Vorstufen von Tom6 und Tom7 in den TOM-Komplex</u>	75
3.3.1. Tom6 und Tom7 werden über den normalen Importweg in bereits bestehende TOM-Komplexe inseriert	78
3.3.2. Untersuchungen zur Targeting- Information in der Aminosäuresequenz von Tom6	80
<u>3.4. Charakterisierung der Bindung von mitochondrialen Vorstufenproteinen an den isolierten TOM-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie</u>	84
3.4.1. Das Vorstufenprotein pSu9-DHFR bindet spezifisch und reversibel an isolierten TOM-Komplex	85
3.4.2. Die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex kann durch hohe Ionenstärke inhibiert werden.	86
3.4.3. Die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex kann nicht erfolgen, wenn das Protein künstlich in gefaltetem Zustand gehalten wird.	90
4. DISKUSSION	92
<u>4.1. Tom6 und Tom7 im TOM-Komplex von <i>Neurospora crassa</i> und anderen Organismen</u>	92
<u>4.2. Die Interaktion von Tom6 und Tom7 mit anderen Komponenten des TOM-Komplexes</u>	93
4.2.1. Tom6 und Tom7 sind Bestandteile des TOM-Core-Komplexes	93
4.2.2. Tom6 und Tom7 befinden sich in räumlicher Nähe zu anderen Komponenten des TOM-Core-Komplexes	94
<u>4.3. Assemblierung von Tom6 und Tom7 in bereits bestehende TOM-Komplexe</u>	95
4.3.1. Tom6 und Tom7 werden über den generellen Importweg in den TOM-Komplex assembliert	95
4.3.2. Der Carboxyterminus von Tom6 ist für die Membraninsertion verantwortlich, der die Transmembrandomäne flankierende aminoterminaler Bereich vermittelt die Assemblierung in bestehende TOM-Komplexe	96

<u>4.4. Bindung von Präproteinen an den isolierten TOM-Komplex</u>	98
4.4.1. pSu9-DHFR bindet spezifisch und mit hoher Affinität an den TOM-Komplex	99
4.4.2. Charakter der Bindung, Schlussfolgerungen über den Mechanismus der Translokation von Präproteinen über die Außenmembran	100
5. ZUSAMMENFASSUNG	102
6. LITERATURVERZEICHNIS	104
7. DANKSAGUNG	118
8. LEBENSLAUF	120

1. EINLEITUNG

In der eukaryontischen Zelle läuft eine Vielzahl unterschiedlicher biochemischer Reaktionen ab, die zum Teil unterschiedliche chemische Milieus erfordern. Für einen optimalen Ablauf dieser Reaktionen und deren effektive Regulation war es in der Evolution sinnvoll, die Zelle in unterschiedliche Zellorganellen zu unterteilen, die von Lipidmembranen umgeben sind. Die Lipidmembranen verhindern den uneingeschränkten Stofftransport zwischen den Zellorganellen. Somit werden chemisch unterschiedliche Umgebungen geschaffen, in denen verschiedene biochemische Reaktionen räumlich voneinander getrennt und unter für sie optimalen Bedingungen ablaufen können.

Man unterscheidet zwischen Zellorganellen, die von einer Membran umgeben sind, dazu zählen das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Peroxisomen und Lysosomen sowie Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind, wie den Zellkern, die Mitochondrien und die Chloroplasten.

1.1. Funktionen der Mitochondrien und deren Bedeutung für die Zelle

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-1 μ m, die wie auch die Chloroplasten von Eubakterien abstammen (Herrmann, 1997). Vor rund einer Milliarde Jahren wurden diese ursprünglich autonomen Bakterien als Symbionten in eukaryontische Wirtszellen aufgenommen (Endosymbiontentheorie). Vermutlich gehörten die Vorläufer der Mitochondrien zu den α -Purpurbakterien (Whatley, 1981). Mitochondrien sind in vier Subkompartimente unterteilt: in die mitochondriale Matrix, die von der Innenmembran umschlossen ist, den zwischen den Membranen liegenden Intermembranraum und die Außenmembran, die den äußeren Abschluss der Mitochondrien bildet.

In den Mitochondrien ist eine Vielzahl von für die Zelle essentiellen biochemischen Prozessen lokalisiert. Dazu zählen vor allem Prozesse, die der Energiegewinnung der Zelle dienen. So sind die Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette in Mitochondrien lokalisiert. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA zu CO₂ oxidiert, dabei entstehen mit NADH und FADH₂ die Reduktionsäquivalente, die in der Atmungskette verwendet werden. Die Atmungskette wird von vier Proteinkomplexen (Komplex I-IV) gebildet. Die hier ablaufenden Reaktionen umfassen die Oxidation von NADH und FADH₂ sowie den Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum, durch den ein

Membranpotential ($\Delta\Psi$) generiert wird. Die Energie der in die Matrix zurückfließenden Protonen wird von der ATP-Synthase für die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat verwandt.

Daneben sind Mitochondrien an weiteren wichtigen Stoffwechselfvorgängen beteiligt, wie dem Fettsäurestoffwechsel, dem Harnstoffzyklus, der Synthese verschiedener Aminosäuren, Phospholipide und Nukleotide sowie der Hämbiosynthese.

Außerdem enthalten Mitochondrien Proteine, die bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod eine wichtige Rolle spielen (zur Übersicht, siehe Bernardi et al., 1999, Bernardi et al., 2001).

Die Bedeutung der Mitochondrien für die Zelle und den Organismus insgesamt wird auch dadurch belegt, daß mitochondriale Defekte die Ursache zahlreicher Krankheiten sind (zur Übersicht: (Larsson and Luft, 1999, Wallace, 1999).

Zwar besitzen Mitochondrien ein eigenes Genom, dieses kodiert jedoch nur für wenige Proteine. Die meisten mitochondrialen Proteine sind im Zellkern kodiert und müssen in die Mitochondrien importiert, in das richtige Subkompartiment sortiert und korrekt in die entsprechenden Proteinkomplexe assembliert werden.

1.2. Der Transport von Proteinen in die Mitochondrien

Der Mechanismus der Translokation von Proteinen in Mitochondrien weist einige Gemeinsamkeiten mit der Translokation in das endoplasmatische Retikulum, in Chloroplasten sowie mit der Translokation von Proteinen über die Plasmamembran von Bakterien auf (zur Übersicht: Rapoport et al., 1996, Johnson, 1997, Theg and Scott, 1993, Klösgen, 1997, Neupert, 1997, Voos, 1999). So enthalten die Membranen der Zellorganellen Transportsysteme, die einen selektiven Eintransport der Proteine gewährleisten. Die neu im Cytosol synthetisierten Proteine besitzen Signalsequenzen, die für das jeweilige Zellorganell spezifisch sind. Sie sind in der Regel ca. 70 Aminosäurereste lang und am Aminoterminus des Proteins lokalisiert (Hartl et al., 1989, Bird et al., 1987). Allerdings gibt es auch carboxyterminale und interne Signalsequenzen (von Heijne, 1989, Fölsch et al., 1996, Lee et al., 1999). Für den Eintransport in die entsprechenden Organellen existieren spezielle Proteinkomplexe auf der Oberfläche der Zellorganellen, die zum einen Rezeptoren enthalten, welche die Signalsequenzen der Proteine erkennen, zum anderen einen Translokationsapparat, der die Proteine in die Organellen transportiert. Im Vergleich zu anderen Zellorganellen mit nur einer Membran weist der Import von

Proteinen in Mitochondrien die Besonderheit auf, daß die Proteine korrekt in verschiedene Kompartimente (Außenmembran, Innenmembran, Intermembranraum und Matrix) importiert werden müssen.

Es sind mehrere Proteinkomplexe bekannt, die diese Aufgabe übernehmen, u.a. der TOM-Komplex (Translokase of the Outer Mitochondrial membrane), der TIM23-Komplex (Translokase of the Inner Mitochondrial membrane) sowie der TIM22-Komplex. Außerdem ist der OXA-Komplex bekannt, der für den Export von in der mitochondrialen Matrix synthetisierten Proteinen in andere Kompartimente verantwortlich ist (Hell et al., 1998, Hell et al., 2001).

Neben den in Mitochondrien lokalisierten Proteintranslokasen spielen einige cytosolische Chaperone eine wesentliche Rolle beim Proteinimport in Mitochondrien. Sie bewahren die Präproteine vor Aggregation und halten sie so in einer importkompetenten Konformation (Hachiya et al., 1994, Hachiya et al., 1995, Mihara and Omura, 1996, Voos et al., 1999). Möglicherweise erfüllen sie auch eine Targeting-Funktion (Hachiya et al., 1995, Komiya et al., 1997).

1.2.1. Die Proteintranslokasen der Mitochondrien

1.2.1.1. Die Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran

Bei der Untersuchung der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM-Komplex) wurden in den letzten Jahren zahlreiche Fortschritte erzielt (zur Übersicht: Neupert, 1997, Meisinger, 1999). Am besten ist der TOM-Komplex in den Organismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* charakterisiert, allerdings wurden auch einzelne Komponenten der TOM-Komplexe aus *Schizosaccharomyces pombe*, *Podospora anserina* (Jamet Vierny et al., 1997), *Caenorhabditis elegans*, *Rattus norvegicus* (Iwahashi et al., 1997, Suzuki, 2000), *Mus musculus* und Mensch (Schleiff, 1998, Yano, 2000) sowie aus Pflanzen (Jansch et al., 1998) identifiziert und charakterisiert.

Der TOM-Komplex in *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* ist ca. 500 kDa groß und besteht aus mindestens sieben Untereinheiten (Söllner et al., 1990, Kiebler et al., 1990, Künkele et al., 1998), die entsprechend der vereinbarten Nomenklatur als Tom5 (Dietmeier et al., 1997), Tom6 (Kassenbrock et al., 1993, Alconada et al., 1995), Tom7 (Hönlinger et al., 1996), Tom20 (Schneider et al., 1991, Ramage et al., 1993), Tom22 (Kiebler et al., 1993, Lithgow et al., 1994), Tom40 (Kiebler et al., 1990, Baker et al., 1990)

und Tom70 (Söllner et al., 1990, Steger et al., 1990) bezeichnet werden (Pfanner et al., 1996). Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit waren Tom5, Tom6 und Tom7 nur in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt, außerdem wurde zusätzlich Tom71 als TOM-Komponente in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Schlossmann et al., 1996, Bomer et al., 1996).

Die Komponenten des TOM-Komplexes können aufgrund ihrer Funktion und Eigenschaften in zwei Gruppen eingeordnet werden. Tom20 und Tom70 besitzen neben einem kurzen Membrananker jeweils eine große cytosolische Domäne, die als Rezeptor an der Erkennung mitochondrialer Proteine beteiligt ist (Söllner et al., 1989, Söllner et al., 1990, Mayer et al., 1995). Tom20 steht in enger funktioneller Beziehung zu Tom22 (Harkness et al., 1994), das ebenfalls eine cytosolische Domäne besitzt. Tom20 und Tom70 sind als Rezeptoren eher lose mit dem TOM-Komplex assoziiert, da sie sehr leicht vom TOM-Komplex abdissoziieren können (Dekker et al., 1998, Ahting et al., 1999). Dagegen sind die Komponenten Tom40 und Tom22 fest miteinander verbunden und bilden den ca. 400 kDa großen hochmolekularen TOM-Core-Komplex (Ahting et al., 1999, van Wilpe et al., 1999). Der TOM-Komplex bildet die Translokationspore für mitochondriale Proteine (Kiebler et al., 1990, Söllner et al., 1992). Diese Pore konnte durch elektronenmikroskopische Analyse des isolierten TOM-Komplexes nachgewiesen werden (Künkele et al., 1998). Weitere Untersuchungen durch elektrophysiologische Messungen im Anschluss an die Rekonstitution des TOM-Komplexes in eine Lipiddoppelschicht ergaben, daß die vom TOM-Komplex gebildete Pore einen Kationen leitenden Kanal darstellt (Künkele et al., 1998). Die im Elektronenmikroskop sichtbaren Poren bzw. die Kationen leitenden Kanäle werden durch die Komponenten des Kernkomplexes gebildet (Ahting et al., 1999), wobei offenbar Tom40 die wesentliche Rolle an der Ausbildung des Kanals spielt (Hill et al., 1998), während Tom22 neben einer wesentlichen Rolle bei der Translokation von Präproteinen (Kiebler et al., 1993, Nargang et al., 1995) auch eine Funktion bei der strukturellen Organisation des TOM-Komplexes zu haben scheint (van Wilpe et al., 1999). Da die Komponenten Tom5, Tom6 und Tom7 Gegenstand vorliegender Arbeit sind, soll auf sie später in einem gesonderten Abschnitt (1.4.) eingegangen werden.

1.2.1.2. Die Proteintranslokasen der mitochondrialen Innenmembran

Für den Transport von Proteinen in die mitochondriale Matrix bzw. die Innenmembran existieren zwei unabhängige Importmaschinerien in der mitochondrialen Innenmembran, der Tim23-Komplex sowie der Tim22-Komplex (zur Übersicht: Voos et al., 1999, Koehler, 2000, Bauer, 2000).

Durch den Tim23-Komplex wird der Transport von Proteinen in die mitochondriale Matrix katalysiert. Ebenso werden einige Innenmembranproteine über den Tim23-Komplex importiert. Dieser Komplex besteht aus den Membranproteinen Tim23 (Jensen et al., 1993, Emtage and Jensen, 1993) und Tim17 (Maarse et al., 1994, Ryan, 1994) sowie dem membranassoziierten Tim44 (Maarse et al., 1992, Scherer et al., 1992). Diese Proteine bilden einen hochmolekularen Komplex, der equimolare Mengen aller drei Proteine enthält (Bauer et al., 1996, Moro et al., 1999). Außerdem sind auf der Matrixseite die Chaperone mtHsp70 und Mge1p mit dem Tim23-Komplex assoziiert (Dekker et al., 1993, Bolliger et al., 1994, Westermann et al., 1999, Moro et al., 1999).

Mitochondriale Transporterproteine werden über den Tim22-Komplex in die Innenmembran inseriert (Sirrenberg et al., 1996, Kerscher O. et al., 1997). Dieser Komplex besteht aus den integralen Membranproteinen Tim18 (Kerscher et al., 2000, Koehler et al., 2000), Tim22 (Sirrenberg et al., 1996) und Tim54 (Kerscher et al., 1997) sowie aus den auf der Intermembranraumseite assoziierten Proteinen Tim9 (Adam et al., 1999, Köhler et al., 1998), Tim10 und Tim12 (Sirrenberg et al., 1998, Köhler et al., 1998). Zusätzlich besteht im Intermembranraum der ca. 70 kDa große Tim9/10-Komplex, der ebenfalls beim Import von Transporterproteinen involviert ist (Adam et al., 1999, Koehler et al., 1998).

Ein weiterer Proteinkomplex im Intermembranraum ist der Tim8/13-Komplex (Koehler et al., 1999). Die genaue Funktion dieses Komplexes ist bislang nur wenig erforscht, es konnte jedoch gezeigt werden, daß dieser Komplex unter Bedingungen, wenn die Mitochondrien kein Membranpotential ausbilden, notwendig für den Import von Tim23 in die mitochondriale Innenmembran ist (Koehler et al., 2000, Kerscher et al., 2000, Paschen et al., 2000).

1.2.2. Der generelle Importweg mitochondrialer Proteine

Mitochondriale Proteine werden posttranslational in die Mitochondrien importiert, für den Import müssen sie in importkompetenter, d.h. entfalteter Form vorliegen. Dazu binden cytosolische Chaperone wie cytHsp70 und MSF (Mitochondrial Stimulation Factor) sofort nach der Synthese durch die Ribosomen an das zu importierende Protein und verhindern so eine Faltung bzw. Aggregation (Mihara and Omura, 1996, Komiyama et al., 1996, Hachiya et al., 1995).

Der Import von Proteinen in Mitochondrien ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Zunächst werden die Vorstufenproteine über ihre Signalsequenzen an der Oberfläche der Mitochondrien durch die Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes erkannt. Matrixproteine, die eine aminoterminal Signalsequenz enthalten, werden hauptsächlich durch Tom20 sowie die cytosolische Domäne von Tom22 erkannt und gebunden, anschließend erfolgt die Insertion des Proteins in die Translokationspore und der Durchtritt über die Außenmembran (Söllner et al., 1989, Moczko et al., 1993, Ramage et al., 1993, Kiebler et al., 1993, Harkness et al., 1994, Lithgow et al., 1994, Moczko et al., 1994, Nargang et al., 1995). Für die Translokation der Vorstufenproteine über die mitochondriale Außenmembran ist weder ein Membranpotential noch die Hydrolyse von ATP notwendig. Obwohl zahlreiche Untersuchungen zur Interaktion von mitochondrialen Proteinen mit dem TOM-Komplex sowie zur Translokation über die Außenmembran durchgeführt wurden, ist immer noch unklar, worin die Triebkraft für diesen Prozess besteht (siehe auch Abschnitt 1.4.).

Nach Erreichen des Intermembranraums wird die Signalsequenz des Vorstufenproteins durch den TIM23-Komplex erkannt und über die Innenmembran in die Matrix transportiert. Es konnte gezeigt werden, daß der TOM-Komplex mit dem TIM23-Komplex in koordinierter Weise zusammenwirkt und sogenannte Translokationskontaktstellen ausbildet (Schleyer and Neupert, 1985, Berthold et al., 1995, Horst et al., 1995). Dabei ist die aminoterminal Domäne von Tim23 auf der Oberfläche der Mitochondrien exponiert (Donzeau et al., 2000). Somit ist die Möglichkeit für eine hohe Effizienz des Proteinimports gegeben, allerdings können beide Translokationsapparate auch unabhängig voneinander Proteine importieren (Mayer et al., 1993, Segui-Real et al., 1993).

Der Prozess der Translokation über die Innenmembran ist abhängig vom Membranpotential über die Innenmembran sowie von ATP in der Matrix.

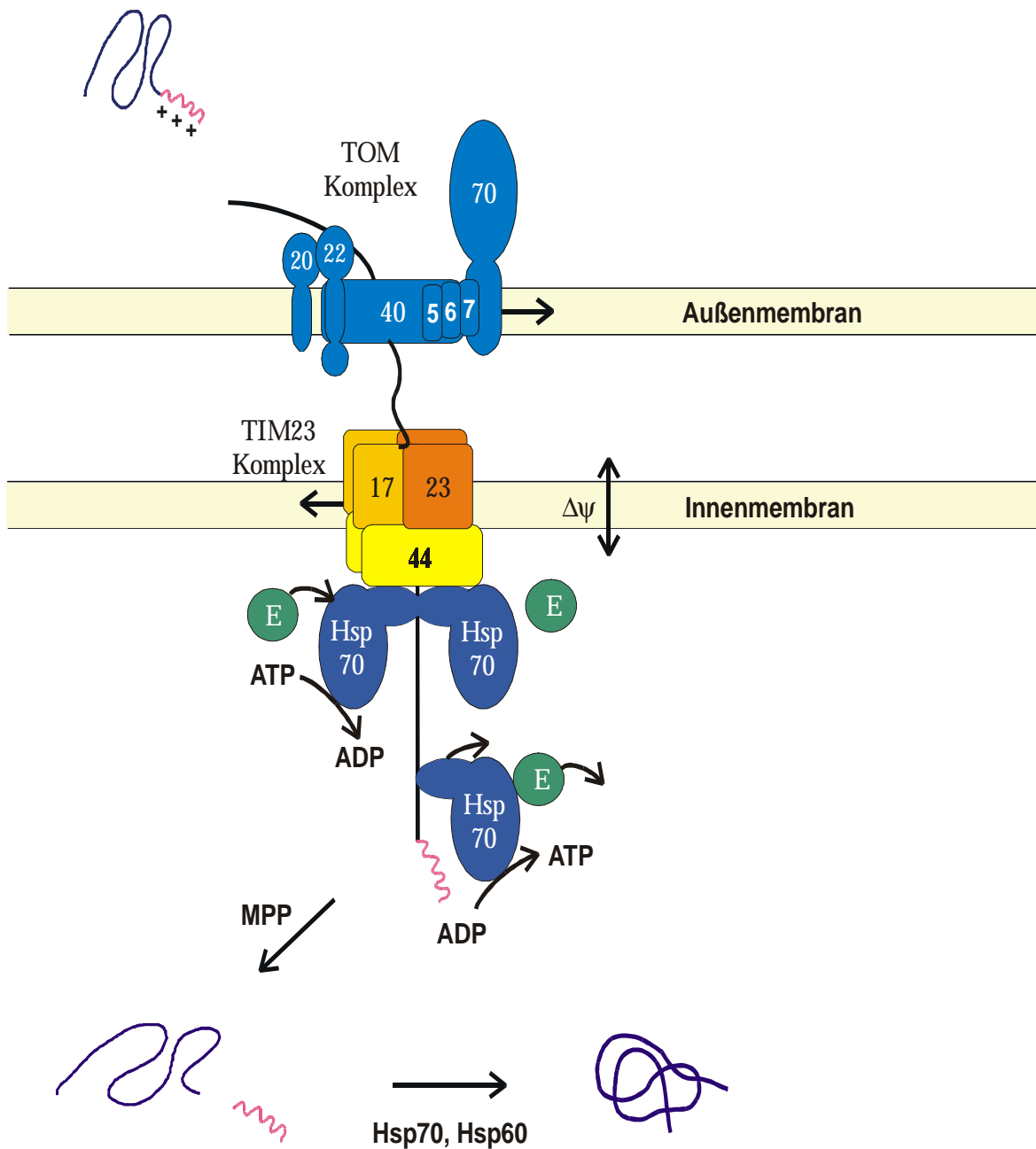


Abb. 1: Der generelle Importweg von Matrixproteinen in Mitochondrien

Das Membranpotential bewirkt die Dimerisierung der im Intermembranraum gelegenen aminoterminalen Domäne von Tim23, welches so den Rezeptor für die Signalsequenz ausbildet. Nach der Bindung der Signalsequenz dissoziiert das Tim23-Dimer und öffnet so den Importkanal (Bauer et al., 1996). Nach Durchtritt der Signalsequenz durch die Innenmembran wird diese durch einen Komplex aus Tim44 und Hsp70 gebunden. Nach ATP-Hydrolyse dissoziiert das Hsp70 in seiner ADP-Form vom Tim44 ab, wobei das Vorstufenprotein zunächst noch am Hsp70 gebunden bleibt. Durch Austausch des ADP

gegen ATP verliert das Hsp70 seine Affinität zum Vorstufenprotein und kann wieder einen Komplex mit Tim44 bilden. Die Bindung und die Dissoziation des Hsp70 vom Tim44 sowie der Nukleotidaustausch im Hsp70 erfolgt unter Mitwirkung des Nukleotidaustauschfaktors Mge1p (Schneider et al., 1996, Westermann et al., 1995).

Durch die Bindung des Vorstufenproteins an Tim44-Hsp70.ATP sowie an Hsp70.ADP wird ein Zurückgleiten des Vorstufenproteins in den Intermembranraum verhindert und ein gerichteter Transport ermöglicht (Modell des Brownschen Sperrhakens) (Ungermann et al., 1994).

Sobald das mit dem Vorstufenprotein assoziierte Hsp70 weit genug von der Importpore entfernt ist, exponiert ein neuer Abschnitt für die Bindung an Tim44/Hsp70. Somit kann der Zyklus beliebig oft wiederholt und das gesamte Protein in die Matrix „gezogen“ werden (Schneider et al., 1994, Kronidou et al., 1994, Rassow et al., 1994, Westermann et al., 1995).

Ein weiteres Modell für die Translokation über die Innenmembran ist das „Swinging Crossbridge“-Modell, das dem Modell des Brownschen Sperrhakens stark ähnelt, allerdings die Energetik des Translokationsprozesses anders erklärt: Beim an Tim44 gebundenen Hsp70 finden Konformationsänderungen statt, die mit der Hydrolyse von ATP einhergehen. Durch diese Konformationsänderung kann eine Zugkraft generiert werden, die das Vorstufenprotein in die Matrix zieht (Glick, 1995, Pfanner and Meijer, 1995, Matouschek et al., 1997).

Nach dem Eintritt in die mitochondriale Matrix wird das aminoterminalen Signalpeptid durch die Matrixprozessierungspeptidase (α,β -MPP) abgespalten (Hawlitschek et al., 1988, Arretz et al., 1991, Arretz et al., 1994). Im Anschluss an die Translokation und Prozessierung werden die Proteine durch Mitwirkung der Chaperoninsystems Hsp60/10 (Cheng et al., 1989, Höhfeld and Hartl, 1994) bzw. der Chaperone Hsp70/Mdj1p/Mge1p (Rowley et al., 1994, Westermann et al., 1995; Westermann et al., 1996) in einen gefalteten und aktiven Zustand überführt.

1.2.3. Import von Intermembranraum- und Innenmembranproteinen

Für den Import von Intermembranraumproteinen ist kein allgemeingültiger Mechanismus verantwortlich (zur Übersicht: siehe Neupert, 1997).

Außenmembran unabhängig von proteasesensitiven Komponenten des TOM-Komplexes zu erfolgen (Mayer et al., 1995).

Für den Import von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran gibt es ebenfalls keinen einheitlichen Mechanismus, untersucht wurde der Importmechanismus u.a. für einige Proteine, die eine spaltbare aminoternale Signalsequenz besitzen. Allerdings ist auch hier unklar, ob diese Proteine vor der Insertion in die Innenmembran zunächst in die Matrix importiert werden (Mechanismus der „konservativen Sortierung“) oder ob sie aus der TIM23-Pore direkt in die Innenmembran gelangen (Stop-Transfer-Mechanismus) (zur Übersicht: siehe Neupert, 1997, Tokatlidis and Schatz, 1999).

Ebenfalls wurden Untersuchungen zum Import von Proteinen mit internen Signalsequenzen angestellt, zu denen neben Tim23 und Tim17 vor allem die mitochondrialen Transporterproteine gehören. Vertreter dieser Klasse, wie etwa der ADP/ATP-Transporter (AAC, ADP/ATP-Carrier), werden über einen eigenen Translokationsweg in die mitochondriale Innenmembran importiert, der den TOM-Komplex, den TIM9/10/12-Komplex sowie den TIM22-Komplex umfasst (siehe Abb. 2 sowie Übersichtsartikel für den Import von Transporterproteinen: (Voos et al., 1999, Tokatlidis and Schatz, 1999, Bauer, 2000, Köhler, 2000). Transporterproteine bestehen aus mehreren Modulen mit unterschiedlichen Importsignalen für die Interaktion mit Tom70, Tim10 und Tim12 sowie für die Insertion in die Innenmembran (Endres et al., 1999, Ryan et al., 1999).

Für den Durchtritt durch die Außenmembran binden die Transporterproteine zunächst an den Rezeptor Tom70 des TOM-Komplexes (Söllner et al., 1990, Hines et al., 1990, Schlossmann et al., 1994, Brix et al., 1997, Ryan et al., 1999, Endres et al., 1999) und werden dann durch die Importpore über die Außenmembran in den Intermembranraum geleitet, wo sie zunächst mit dem TIM9/10/12-Komplex interagieren (Adam et al., 1999), (Koehler et al., 1998), um dann zum TIM22-Komplex zu gelangen (Sirrenberg et al., 1996, Kerscher et al., 1997, Sirrenberg et al., 1998). Die Interaktion der Transporterproteine mit dem TIM9/10/12-Komplex erfolgt über die zinkabhängige Bindung jedes Moduls an den „Zinkfinger“ eines Tim10-Moleküls (Sirrenberg et al., 1998). Durch die Bindung der Transporterproteine an den TIM9/10/12-Komplex wird die Exposition dieser hydrophoben Proteine in den Intermembranraum und die daraus resultierende Aggregation der Proteine in hydrophilem Milieu verhindert.

Der TIM22-Komplex vermittelt die Insertion der Transporterproteine in die Innenmembran, dieser Prozess ist zusätzlich vom Membranpotential über die Innenmembran abhängig.

1.2.4. Import von Außenmembranproteinen

Der Mechanismus des Imports von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran ist ebenfalls weitgehend unbekannt und wurde bislang hauptsächlich für Porin (VDAC) und die Komponenten des TOM-Komplexes untersucht (zur Übersicht: Shore et al., 1995, Neupert, 1997, Mihara, 2000). In Abhängigkeit von ihrer Struktur besitzen die Proteine unterschiedliche Signalsequenzen und werden entsprechend auf unterschiedliche Weise in die Außenmembran importiert.

Der Import von Proteinen mit mehreren Transmembrandomänen in die Außenmembran

Zu Proteinen mit mehreren Transmembrandomänen, die nach strukturellen Voraussagen möglicherweise eine β -Barrelstruktur ausbilden können, zählen Porin (VDAC) und Tom40.

Beide Proteine werden über den rezeptorabhängigen Importweg in die mitochondriale Außenmembran importiert. So ist die Membraninsertion von Tom40 abhängig von Tom20, Tom70 und Tom22 (Kiebler et al., 1993, Keil et al., 1993), die Assemblierung von Tom40 in bereits bestehende TOM-Komplexe erfolgt über Tom20 (Rapaport and Neupert, 1999). Der Mechanismus des Imports von Porin wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Schleiff et al. gelang es, Porin in Lipidvesikel mit rekonstituiertem Tom20 zu importieren (Schleiff et al., 1999). Da zudem ein gleichzeitiger Import des Vorstufenproteins pODHFR (Fusionsprotein aus der Präsequenz der Ornithincarbamyltransferase und der DHFR), bzw. die *tom40-3-ts* -Mutation keinen Einfluss auf die Insertion von Porin in die Außenmembran hatten, schlussfolgerten die Autoren, daß für den Import von Porin eine Interaktion mit Tom20 ausreichend sei, und die vom TOM-Komplex gebildete Importpore nicht benutzt werde (Schleiff et al., 1999). Dagegen stehen Daten, die belegen, daß Porin über den generellen Importweg in die Mitochondrien importiert wird (Pfaller et al., 1988, Hönlinger et al., 1996, Millar and Shore, 1996, Dietmeier et al., 1997, van Wilpe et al., 1999, Krimmer et al., 2001). Da Krimmer et al. nicht nur die Insertion in die Außenmembran, sondern auch die Assemblierung in bereits bestehende Porinkomplexe als

Kriterium für den Porinimport verwendeten, erscheint es überzeugender, daß Porin über den TOM-Komplex in Mitochondrien importiert wird.

Die Importsignale von Porin und Tom40 konnten bislang nicht genau identifiziert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß verschiedene Regionen am Amino- und Carboxyterminus für den Import von Porin verantwortlich sind (Hamajima et al., 1988, Court et al., 1996). Der Bereich zwischen den Aminosäureresten 40-60 von Tom40 ist notwendig für die korrekte Assemblierung des Proteins in bereits bestehende TOM-Komplexe, es konnte jedoch bislang keine Signalsequenz für die Insertion in die Außenmembran identifiziert werden (Rapaport and Neupert, 1999, Rapaport et al., 2001). Wahrscheinlich wird bei Porin und Tom40 die Importinformation nicht durch Elemente der Primärsequenz, sondern durch eine besondere Konformation des Proteins gebildet.

Import von Proteinen mit einer Transmembrandomäne

Die Signalsequenz für den Import von Membranproteinen mit einer Transmembrandomäne kann entweder am Amino- oder am Carboxyterminus lokalisiert sein. Sie wird offenbar durch die Transmembrandomäne selbst sowie die in aminoterminaler oder carboxyterminaler Richtung angrenzenden Aminosäuren gebildet und während des Imports nicht abgespalten.

Einige Außenmembranproteine, wie z.B. Tom20 und Tom70 enthalten relativ gut charakterisierte, direkt am Aminoterminus gelegene sogenannte "Signalankersequenzen". Bei diesen Proteinen enthalten die für den Import essentiellen Sequenzbereiche neben der Transmembrandomäne positiv geladene Aminosäuren, die eine wichtige Rolle bei der Insertion in die mitochondriale Außenmembran spielen (zur Übersicht: Shore et al., 1995, Mihara, 2000).

So konnte für Tom20 gezeigt werden, daß ein Verlust positiv geladener Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne zum Fehlimport in das Endoplasmatische Retikulum führt (Kanaji et al., 2000).

Das Importsignal von *Saccharomyces cerevisiae* Tom70 wurde ebenfalls eingehend untersucht – es befindet sich am Aminoterminus des Proteins, die Aminosäurereste 11-29 bilden die Transmembrandomäne, welche für die Erkennung des Proteins und die Insertion in die Außenmembran ausreichend ist. Der Bereich der Aminosäurereste 1-10 ist sehr hydrophil und positiv geladen, er bewirkt eine bessere Importeffizienz von Tom70 in die Außenmembran (Hurt et al., 1985, McBride et al., 1992, Steenaart et al., 1996).

Bei einer weiteren Gruppe von Außenmembranproteinen, die u.a. Cytochrom b₅, Bcl₂, Monoamin Oxidase und VAMP-1B umfasst, befindet sich der Membrananker direkt am Carboxyterminus (Bezeichnung der Gruppe in Englisch: „tail anchored proteins“). Die Signalsequenzen dieser Proteine umfassen neben der Transmembrandomäne die carboxyterminal von ihr gelegenen Aminosäurereste, wobei auch hier positiv geladene Aminosäuren oft essentiell für den Import in Mitochondrien sind (Mitoma and Ito, 1992, Nguyen et al., 1993, Isenmann et al., 1998, Kuroda et al., 1998).

Tom22 ist ein Außenmembranprotein, dessen Transmembrandomäne von relativ großen Domänen auf der cytosolischen und der Intermembranraumseite flankiert wird. Der aminoterminal von der Transmembrandomäne gelegene Bereich von Tom22 ist essentiell für den Import (Rodriguez-Cousino et al., 1998, Egan et al., 1999). In *Neurospora crassa* Tom22 ähnelt die Aminosäuresequenz in diesem Bereich der für Matrixproteine typischen amphipathischen α -Helix (von Heijne, 1986, Roise et al., 1988). Allerdings kommt den positiv geladenen Aminosäureresten dieses Bereichs keine herausragende Bedeutung für den Import zu (Rodriguez-Cousino et al., 1998).

Die Membraninsertion von Tom20 und BCl₂ scheint nicht von proteasesensitiven Rezeptordomänen, wie von Tom20, Tom70 und Tom22 abhängig zu sein (Schneider et al., 1991, Nakai et al., 1993, Nguyen et al., 1993). Dagegen ist die Membraninsertion von Tom22 abhängig von diesen Rezeptoren (Keil and Pfanner, 1993, Rodriguez-Cousino et al., 1998). Allerdings entfällt diese Abhängigkeit, wenn die am Carboxyterminus gelegene und in den Intermembranraum ragende Domäne von Tom22 deletiert wird (Rodriguez-Cousino et al., 1998). Es wird die Notwendigkeit der Interaktion der Rezeptoren mit dem Carboxyterminus für eine Positionierung und Entfaltung von Tom22 diskutiert, um so einen effizienteren Transport durch die Importpore zu gewährleisten.

Bei der Untersuchung des Imports von Tom70 konnte gezeigt werden, daß die Insertion in die Außenmembran zwar nicht von proteasesensitiven Rezeptordomänen abhängt. Die Assemblierung in bereits bestehende TOM-Komplexe erfolgt jedoch in Abhängigkeit von diesen Domänen (Schlossmann and Neupert, 1995).

1.3. Tom5, Tom6 und Tom7 und ihre Rolle im TOM-Komplex

Neben den in Abschnitt 1.2.1.2. beschriebenen Komponenten enthält der TOM-Komplex noch drei Komponenten, Tom5, Tom6 und Tom7. Bislang konnten nur in *Saccharomyces cerevisiae* alle 3 Komponenten identifiziert werden (Dietmeier et al., 1997, Kassenbrock et al., 1993, Hönlinger et al., 1996). Lediglich die Sequenz von Tom7 konnte in mehreren anderen Organismen, neben *Saccharomyces cerevisiae* auch in *Saccharomyces pombe*, *Homo sapiens* (RA Hu et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (RA Wilson et al., 1994), *Solanum tuberosum* (Jansch et al., 1998) und *Glycine maxima* identifiziert werden, wobei die Aminosäuresequenz sehr stark konserviert ist.

Alle drei Proteine sind integrale Membranproteine und besitzen eine Transmembrandomäne an ihrem carboxyterminalen Ende. Von Tom6 ist bekannt, daß der Aminoterminus zum Cytosol exponiert ist (Dietmeier et al., 1997, Alconada et al., 1995, Hönlinger et al., 1996). In *Saccharomyces cerevisiae* sind Tom5, Tom6 und Tom7 integrale Bestandteile des TOM-Komplexes, allerdings dissoziieren sie bei Lyse der Mitochondrien mit Triton X100 vom TOM-Komplex ab (Dekker et al., 1998). Da unter diesen Bedingungen der TOM-Core-Komplex intakt bleibt, deutet dies darauf hin, daß Tom5, Tom6 und Tom7 in *Saccharomyces cerevisiae* nicht sehr fest mit dem TOM-Komplex verbunden sind.

Tom5, Tom6 und Tom7 sind in *Saccharomyces cerevisiae* nicht essentiell für das Überleben der Zelle, die Disruption der entsprechenden Gene hat nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum der Zelle, lediglich die Disruption von Tom5 führt zu einem temperatursensitiven Phänotyp. Allerdings führt die Doppeldisruption von Tom6 und Tom7 unter den Bedingungen des Wachstums in Medium mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle ebenfalls zu einem temperatursensitiven Phänotyp (Hönlinger et al., 1996).

Tom6 und Tom7 scheinen eine Rolle für die Stabilität des TOM-Komplexes zu spielen, insbesondere für die Interaktion der Rezeptorkomponenten Tom20 und Tom70 mit den Komponenten des Kernkomplexes sowie innerhalb des Kernkomplexes für die Assoziation von Tom22 mit Tom40. So führt die Disruption von Tom6 zur Destabilisierung des TOM-Komplexes und zum Zerfall des 400 kDa großen Komplexes in ca. 100 kDa große Subkomplexe, die zwar Tom40, Tom5 und Tom7, jedoch kein Tom22 mehr enthalten (Alconada et al., 1995, Dekker et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, daß durch Überexpression von Tom6 eine Suppression der *tom40-3-ts*-Mutation möglich ist

(Kassenbrock et al., 1993). Der Import von mitochondrialen Proteinen wird durch Disruption von Tom6 nur teilweise beeinflusst: Die Vorstufenproteine akkumulieren zwar noch an der Oberfläche der Mitochondrien, inserieren jedoch nur noch mit verminderter Effizienz durch die Importpore in die Mitochondrien (Alconada et al., 1995). Wahrscheinlich ist die geringere Effizienz des mitochondrialen Imports in einer durch die Disruption verursachten Veränderung der Struktur des TOM-Komplexes begründet.

Im Gegensatz zur Tom6-Disruption scheint die Disruption von Tom7 die Interaktion der Komponenten des TOM-Komplexes miteinander zu verstärken (Hönlinger et al., 1996, Dekker et al., 1998). Der Import mitochondrialer Proteine ist durch die Disruption von Tom7 nur wenig beeinträchtigt, lediglich der Import von Porin wird durch die Disruption stärker gehemmt. Es wird daher vermutet, daß Tom7 eine Rolle beim lateralen Transport von Porin aus der TOM-Pore in die Außenmembran spielt (Hönlinger et al., 1996).

Im Unterschied zu Tom6 und Tom7 hat Tom5 in *Saccharomyces cerevisiae* keine Funktion für die Stabilität des Tom-Komplexes, sondern für den Import von mitochondrialen Proteinen. Es konnte durch chemische Quervernetzungsexperimente gezeigt werden, daß Vorstufenproteine mit Tom5 interagieren. Die Disruption von Tom5 führte folgerichtig zu einer signifikanten Hemmung des Imports dieser Proteine in Mitochondrien (Dietmeier et al., 1997).

Biogenese von Tom5, Tom6 und Tom7 in Saccharomyces cerevisiae

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß in Retikulozytenlysat synthetisierte Vorstufen von Tom5, Tom6 und Tom7 *in vitro* in die Außenmembran von Mitochondrien inserieren bzw. in bereits bestehende TOM-Komplexe assemblieren können (Hönlinger et al., 1996, Dekker et al., 1998, Cao and Douglas, 1995). Der Charakter des Importsignals sowie der Mechanismus des Imports wurde jedoch lediglich für Tom6 näher untersucht.

Ein Fusionsprotein, bestehend aus DHFR und Tom6 kann *in vitro* in die Membran inseriert bzw. *in vivo* importiert werden, wenn die DHFR mit dem Aminoterminus von Tom6 fusioniert wird (DHFR Tom6) (Cao and Douglas, 1995). Die Überexpression von DHFR-Tom6 *in vivo* führt wie die von Tom6 zur Verhinderung des *tom40 ts*-Phänotyps (Kassenbrock et al., 1993, Cao and Douglas, 1995). Wenn dagegen die DHFR mit dem Carboxyterminus von Tom6 fusioniert wird (Tom6-DHFR), erfolgt keine Membraninsertion bzw. kein Import. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Aminosäurereste 15-61, welche einen Teil der cytosolischen Domäne, die

Transmembrandomäne und den im Intermembranraum gelegenen Carboxyterminus umfassen, essentiell für den korrekten Import sind (Cao and Douglas, 1996). Der Import von DHFR-Tom6 in Mitochondrien ist unabhängig von proteasesensitiven Rezeptoren auf der Oberfläche der Mitochondrien (Cao and Douglas, 1995). Die von Cao et al. durchgeführten *in vitro*-Importexperimente sind insofern in ihrer Aussage eingeschränkt, als lediglich die Membraninsertion, nicht jedoch die Assemblierung in bereits bestehende TOM-Komplexe untersucht wurde.

1.4. Der Mechanismus der Interaktion von Matrixproteinen mit dem TOM-Komplex

Der in der mitochondrialen Außenmembran gelegene TOM-Komplex muss sowohl die spezifische Erkennung mitochondrialer Proteine als auch deren Eintransport in die Mitochondrien gewährleisten.

Die Signalsequenz mitochondrialer Matrixproteine besteht aus einer amphipathischen α -Helix, die auf einer Seite positiv geladene, auf der anderen Seite ungeladene Aminosäuren enthält (von Heijne, 1986, Roise et al., 1988). Andererseits besitzen zahlreiche Komponenten des TOM-Komplexes Bereiche mit negativ geladenen Aminosäuren. So sind die cytosolischen Domänen von Tom5, Tom20 und Tom22 sowie die Intermembranraumdomäne von Tom22 negativ geladen (Kiebler et al., 1993, Bolliger et al., 1995, Dietmeier et al., 1997). Es lag daher nahe anzunehmen, daß die Interaktion der Signalsequenz von Vorstufenproteinen mit Tom20 und Tom22 auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (Lithgow et al., 1994, Hönlinger et al., 1995, Schatz, 1997, Komiya et al., 1998). Der Transport von mitochondrialen Proteinen wird auf der Grundlage dieses Modells durch die negativ geladenen Domänen der TOM-Komponenten vermittelt, dabei soll der Eintransport in die Mitochondrien über Tom20, Tom22 (cytosolische Domäne), Tom5 und Tom22 (Intermembranraumdomäne) zur ebenfalls negativ geladenen Intermembranraumdomäne von Tim23 erfolgen. Die Triebkraft für die Translokation über die Außenmembran wird in diesem Modell mit der steigenden Affinität der Vorstufenproteine zu den entsprechenden Rezeptordomänen begründet („Acid Chain-Modell“, Schatz, 1997, Komiya et al., 1998).

In der Tat gibt es Daten, die ein solches Modell unterstützen: So kann der *in vitro* Import von Matrixproteinen durch hohe Salzkonzentrationen inhibiert werden (Haucke et al., 1995). Für die Translokation von Vorstufenproteinen über die mitochondriale Außenmembran wurden zwei unterschiedliche Bindungszustände beschrieben, die sich

durch eine unterschiedliche Stabilität der Bindung in Gegenwart von Salz unterscheiden. Die sogenannte *cis*-Bindung ist nur bei niedrigen Salzkonzentrationen nachweisbar und könnte die Bindung des Vorstufenproteins an die cytosolischen Domänen von Tom20 und Tom22 repräsentieren, während die sogenannte *trans*-Bindung auch bei höheren Salzkonzentrationen stabil bleibt (Mayer et al., 1995, Rapaport D. et al., 1998). Die *trans*-Bindung, bei der Tom40 eine wesentliche Rolle spielt, könnte auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, wodurch die höhere Stabilität der Bindung gegenüber Salz erklärt wäre.

Des Weiteren führt die Disruption von Tom5 zu einem verminderten Import in Mitochondrien, ohne daß die Bindung von Vorstufenproteinen an Mitochondrien betroffen ist (Dietmeier et al., 1997). Die Beeinträchtigung des Proteinimports wird mit einer Rolle der negativ geladenen cytosolischen Domäne von Tom5 begründet.

Auch konnte bei der Verwendung von immobilisierten isolierten cytosolischen Domänen von Tom 22 die Salzsensitivität der Bindung von Präproteinen gezeigt werden (Komiya et al., 1998, Schleiff et al. 1997, Brix et al., 1997).

Andererseits wurde bisher kein direkter experimenteller Beweis für das „Acid chain-Modell“ erbracht. Bei der Untersuchung der Sensitivität der Bindung von Präproteinen an die cytosolische Domäne von Tom20 gegenüber höheren Salzkonzentrationen ergaben sich widersprüchliche Resultate: während höhere Konzentrationen von Kaliumacetat zu einer stark verminderten Bindung des Präproteins an die cytosolische Domäne von Tom20 führen (Komiya et al., 1998), wird diese durch höhere Konzentrationen an KCl sogar noch verstärkt (Brix et al., 1997). Eine NMR-Analyse der Struktur der cytosolischen Domäne von Tom20, die mit einem Präsequenzpeptid im Komplex vorlag zeigte, daß die Bindung der Präsequenz an Tom20 hauptsächlich auf hydrophoben Interaktionen beruht, während elektrostatische Wechselwirkungen die Bindung zwar stabilisieren, jedoch nicht essentiell für diese Bindung sind (Abe et al., 2000).

Die Bedeutung der in der cytosolischen Domäne von Tom5 enthaltenen negativ geladenen Aminosäuren für die Interaktion mit Vorstufenproteinen ist ebenfalls nicht bewiesen. Untersuchungen der Struktur der cytosolischen Domäne von Tom5 durch NMR (Nuclear Magnetic Resonance) ergaben vielmehr, daß Tom5 keine zur Präsequenz komplementäre Struktur ausbildet (Hammen and Weiner, 2000).

Außerdem hat die Mutation negativ geladener Aminosäuren der cytosolischen Domäne von Tom22 keinen wesentlichen Verlust der Importkompetenz zur Folge (Nargang et al., 1998).

Ebenso ist die Rolle der in den Intermembranraum ragenden carboxyterminalen Domäne von Tom22, welche aufgrund ihrer Lokalisierung und negativen Ladung die Funktion der oben beschriebenen *trans*-Bindungsstelle ausüben könnte strittig. Die Deletion dieser Domäne durch verschiedene Arbeitsgruppen zeigte sehr unterschiedliche Auswirkungen: während Bolliger et al. einen dramatischen Effekt auf den Proteinimport in Mitochondrien sowie auf das Wachstum der Zelle (Bolliger et al., 1995) feststellten, konnten andere Arbeitsgruppen keinerlei Effekte beobachten (Nakai et al., 1995, Court et al., 1996). Eine Interaktion der Domäne mit Vorstufenproteinen ist daher bis heute umstritten. Weitere Untersuchungen zum Charakter der *trans*-Bindung ergaben, daß Tom40 eine wesentliche Rolle bei der Interaktion mit Vorstufenproteinen zukommt. Die *trans*-Bindung umfasst außerdem nicht nur die Interaktion von Tom-Komponenten mit der Präsequenz, vielmehr ist auch die Entfaltung des reifen Teils des Proteins und die Exposition hydrophober Bereiche für eine stabile Interaktion mit dem TOM-Komplex erforderlich (Rapaport et al., 1997, Rapaport D. et al., 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der dem „Acid-Chain-Modell“ zugrunde gelegte elektrostatische Charakter der Interaktion von Vorstufenproteinen mit den Komponenten des TOM-Komplexes nicht ausreichend ist, um die Translokation über die mitochondriale Außenmembran zu erklären. Vielmehr scheint dieser Prozess auch weitere, in ihrer Gesamtheit bislang nur unzureichend verstandene Interaktionen zwischen dem TOM-Komplex und Vorstufenproteinen zu umfassen.

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel vorliegender Arbeit bestand in der vollständigen Sequenzierung und anschließenden Charakterisierung von Komponenten des TOM-Komplexes aus *Neurospora crassa* mit einem Molekulargewicht von 5-7 kDa. Des weiteren sollte der Import und die Assemblierung dieser Komponenten in bereits bestehende TOM-Komplexe charakterisiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt vorliegender Arbeit war die quantitative Charakterisierung der Bindung von mitochondrialen Vorstufenproteinen an isolierten TOM-Komplex aus *Neurospora crassa*. Dies sollte dem besseren Verständnis des Translokationsprozesses von Proteinen über die mitochondriale Außenmembran dienen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Verwendete Plasmide

Für die Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro* wurden Plasmide der pGEM-Reihe (Promega) verwendet, welche die entsprechende cDNA unter Kontrolle des SP6-Promoters enthielten. Für die Expression von pSu9(1-69)-DHFR-GST bzw. DHFR-GST wurde die entsprechende cDNA in den Vektor pETGEXCT (Sharrocks, 1994) kloniert.

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

Minipräparation: Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden Bakterien aus 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp (Luria-Bertani-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl; supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) für 30 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 200 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl 0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v) wurden die Zellen lysiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde mit 400 µl 3,2 M Natriumacetat, pH 5,5 neutralisiert, und nach 5 min Zentrifugation bei 14.000xg der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 900 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 15 min bei 15000xg sedimentiert. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser (bidest.) resuspendiert.

Midipräparation: Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis ca. 0,2 mg) wurde der "Jetstar"-Kit der Firma Genomed verwendet. Eine Anionen-Austausch-Säule wurde mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden die Bakterien aus 50 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Medium mit Ampicillin durch 5 min Zentrifugation bei 3000xg sedimentiert. Die Zellen wurden in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Das Zell-Lysat wurde durch Zugabe von 4,5 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 15.000xg wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Es wurde mit 20 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen und mit 5 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl,

100 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (15.000xg, 30 min, 4°C) aus dem Eluat gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.1.3. Polymerasekettenreaktion PCR

(Saiki et al. 1985)

Die Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente spezifisch zu vervielfachen. Als Primer werden zwei kurze Oligonukleotide verwendet, die zu bestimmten Sequenzen der DNA-Matrize komplementär sind. Durch eine thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) werden die freien 3'-Enden der Primer zu zwei neuen komplementären DNA-Strängen verlängert. Jeder Reaktionszyklus führt zu einer Verdoppelung des DNA-Fragmentes. Ein typischer Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion hatte folgendes Aussehen:

- | | |
|---------------------------|--|
| 1. 3 min, 94°C | Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung |
| 2. 30 Zyklen: 1 min, 94°C | Denaturierung der DNA |
| 1 min, 50°C | Binden der Oligonukleotide |
| 1 min, 72°C | Polymerasereaktion |
| 3. 4 min, 72°C | Vervollständigung des letzten Reaktionsschrittes |
| 4. Abkühlen auf 4°C | |

Jeder Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 2 U *Taq*-Polymerase, je 50 µM dNTPs und je 100 pmol Oligonukleotid in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Als Matrize wurden jeweils 0,1 µg DNA verwendet. Alle Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen der Reaktionslösung zu verhindern. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein präparatives Agarosegel geladen, extrahiert und anschließend entweder mit Restriktionsenzymen verdaut bzw. durch T/A-Klonierung in den PCR2.1- bzw. in den PCR-TOPO-Vector kloniert.

2.1.4. Liste der verwendeten Primer

Primer, die für die Herstellung von Konstrukten für die Synthese mitochondrialer Proteine in pGEM4 verwendet wurden, sind im Abschnitt „Klonierungsstrategien“ aufgeführt.

Primer für die Klonierung von *TOM6* und *TOM7*, mit den fett gedruckten Primern konnte ein PCR-Produkt amplifiziert werden, dessen DNA-Sequenz sich in die bereits bekannte Aminosäuresequenz übersetzen ließ.

- degenerierte Primer für *TOM6*

Tom6N1	5'-GCYAARTAYATAGAR
Tom6N2	5'-GCRAARTAYATAGAR
Tom6N3	5'-GCYAARTAYATYGAR
Tom6N4	5'-GCRAARTAYATYGAR
Tom6C1	5'-AGYTGRTCRTARGT
Tom6C2	5'-AGYTGRTCRTAYGT
Tom6C3	5'-AAYTGRTCRTARGT
Tom6C4	5'-AAYTGRTCRTAYGT

- degenerierte Primer für *TOM7*

Tom7N1	5'-GARGARTCYAARGAR
Tom7N2	5'-GARGARTCRAARGAR
Tom7 N3	5'-GARGARAGYAARGAR
Tom7C1	5'-AGYTGRCCTGRTG
Tom7C2	5'-AGYTGRCCTGRTG
Tom7C3	5'-AAYTGRCCTGRTG
Tom7C4	5'-AAYTGRCCTGRTG
Tom7C5	5'-AGRTARCCRTARTG
Tom7C6	5'-AGRTAYCCRTARTG
Tom7C7	5'-AARTARCCRTARTG
Tom7C8	5'-AARTAYCCRTARTG

- Primer für die Klonierung von *TOM6*

Tom6Fw1	5'-GAGCGCCCCGGTGGCAGCCGCAAG
Tom6Fw2	5'-AAGTCCAAGGGCTTCATCCGCTCCACT
Tom6Rev1	5'-CTGGTCGTAAGTGGAGCGGATGAA
Tom6Rev2	5'-GCCCTTGACTTGCGGCTGCCACCGGG
Tom6N	5'-GTTCCCAGCTTCATCAACCG
Tom6C	5'-GGAGGAGAGGCGATGAAGTGT
Tom6Ncosmid	5'-GTGACGGCATCAGCAGCGAA

- Primer für die Klonierung von *TOM7*

Tom7Fw1	5'-CGCATTGGCAAGCTCATCGA
Tom7Fw2	5'-GTCGTTGTTCACTATGGCTA
Tom7Rev1	5'-CGAGATGTCGATGAGCTTGC
Tom7Rev2	5'-GTAGCCATAGTGAACAACGA
Tom7N	5'-CCAGGCACACCAAATCAGGCA
Tom7C	5'-CCCAAACCTTTCTACCCATAAC

- Primer für die Herstellung von Konstrukten für die Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine

Tom6TK N	5'-ACGAGCAATTCATGCCTTCCGCCAAGTACATCGAGCGC (EcoRI)
Tom6TK C	5'-GTACCTAAGCTTTTACATTTGCACAACGAGCATCTCGCCCCA (HindIII)
Tom7TK N	5'-AAGTCACAATTCATGTTTCGCCCTTTCGGAAGAGTCCAAG (EcoRI)
Tom7TK C	5'-TTGGTAAGCTTTTACATGGAGAGCGGGGAGAGGAGGCGGAT (HindIII)
DHFRTK N	5'-AGCGAATTCATGGTTCGACCATTGAACTGC (EcoRI)
DHFR-Tom6 N	5'-GAAGTCTACGAGAAGAAAGACGGATCCATGCCTTCCGCCAAGTA CATC (BamHI)
DHFR-Tom6Δ12 N	5'-AGATTAGGATCCATGAGCCGCAAGTCCAAGTCCAAGGGCTTC (BamHI)
DHFR-Tom6Δ36 N	5'-GAAGTCTACGAGAAGAAAGACGGATCCCGCAGCATCGCCTTCTT CGGC (BamHI)
DHFR-N.c.Tom6cyt C5'	-ATACACGTGACTGCAATTGTGTATAGTGGAGA (HincII)
DHFR-S.c.Tom6TM N5'	-AGAATTGTCAACATCGCCTTCTTCGGCGCT (HincII)
DHFR-S.c.Tom6TM C5'	-TAGGCAAAGCTTTTATAATTGTGGGGCCAACAT (HindIII)

2.1.5. T/A- Klonierung von PCR- Produkten

Für die Klonierung von mit Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in Vektoren wurde das pCR 2.1-, bzw. das pCR-TOPO-System (Invitrogen) verwendet. Die Ligation und Transformation in *E.coli* erfolgte nach dem von Promega angegebenen Protokoll.

2.1.6. Enzymatische Modifikation von DNA

(Sambrook et al., 1989)

2.1.6.1. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen in doppelsträngigen DNA- Molekülen spezifische Basensequenzen. Die DNA wird dann innerhalb dieser Erkennungssequenzen gespalten. Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern durchgeführt. Es wurden etwa 2-3 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 60 min bei 37°C. Die DNA- Fragmente wurden anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.1.6.2. Dephosphorylierung von DNA- Fragmenten

(Chaconas et al. 1980)

Vor einer Ligation wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vectormoleküle mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase, CIP) entfernt, um den unerwünschten internen Ringschluß von Vektoren bei Ligationsreaktionen zu verhindern. Dazu wurden 30 µg linearisierte Vector-DNA in 100 µl CIP-Puffer (1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 10 mM Spermidin) resuspendiert und mit 1 U Enzym versetzt. Die Probe wurde dann zunächst 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 56°C inkubiert. Dann wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und nochmals wie zuvor inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12 ml 10xSTE-Puffer (1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) und Erwärmung bei 65°C beendet. Die dephosphorylierte Vector-DNA wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.1.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma NEB mit dem mitgelieferten Ligationspuffer verwendet (10x Puffer: 0,25 M Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) PEG 8000). Es wurde 1 U Enzym für

maximal 100 ng DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Das Insert lag in der Regel in einem 2-5 fachen molaren Überschuss vor. Es wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.1.7. Reinigung und Analyse von DNA

2.1.7.1. Phenol-Chloroformextraktion und Ethanolfällung

(Sambrook et al., 1989)

Durch Phenolextraktion wurden Proteine und andere Verunreinigungen, die sich an der Grenzschicht der wässrigen zur phenolischen Phase sammeln, aus DNA-haltigen Lösungen entfernt. Dazu wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Nach einer anschließenden Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und weiter verarbeitet.

Die Präzipitation mit Ethanol diente dazu, die DNA zu konzentrieren und von unerwünschten Salzen zu befreien. Dazu wurde in der DNA-Lösung eine Konzentration von 0,3 M Natriumacetat, pH 4,8 eingestellt. Anschließend wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol für 15 min bei -70°C inkubiert und anschließend 15 min bei 15000xg zentrifugiert. Nach dem Waschen der DNA mit 70 % (v/v) Ethanol und Trocknen wurde diese in H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

2.1.7.2. Gelelektrophorese von DNA

(Sambrook et al., 1989)

DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Banden auf dem Gel diente der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert und unter UV-Licht (366 bzw. 254 nm) sichtbar macht.

Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurde Agarose in einer Konzentration von 1 bis 3,5 % (w/v) eingesetzt und in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) gelöst, die Ethidiumbromidkonzentration im Gel betrug 0,25 mg/l. Als Elektrodenpuffer diente TAE, die zu analysierenden DNA-Lösungen wurden mit Auftragspuffer geladen (10xAuftragspuffer: 40 % (w/v) Saccharose,

0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 20 mM EDTA, pH 8,0), die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von bis zu 13 V/cm durchgeführt.

2.1.7.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

(Qiagen Gel Extraction Kit)

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte durch Extraktion mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits von Qiagen. Mit Hilfe dieses Kits wird die DNA aus dem Agarosegel extrahiert, bei saurem pH und hoher Salzkonzentration an eine Silicagelmembran, gebunden und anschließend mit Wasser oder 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 eluiert.

2.1.7.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, wobei der lineare Bereich zwischen 0,1–1 OD liegt.

2.1.7.5. Transfer von DNA auf Nylon-Membranen

Southern-Blot: Mit diesem Verfahren wurden DNA-Fragmente, die durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran (Nylonmembran, Pall-Gelman) unter Beibehaltung des Trennmusters übertragen und immobilisiert. Die in der Arbeit verwendete Methode war die von Southern (1975) beschriebene Kapillartechnik .

Zum besseren Transfer hochmolekularer Fragmente wurde die DNA durch Inkubation des Gels in 0,25 M HCl für 10 Min durch Depurinierung fragmentiert. Die zweimalige 30 min Inkubation des Gels in 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH denaturierte die DNA. Nach der zweimaligen Neutralisation für 30 min in 1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7,4 erfolgte der Aufbau des Southern Kapillartransfers. Als Transferpuffer wurde 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 6,6) verwendet. Nach mindestens 12 Stunden wurde der Transfer unterbrochen, die Nylonmembran kurz in 6xSSC gewaschen, an der Luft getrocknet und durch ein Backen für 2 Stunden bei 120°C irreversibel gebunden.

Dot-blot: Jeweils 1 µl der hitzedenaturierten DNA-Lösungen wurde in einem vorgeschriebenen Muster auf eine Nylonmembran aufgetragen und die DNA durch Inkubation bei 120°C für 2 Stunden immobilisiert.

Kolonie-Hybridisierung und Plaque-Hybridisierung: siehe Abschnitt: Screening von DNA-Bibliotheken

2.1.7.6. Analyse von DNA- Blots durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA- Sonden

(Southern et al., 1975)

Zur Erkennung identischer DNA-Sequenzen wurden Hybridisierungen durchgeführt. Dabei ist eine DNA-Probe auf einer Membran immobilisiert, die zweite molekular markiert (Sonde). Letzterer wird die Gelegenheit zur Anlagerung an die identischen Sequenzen der immobilisierten DNA gegeben. Die hybridisierte Sonde kann anschließend aufgrund ihrer Markierung nachgewiesen werden.

Die Hybridisierung und Detektion mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden erfolgte im wesentlichen nach der Vorschrift von Roche Diagnostics:

Hierbei wird eine DNA- Sonde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert, wobei 1/3 des dTTP durch dUTP mit kovalent gebundenem DIG (DIG-dUTP, Roche Diagnostics) ersetzt ist.

Nach der Hybridisierung erfolgt der Nachweis der Sonden durch Anlagerung eines gegen DIG gerichteten Antikörpers, der an seinem Ende das Enzym alkalische Phosphatase trägt. Das Enzym dephosphoryliert das Substrat AMPPD bzw. CSPD, dessen Reaktionsprodukt unter Lichtabgabe in ein stabileres Produkt zerfällt. Wie bei den radioaktiv markierten Sonden kann mit dem Auflegen von Röntgenfilmen diese Lichtaussendung sichtbar gemacht werden.

Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Für die Amplifikation der DIG-markierten Sonde wurden der DIG Probe Synthesis Kit von Roche Diagnostics verwendet. Ein 5 µl-Ansatz enthielt neben 5 µl PCR-Puffer und 5 µl dNTP-Mix (mit je 2 mM dNTP) jeweils 50 pmol Oligonukleotide, 0,1 µg Matrizen-DNA.

Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Nach dem Transfer der DNA auf Nylonmembranen (siehe Abschnitt Southern Blot bzw. Dot-Blot) erfolgte zunächst eine 2-stündige Prähybridisierung bei 41°C in Standardhybridisierungspuffer (5xSSC, 50 % Formamid, 0,1 % Natrium-Laurylsarcosin, 0,02 % SDS, 2 % Blockreagenz). Im Anschluss daran wurde die Membran über Nacht bei 41°C mit der in Standardhybridisierungspuffer gelösten DIG-markierten Sonde inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch an die Membran gebundener DNA wurde die Membran zunächst zweimal mit Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1 % SDS) gewaschen, es folgte eine zweimalige Inkubation bei 60°C in Waschlösung 2 (0,5xSSC, 0,1 % SDS).

Nachweis DIG-markierter Sonden

Zum Nachweis der DIG-markierten Sonde auf der Nylonmembran wurde diese kurz mit dem Puffer P1 (150 mM NaCl, 0,3 % Tween 20, 100 mM Maleinsäure, pH 7,5) inkubiert, anschließend wurde die Membran durch Inkubation für 30 min in Blocklösung (1 % (w/v) Blockreagenz in Puffer P1) abgesättigt. Es folgte die Dekoration mit dem DIG-spezifischen Antikörper, dazu wurde der Antikörper 1:10000 in Blocklösung verdünnt und für 30 min mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit dem Puffer P1 gewaschen.

Für die Aktivierung der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase wurde die Membran anschließend für 5 min in Puffer P3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5) inkubiert, es folgte eine Inkubation für 5 min mit dem Substrat CSPD, das 1:100 in Puffer P3 verdünnt war. Die Chemilumineszenzreaktion lief bei 37°C ab und wurde durch einen Röntgenfilm (Fuji NewRX) detektiert.

Zum Ablösen der an die Membran gebundenen Sonden wurde die Membran zunächst kurz in H₂O (bidest) gewaschen und anschließend die Sonde in der NaOH/SDS- Lösung (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) für zweimal 15 min bei 37°C von der Membran gelöst. Nach dem Waschen in 2xSSC für 5 min konnte die Membran entweder getrocknet oder sofort für das nächste Hybridisierungsexperiment eingesetzt werden.

2.1.7.7. DNA- Sequenzierung

(Sequenase Kit 2.0, United States Biochemicals)

Die DNA- Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruch-, oder „Dideoxy“-Verfahren (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Das Prinzip besteht in der Synthese eines radioaktiven DNA-Stranges durch die Sequenase, eine proteinchemisch modifizierte T7-DNA-Polymerase, wobei der für die Sequenzierung eingesetzte Primer das 5'-Ende des radioaktiven Stranges festlegt. Durch Inkorporation von 1'3'-Dideoxynucleosid-Triphosphaten (ddNTP) kommt es zu basenspezifischen Kettenabbrüchen. In den vier parallelen Reaktionsansätzen einer Sequenzierung befinden sich neben den vier dNTPs jeweils eines der ddNTPs, so daß es in jedem Reaktionsansatz zu ddNTP spezifischen Kettenabbrüchen kommt. Die Auftrennung der vier Reaktionsansätze erfolgt nach der Größe in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Markierung der DNA erfolgte durch [α -³⁵S]dATP, für die Sequenzierung wurde doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt, die vor der Sequenzreaktion alkalisch denaturiert wurde.

Sequenzierungsreaktion: 5 µg DNA wurden in 18 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit 2 µl Denaturierungslösung (2 M NaOH, 2 mM EDTA) für 5 min bei 25°C denaturiert. Durch Zugabe von 8 µl 5 M Ammoniumacetatlösung, pH 4,8 wurde die Lösung neutralisiert. Die DNA wurde mit 100 µl Ethanol 5 min bei -70°C gefällt, 15 min bei 15000xg und 4°C sedimentiert, mit kaltem Ethanol gewaschen, 20 min an der Luft getrocknet und in 7 µl Wasser resuspendiert.

Dann wurden 2 µl 5xSequenase-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) und 1 µl (5 pmol) Primer hinzugegeben. Der Ansatz wurde 2 min bei 65°C inkubiert und über 15 min hinweg auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurde auf Eis hinzugegeben: 1 µl 100 mM DTT, 2 µl Labeling-Mix (je 1,5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl [α -³⁵S] dATP-Lösung (10 µM; 10 Ci/µl) und 2 µl verdünnte Sequenase (1:8 in Enzymverdünnungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA). Der Ansatz wurde exakt 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden je 3,5 µl mit je 2,5 µl der vier Terminationsmische (je 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 µM ddNTP, 50 mM NaCl) gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 4 µl Stopplösung (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v)

Xylenxyanol) je Ansatz gestoppt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und unmittelbar, bevor sie auf das Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, 1 min bei 95°C denaturiert.

Polyacrylamidgelelektrophorese: Für die Elektrophorese wurde ein 6 % Polyacrylamidgel verwendet: 25 g Harnstoff, 1xTBE (45 mM Tris/Borat, pH 8,0, 1 mM EDTA), 7,5 ml 40 % Acrylamid (38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid), H₂O zu einem Endvolumen von 50 ml, 100 µl 10 % APS, 50 µl TEMED.

Als Elektrodenpuffer wurde 1xTBE verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 70 V/cm durchgeführt. Das unbeladene Gel wurde vorher 30 min bei 70 V/cm erwärmt. Das Gel wurde unfixiert auf ein Whatman-Filterpapier überführt und getrocknet. Zur Detektion der Banden wurde ein Röntgenfilm (Fuji New RX) aufgelegt.

Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurde durch die Firma Toplab, Martinsried durchgeführt.

2.1.8. Durchmusterung von DNA- Bibliotheken

In Abhängigkeit von der Art der zu durchsuchenden DNA-Bibliothek wurden folgende Methoden angewandt:

Cosmid-DNA-Pools (genomische DNA): Diese Methode diente zur schnellen Einengung eventuell positiver Klone. In dieser Arbeit wurde eine von Orbach entwickelte genomische DNA-Bibliothek verwendet (Orbach M., 1994). Diese genomische DNA-Bibliothek enthält 2400 individuelle *E.coli* Klone, die in 25 Mikrotiterplatten in LB/Glycerinmedium einsortiert sind.

Die Klone wurden mit einem Mehrfachstempel auf Platten mit LB-Agarplatte mit Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sämtliche Klone einer Mikrotiterplatte zusammengefasst und Cosmid-DNA isoliert (analog zu 2.1.2.). Von jedem dieser DNA- Pools wurden 0,1 µg, 0,01 µg und 0,001 µg auf eine Nylonmembran übertragen (siehe Dot-blot). Die darauf folgende Hybridisierung mit einer Sonde identifizierte die DNA-Pools, welche die DNA von mindestens einem Klon mit gesuchter Sequenz enthielt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Kolonie-Hybridisierung (genomische Bibliothek): Das Prinzip dieser Methode ist eine *in situ* Lyse von Bakterienkolonien auf Nylon-Membranen und die Bindung der freigesetzten DNA an diese Membran. Mit einer Sonde kann anschließend der Klon identifiziert werden, der ein Plasmid/Cosmid mit gesuchter Sequenz trägt.

Die Klone einer Mikrotiterplatte der geordneten genomischen *N.crassa* Bank wurden mit einem Mehrfachstempel auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin gebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das zweimalige Auflegen von Nylonmembranen von jeweils 5 min Dauer bewirkte eine Übertragung von Bakterienzellen auf diese Membran unter Beibehaltung des Abimpfmusters. Die Lyse der Bakterien und die gleichzeitige Denaturierung der freigesetzten DNA erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation auf Whatmanpapier, der mit der Denaturierungslösung I (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) getränkt war. Eine zweimalige Inkubation für 5 min auf der Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7,5) neutralisierte die Membran. Die darauffolgende 5-minütige Inkubation in der 2xSSC-Lösung (siehe 2.1.7.5.) diente zur Entfernung von Bakterienresten von der Membran, um unspezifische Signale zu vermeiden. Die Fixierung der DNA erfolgte durch Inkubation der Nylonmembran für 2 h bei 120°C.

Plaque-Hybridisierung: Die Übertragung von Nukleinsäuren aus Bakteriophagen auf Nylonmembranen erfolgte wie für die Kolonie-Hybridisierung beschrieben und erlaubte die Identifikation von Phagen, welche die gesuchte Sequenz tragen. Das Plaque-Lifting erfolgte nach der Vorschrift der Hybridisierung von DNA mit Digoxigenin-markierten Sonden.

PCR-Methodik: Zum schnellen Durchsuchen von Phagen-Banken nach der Existenz eines Phagen mit gesuchter Sequenz wurde die PCR-Methodik angewandt. Hierzu wurden PCR-Reaktionen wie in 2.1.3. angegeben angesetzt. Die Denaturierung im ersten Zyklus reichte aus, um die Phagen-DNA der Taq-Polymerase zugänglich zu machen. Als Matritze diente die Phagen-Bibliothek mit hohem Titer. Die detaillierte Strategie für den PCR-Screen der Phagen-Bibliothek nach *TOM6* und *TOM7* ist in Abschnitt 3.1.1. beschrieben.

2.1.9. Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA wurde die CaCl₂-Methode angewandt.

Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8 kultiviert.

Dann wurde die Kultur 10 min auf Eis gekühlt, anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000xg) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 3000xg). Die sedimentierten Zellen wurden in 8 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, mit 2 ml 75 % Glycerol (v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von je 250 µl bei -70°C.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit der DNA vermischt (1 µg Plasmid-DNA) und für 30 min bei 0°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für kurze Zeit (2 min) auf 42°C erwärmt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen für 30 - 60 min bei 37°C unter Schütteln in LB-Medium inkubiert und durch Zentrifugation reisoliert. Die Zellen wurden in 100 µl Medium resuspendiert, auf eine LB-Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Analyse der erhaltenen Klone wurde die Plasmid-DNA isoliert und über Restriktionsverdau charakterisiert.

2.1.10. Klonierungsstrategien

Kloniert wurden Konstrukte für die Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*. Diese Konstrukte bestanden aus Derivaten des Plasmids pGEM4, welche die betreffende cDNA unter der Kontrolle des SP6-Promoters enthielten.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde die cDNA durch PCR amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (siehe 2.1.4.) enthielten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, mit denen die PCR-Produkte sowie der Vector pGEM4 verdaut wurden. Es folgte die Ligation des PCR-Produkts mit dem Plasmid. Die ligierten Plasmide wurden in den *E.coli*-Stamm XL-Blue transformiert.

Für die Klonierung der Fusionsprodukte mit DHFR wurde zunächst die cDNA der DHFR in das Plasmid kloniert, anschließend wurde die jeweilige cDNA in das DHFR enthaltende Plasmid kloniert.

2.1.11. λ -Zap Phagen

In dieser Arbeit wurde der Bacteriophage *lambda* (λ)-Zap2 verwendet. Dieser Phage ist in der Lage, DNA-Fragmente in der Größe von einem bis zehn kb Länge als Insert aufzunehmen. Ein Teil des Phagengenoms beinhaltet die DNA-Sequenz des Plasmids pBluescript SK⁻, in dessen multiple cloning site die Inserts eingebaut werden. Es ist demnach ein aus dem Plasmid Bluescript SK⁻ und dem Bacteriophagen λ zusammengesetztes Vectorsystem. Somit weist der Phage sowohl die Vorteile der Phagen, als auch der Plasmid-Vectoren auf. Mit Hilfe des Helferphagen ist es möglich, den Bacteriophagen in das Plasmid Bluescript SK⁻ umzuwandeln.

λ -Zap2 ist in der Lage, das Bakterium *E.coli* XL-Blue zu infizieren. Er verwendet dessen Proteinsyntheseapparat zum Aufbau eigener Proteine, vermehrt sich auf diese Weise, lysiert das Bakterium und kann so umliegende Bakterien neu infizieren. Hierdurch kommt es beim Phagen λ -Zap2 bei dessen Vermehrung auf einem Bakterienrasen zu einer typischen Plauebildung, wobei jeder Plaue ursprünglich auf einen Plaue zurückzuführen ist.

Die in dieser Arbeit benutzte cDNA-Phagenbibliothek wurde von Prof. Frank Nargang (Edmonton, Kanada) hergestellt unter Verwendung des Uni-Zap-XR-Systems (Stratagene) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.11.1. Infektion, Anzucht und Ausplattierung und Reinigung von λ -Phagen

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten nach einem Standardprotokoll aus Sambrock et al. (1989). Es wurde eine einzelne Kolonie des *E.coli*-Stammes XL-Blue in 100 ml LB-Medium inkubiert, dem zuvor 0,2 % Maltose und 10 mg/l Tetracyclin zugesetzt worden waren, und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Maltose erhöht die Aufnahmefähigkeit der Bakterien gegenüber Phagen.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3000xg geerntet, in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 2,0 verdünnt. Zum Durchmustern der cDNA-Bibliothek wurden 90 μ l dieser Bakteriensuspension mit 10 μ l Phagen aus der λ -Zap2-Bibliothek vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phagen/Zellsuspension mit 3 ml auf 50°C erwärmten Top-Agar (1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Agar, 0,7 % Agarose) vermengt und das Gemisch auf eine 37°C

2. MATERIAL UND METHODEN

warme NZY-Agarplatte (1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt) mit 10 mg/l Tetracyclin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgreicher Infektion der Bakterien mit Phagen waren deutlich die entstandenen Plaques auf der Bakterienkultur zu erkennen.

Die Identifizierung der Phagen erfolgte durch Übertragung der Phagen-DNA auf Nylonmembranen und anschließende Hybridisierung.

Die identifizierten Phagen wurden aus dem Agar ausgeschnitten und in 100 µl SM-Puffer (100 mM NaCl, 2 % MgSO₄, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,0025 % Gelatine) resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C gelagert, um die Phagen in die Lösung diffundieren zu lassen.

Da der Abstand zwischen den Plaques im ersten Screen sehr gering war, wurden die im ersten Schritt isolierten Phagen weiter aufgereinigt, indem abermals Bakterien mit der im ersten Schritt gewonnenen Phagensuspension infiziert wurden. So konnte sichergestellt werden, daß Einzelphagen isoliert worden waren.

2.1.11.2. Umwandlung von Phagen in BluescriptSK

Für die Umwandlung der isolierten Phagen in BluescriptSK-Vektoren wurden 100 µl Phagensuspension mit 200 µl einer Bakteriensuspension von *E.coli* XL-Blue mit einer OD₆₀₀ von 1,0 gemischt und mit 1 µl einer Suspension von Helferphagen R 408 (Stratagene) vermischt, anschließend folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Nach der Überführung des Infektionsansatzes in 5 ml zweifach konzentriertes LB-Medium setzten Synthese und Freisetzung von Einzelstrangphagen innerhalb von 4 bis 6 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln ein. Die Einzelstrangphagen wurden nach Abtöten der Bakterien durch Inkubation bei 70°C für 20 min gewonnen, indem 1,5 ml des Infektionsansatzes entnommen und 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert wurden, um die Bakterien von den Phagen abzutrennen. Verschiedene Verdünnungen des Einzelstrangphagen enthaltenden Überstandes wurden zur Infektion von je 200 µl einer Bakteriensuspension XL Blue mit einer OD₆₀₀ von 1,0 in 3 ml LB-Medium mit Tetracyclin (10 mg/l) eingesetzt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurden die mit Einzelstrang-Phagen infizierten Bakterien auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, die entstandenen XL Blue-Kolonien enthielten nach dieser

Behandlung das aus dem Phagen herausgelöste Plasmid pBluescript SK einschließlich des eingebauten Inserts.

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus *Neurospora crassa*

Zellextrakte aus Hyphen von *Neurospora crassa* wurden durch einminütiges Zerreiben des Myzels in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff gewonnen. Nach Verdunsten des Stickstoffs wurde pro Gramm Myzel 1 ml SEM Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2, 1 mM EDTA) mit 1 mM PMSF und 1 % SDS hinzugegeben. Das Extrakt wurde durch Zentrifugation (5 min, 4000xg, 4°C) von unlöslichen Bestandteilen befreit und durch SDS-PAGE sowie Immundekoration analysiert.

2.2.2. Isolation von Mitochondrien aus *Neurospora crassa*

Zur Präparation kleinerer Mengen von Mitochondrien wurden 20 g Hyphen (aus einer 2 l-Kultur) mit 20 g Seesand und 20 ml SEM (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) mit 1 mM PMSF ca. 1 min in einem Mörser zerrieben. Nach Zugabe weiterer 20 ml SEM mit 1 mM PMSF wurden die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation aus dem Homogenisat abgetrennt. In den ersten beiden Zentrifugationsschritten (je 5 min, 3000xg, 4°C) blieben sie im Überstand und sedimentierten im dritten Durchgang (12 min, 17000xg, 4°C). Die Mitochondrien wurden in 20 ml SEM resuspendiert und erneut sedimentiert (12 min, 17000xg, 4°C), in 1 ml SEM aufgenommen und sofort für Import- und sonstige Experimente eingesetzt. Die Ausbeute betrug etwa 0,3 mg mitochondriales Protein pro Gramm Hyphen (Feuchtgewicht).

Die Gewinnung größerer Mengen an Mitochondrien, wie sie für die Präparation der Außenmembran nötig sind, folgte dem gleichen Protokoll, die Hyphen wurden jedoch nicht von Hand, sondern in einer Zelmühle (Sebald et al., 1979) aufgebrochen. 1000-2000 g Hyphen (aus einer 100 l-Kultur) wurden in 3 l SEM mit 1 mM PMSF aufgenommen, mit 1500-3000 g Quarzsand versetzt und dreimal 10 sec. gemischt (Waring Blendor). Der erhaltene Brei wurde 1-2 mal durch eine Zelmühle geschleust. Aus dem Zellhomogenisat wurden die Mitochondrien (ca. 5-10 mg/g Hyphen) durch Zentrifugation abgetrennt wie oben beschrieben.

2.2.3. Isolierung von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte im wesentlichen wie von Daum et al., 1982 beschrieben. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter beschrieben bis zu einer OD_{578} von 1,0 bis 1,5. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1600xg) geerntet und mit H_2O gewaschen. Das Sediment wurde gewogen und in 2 ml/g 100 mM Tris/ SO_4 pH 9,4, 10 mM DTT resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, abermals zentrifugiert und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP_i pH 7,4 gewaschen.

Um die Zellen in Sphäroplasten umzuwandeln, wurden sie in 7 ml/g 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP_i , pH 7,4 mit 2 mg/g Zymolyase resuspendiert und für 30-45 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz der Zymolyase-Behandlung wurde überprüft, indem 25 μ l Zellsuspension in 1 ml H_2O gegeben und kurz geschüttelt wurden; die Zymolyase-Behandlung war ausreichend, wenn die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (15 min, 1600xg) gesammelt und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP_i , pH 7,4 gewaschen. Um die Sphäroplasten aufzubrechen, wurden diese in 5 ml/g 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 1 mM PMSF resuspendiert und mit 15 Stößen in einem Glas-Glas Dounce- Homogenisator (B.Braun Biotech, Passform S) geöffnet. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (2000xg, 5 min) und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12 min, 17000xg) gesammelt, vorsichtig in 2 ml/g 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 resuspendiert, nochmals sedimentiert (12 min, 17000xg) und in 0,25-1 ml 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 aufgenommen.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Mitochondrien wurden mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 20 μ l-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4. Subfraktionierung von Mitochondrien

2.2.4.1. Isolierung der mitochondrialen Membranfraktion durch Carbonatextraktion

Durch Carbonatextraktion (Fujiki et al., 1982) können lösliche und peripher assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen zu trennen. Dazu wurden die Proben reisoliert,

in SEM resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 0,2 M Natriumcarbonat verdünnt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die Proben erneut zentrifugiert (30 min, 225000xg, 4°C). Die Überstände wurden mit TCA gefällt, während die Sedimente direkt in Probenpuffer resuspendiert werden konnten.

2.2.4.2. Isolierung der mitochondrialen Außenmembran

Isolierte Mitochondrien von *Neurospora crassa* (aus 1001 Kultur) wurden bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml in 250 mM Saccharose, 2,5 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 1 mM PMSF aufgenommen und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Mitochondriensuspension mit 10 Volumen eines eiskalten hypotonen Schwellpuffers (5 mM KP_i , pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) verdünnt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Mitochondrienmembranen wurden durch Zentrifugation (45 min, 17700xg, 4°C) reisoliert und erneut in Schwellpuffer resuspendiert. In einem automatischen Glass-Teflon-Homogenisator wurden während 40 min bei 0°C Teile der Außenmembran von den Mitoplasten abgeschert. Jeweils 20 ml Homogenat wurden auf einen Stufengradienten aufgetragen (10 ml 0,9 M Saccharose und 9 ml 0,25 M Saccharose in 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2 und 1 mM PMSF (OMP)) und in einem Beckman SW28 Rotor zentrifugiert (1 h, 14100xg, 4°C).

Während intakte Mitochondrien, Mitoplasten und Bruchstücke der Innenmembran sedimentierten, sammelte sich die mitochondriale Außenmembran zusammen mit der sogenannten "intermediate density fraction" (IDF), einer Mischung aus Außen- und Innenmembran, an der Grenzschicht zwischen 0,25 M und 0,9 M Saccharose an. Diese Schicht wurde mit einer Pipette abgesaugt und durch Zugabe von 2 M Saccharose auf 0,9 M Saccharose eingestellt. Jeweils 15 ml der Probe wurden mit 20 ml 0,72 M Saccharose in OMP und mit 3 ml OMP (ohne Saccharose) überschichtet, es folgte eine Flotation der Außenmembran (10 h, 141000xg, 4°C, SW 28-Rotor) durch den Saccharosegradienten. Aufgrund ihrer geringen Dichte sammelt sich die Außenmembran in diesem Schritt an der Grenzschicht zwischen 0,72 M Saccharose und EMP ohne Saccharose an. Dagegen haben Verunreinigungen wie die IDF oder das Endoplasmatische Retikulum eine höhere Dichte und bleiben in der Schicht zwischen 0,72 M und 0,9 M Saccharose zurück.

Die Außenmembran wurde wiederum mit einer Pipette aus dem Gradienten entnommen und mit 50 mM Kaliumacetat-Puffer, pH 7,0 im Verhältnis 1:2 verdünnt. Durch eine anschließende Zentrifugation (1 h, 257000xg, 4°C) wurden die Außenmembranvesikel sedimentiert und in 3 bis 5 ml 50 mM Kaliumacetat, pH 7,0 resuspendiert. Die isolierten Außenmembranvesikel konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert werden, wurden jedoch zumeist frisch zur Isolation des TOM-Komplexes verwendet.

2.2.5. Isolierung der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran

2.2.5.1. Isolierung aus Außenmembranvesikeln

Die Isolierung des TOM-Komplexes aus Außenmembranvesikeln erfolgte in wesentlichen nach der von Künkele entwickelten Methode. Dazu wurden Außenmembranvesikel von *Neurospora crassa* mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat, pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glycerin, 2,5 % Digitonin) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation (30 min, 196200xg, 4°C) im Beckman Ti50-Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde bei 60 min Ladezeit und einer Flussrate von 1 ml/min mit einer Peristaltikpumpe auf eine Säule mit NiNTA-Agarose (1 ml/10 mg Außenmembranvesikel), die vorher mit Solubilisierungspuffer äquilibriert worden war geladen. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Solubilisierungspuffer und anschließend mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Kaliumacetat, pH 7,0, 10 mM MOPS, 20% Glycerin, 0,5 % Digitonin) gewaschen. Die Entfernung unspezifisch an die Säule gebundenen Materials erfolgte durch einen Konzentrationsgradienten von 0 mM bis 60 mM Imidazol mit 10 Säulenvolumen, gefolgt von einer Stufe mit 60 mM Imidazol mit einem Säulenvolumen. Zur Elution des spezifisch gebundenen TOM-Komplexes wurde Waschpuffer mit 300 mM Imidazol verwendet. Die Effizienz der Reinigung wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford sowie der Reinheit durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau überprüft.

2.2.5.2. Mitochondrien

Die Isolierung des TOM- Kernkomplexes aus Mitochondrien erfolgte nach einer Methode, die von Uwe Ahting optimiert wurde. Mitochondrien wurden bei einer Protein-

konzentration von 10 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat, 10 mM MOPS, pH 7,0, 20 % Glyzerin, 1 % DDM, 1 mM PMSF) resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Abtrennung ungelösten Materials wurde die Probe zentrifugiert (30 min, 257000xg, 4°C), der Überstand wurde anschließend auf eine Säule mit NiNTA-Agarose (5 ml/g Mitochondrien), die vorher mit Solubilisierungspuffer äquilibriert worden war geladen. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Solubilisierungspuffer, anschließend mit 40 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Kaliumacetat, 10 mM MOPS, pH 7,0, 20 % Glyzerin, 0,1 % DDM) gewaschen. Um unspezifisch gebundenes Protein von der Säule zu entfernen, wurde die Säule mit einem Gradienten von 10 bis 60 mM Imidazol über Säulenvolumen gewaschen. Die Elution des spezifisch gebundenen TOM-Komplexes erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von 300 mM in Waschpuffer.

2.2.7. Proteasebehandlung von Mitochondrien

2.2.7.1. Proteasevorbehandlung mit Trypsin

Zur Entfernung der cytosolischen Domänen der Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes wurden intakte Mitochondrien bzw. isolierter TOM-Komplex (0,5 mg/ml) mit 200 µg/ml Trypsin für 15 min auf Eis behandelt. Die Proteolyse wurde im Anschluss durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (STI) in einer Konzentration von 1,5 mg/ml abgestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert und in dem entsprechenden Puffer resuspendiert, bei isoliertem TOM-Komplex wurde eine Gelfiltration über eine Superose 6 (HR10/30)-Säule durchgeführt, um Trypsin und den Trypsin-Inhibitor vom TOM-Komplex abzutrennen.

2.2.7.2. Proteasenachbehandlung mit Proteinase K

Nicht importierte Vorstufenproteine wurden durch Inkubation der Importreaktionen mit 100 µg/ml Proteinase K auf Eis für 20 min verdaut. Die Protease-Behandlung wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF beendet.

2.2.8. Import in vitro synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

Für einen Standard-Import-Ansatz wurden 50 µg Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (0,25 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 0,25 M Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) gegeben und mit 2 mM ATP versetzt. Dann wurde abhängig vom Vorstufenprotein 0,2 – 10 µl in Retikulozytenlysat translatiertes Protein zugegeben und bei 25°C importiert. Im Anschluss daran wurden 400 µl SEMK-Puffer (250 mM Saccharose, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2) zum Importansatz gegeben, die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation (10 min, 10.000xg, 4°C) isoliert und in dem der weiteren Analysemethode entsprechendem Puffer resuspendiert.

2.2.8.1. Herstellung von Translokationsintermediaten mit Methotrexat

Die Ansammlung von Translokations-Intermediaten von Dihydrofolat-Reduktase-Fusionsproteinen (DHFR) erfolgte wie von Eilers und Schatz, 1986 beschrieben. Das Vorstufenprotein wurde für 15 min in Importpuffer mit 1 µM des Folsäureanalog Methotrexat (MTX) und 0,5 mM NADPH zusammen mit den Mitochondrien bzw. dem TOM-Komplex auf Eis vorinkubiert, der weitere Import bzw. die Bindung von Vorstufenproteinen erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.9. Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Zur chemischen Quervernetzung mitochondrialer Proteine wurden die verwendeten Quervernetzungsreagenzien DSG (Disuccinimidylglutarat), Sulfo-MBS (m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester) und EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)-carbodiimide) mit einer Konzentration von 8 mg/ml in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Zu jeweils 50 µg Mitochondrien in einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurden die Quervernetzungsreagenzien in einer Konzentrationen von 0,016 – 0,024 mg/ml dazugegeben, als Reaktionspuffer diente SEM (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH, 1 mM EDTA, pH 7,2). Nach einer Inkubation von 45 min bei 25°C wurde die Quervernetzungsreaktion durch Zugabe von 80 mM Glycin, pH 8,0 und Inkubation für weitere 15 min bei 25°C gestoppt, anschließend wurden die Proteine mit TCA gefällt und in Probenauftragspuffer resuspendiert.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Präparation von Proteinen

2.3.1.1. Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

***In vitro* Transkription:** Für die *in vitro* Transkription wurden aus *E. coli* gereinigte Plasmide der pGEM-Reihe verwendet, welche die kodierende Sequenz für das entsprechende Vorstufenprotein unter der Kontrolle des SP6-Promotors enthielten. Ein Transkriptionsansatz setzte sich zusammen aus: 30 µl Prämix (40 mM Hepes/KOH, pH 7,4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, je 500 µM GTP, ATP, CTP, UTP), 250 µM m⁷G(5')ppp(5')XG, 5 µg DNA, 200 U RNAsin, 10 U SP6-Polymerase und H₂O zu einem Endvolumen von 50 µl.

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde nach Zugabe von 5 µl 10 M LiCl und 150 µl Ethanol für 15 min bei -80°C gefällt. Nach Isolierung der RNA durch Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wurde die RNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O, 1 µl RNAsin resuspendiert.

***In vitro* Translation:** Ein Standard-Translationsansatz setzte sich zusammen aus: 140 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 2 µl RNAsin, 7 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 1 mM), 24 µl ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml) und 50 µl RNA. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Der Einbau radioaktiven Methionins wurde anschließend durch Zugabe von 10 mM nicht radioaktivem Methionin gestoppt. Die Saccharosekonzentration wurde auf 250 mM eingestellt, um für *in vitro*-Importreaktionen isotone Bedingungen herzustellen. Der Ansatz wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.3.1.2. Reinigung rekombinanter Proteine mit His- Anhang aus *E.coli*

Eine 500 ml *E. coli* Kultur wurde in LB-Amp bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 2 h durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 3000xg, 4°C), in 15 ml Puffer A (200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerol), der 1 mM PMSF sowie Proteaseinhibitoren „complete EDTA free“ (Roche Diagnostics) enthielt, resuspendiert. Nach Zugabe von 10 mg/ml Lysozym und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur

2. MATERIAL UND METHODEN

wurden die Zellen durch Beschallung (Makrospitze (Durchmesser 1 cm), Stufe 5, 50 % Duty Cycle, 10 Impulse von je 5 sec, durch 10 sec Intervalle unterbrochen) aufgeschlossen. Das Zell-Lysat wurde zentrifugiert (15 min, 17500xg, 4°C), und das rekombinante Protein im Überstand wurde anschließend auf eine 3 ml-Säule mit NiNTA-Agarose, die vorher mit 3 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert worden war geladen. Um ungebundenes Material von der Säule zu entfernen, wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer A gewaschen, die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten über 15 ml von 0 bis 60 % Puffer B (200 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerol).

2.3.1.3. Reinigung von Proteinen mit GST-Anhang aus *E.coli*

Für die Expression von Proteinen mit GST-Anhang wurden *E.coli* des Stammes BL21 verwendet, die das Plasmid pETGEXCT (Sharrocks, 1994) enthielten, in das die cDNA des entsprechenden Proteins kloniert wurde. Eine 500 ml *E. coli* Kultur wurde in LB-Amp mit Chloramphenicol (34µg/ml) bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 3 h durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 3000xg, 4°C), in 15 ml Puffer A (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM Natriumphosphat, 1,9 mM Kaliumphosphat, pH 7,4), der 1 mM PMSF sowie Proteaseinhibitoren „complete EDTA free“ (Roche Diagnostics) enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden durch Beschallung (Makrospitze (Durchmesser 1 cm), Stufe 5, 50 % Duty Cycle, 10 Impulse von je 5 sec, durch 10 sec Intervalle unterbrochen) aufgeschlossen. Das Zell-Lysat wurde zentrifugiert (15 min, 17500xg, 4°C), und das rekombinante Protein im Überstand wurde anschließend auf eine 5 ml-Säule mit Glutathionsepharose, die vorher mit 3 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert worden war geladen. Um ungebundenes Material von der Säule zu entfernen, wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer A gewaschen, die Elution erfolgte durch mit 3 Säulenvolumen Puffer B (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM Natriumphosphat, 1,9 mM Kaliumphosphat, 100 mM Glutathion, pH 7,4).

2.3.2. Etikettierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.3.2.1. Cystein- spezifische Etikettierung von Proteinen mit TAMRA-5-Maleimid

Proteine wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamine (TAMRA) markiert. Zur Anwendung kam TAMRA-5-maleimid, wodurch spezifisch Cysteine modifiziert wurden. Zunächst wurde der pH-Wert der Proteinlösung durch langsames Zugabe von HCl auf 6,5 - 7,0 eingestellt, um zu verhindern, daß auch Lysinreste und damit der Bereich der Präsequenz des Vorstufenproteins modifiziert wird. Anschließend erfolgte die Reduktion der Sulfidgruppen durch Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an TCEP und anschließender Inkubation für 2 Stunden auf Eis. Danach wurde das Protein pSu9-DHFR durch Zugabe von NADPH (0,5 mM) und Methotrexat (1 μ M) und anschließender Inkubation für 15 min auf Eis in den gefalteten Zustand überführt. Zum Etikettieren des Proteins wurde TAMRA-5-maleimid (20 mM, in DMSO gelöst) in vierfachem Überschuss zur Proteinlösung gegeben und für 12 - 14 Stunden auf Eis inkubiert.

Um den ungebundenen Fluoreszenzfarbstoff abzutrennen, wurde das Protein in zwei Schritten durch Gelfiltration unter Verwendung von PD10-Säulen (Elutionspuffer: 200 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerol) entsalzt. Das zweimalige Entsalzen der Probe war notwendig, um das markierte Protein effizient von ungebundenem Farbstoff zu trennen.

Das markierte Protein wurde aliquotiert und konnte ca. 2-3 Monate bei -70°C gelagert werden.

2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.3.3.1. Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem von Bradford, 1976 beschriebenen Verfahren unter Verwendung des "BioRad-Proteinassay". Das Verfahren basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Proben wurden mit einer 1:5-Verdünnung des Farbstoffkonzentrates gemischt. Nach einer Inkubation für 5-10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter IgG-Konzentration.

2.3.3.2. Bestimmung nach der Biuret-Methode

Bei der Biuret-Methode handelt es sich um eine allgemeine Nachweisreaktion für Säureamid (z.B. Proteine und deren Abbaustufen, Diamide, synthetische Polypeptide, Histidin, Urobilin, Porphobilinogen). Der durch KOH alkalisch gemachten Probenlösung wird eine wässrige Lösung von kristallinem Kupfersulfat mit Kaliumnatriumtartrat und Ätznatron zugesetzt, die mit den genannten Substanzen eine komplexe Kupferverbindung bildet, aus der bei Anwesenheit von Albuminen eine blauviolette, bei Peptonen eine rosarote Verfärbung der wässrigen Probe resultiert. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Pierce ("BCA Protein Assay Kit"), wobei die Proben 30 min bei 60°C zusammen mit den Reagenzien inkubiert wurden. Die Absorption wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Durch Vergleich der Absorption mit einer aus bekannten IgG-Konzentrationen erstellten Eichgeraden ergibt sich die zu ermittelnde Proteinkonzentration.

2.3.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine aus wässrigen Lösungen wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen 72 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Proben für 30 min bei 30000xg abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen, 10 min bei 56°C getrocknet und in dem gewünschten Puffer resuspendiert. Bei größeren Proteinmengen wurde mit einer Aceton-Wasser-Mischung (9:1) gewaschen, um eine Dehydrierung des Proteinniederschlags zu vermeiden. Auf diese Weise wurde die anschließende Solubilisierung in Laemmli-Probenpuffer deutlich erleichtert .

2.3.5. Trennung von Proteinen durch Elektrophorese

2.3.5.1. Standard-SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 aufgetrennt. Sammel-, Trenn- und Bodengel hatten eine Größe von jeweils 10 x 150 x 8 bzw. 90 x 150 x 8 bzw. 5 x 150 x 8 mm.

Die Gel-Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

- Sammelgel: 5 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,1 % TEMED;
- Trenngel: 12-16 % Acrylamid, 0,075-0,1 % Bisacrylamid, 385 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,035 % TEMED;
- Bodengel: 20 % Acrylamid, 0,4 % Bisacrylamid, 385 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,035 % TEMED

Die Proben wurden in 1xProbenpuffer (2 % SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8) gelöst und vor dem Auftrag für 3 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstant 30 mA; der Laufpuffer enthielt 10 g/l SDS, 144 g/l Glycin, 30 g/l Tris. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose übertragen (siehe 2.3.7.) oder mit Coomassie angefärbt.

2.3.5.2. High-Tris-Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung auch kleinerer Proteine (ab 2 kDa) wurde ein Polyacrylamidgel mit höherem Vernetzungsgrad, Harnstoff im Gelpuffer sowie ein veränderter Laufpuffer verwendet. Das Trenngel hatte eine Zusammensetzung von 19 % Acrylamid, 0,25 % Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,75 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS und 0,25 % TEMED. Das Sammelgel setzte sich aus 5 % Acrylamid, 0,07 % Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,5 % APS und 0,25 % TEMED zusammen. Der Laufpuffer bestand aus 200 mM Glycin, 50 mM Tris und 0,1 % SDS, pH 8,0, Wert ergibt sich aus den Komponenten). Die Gele liefen bei 25 mA für 10-12 Stunden.

2.3.5.3. Blaue Nativgelelektrophorese

Die blaue Nativgelelektrophorese dient der Analyse von Proteinkomplexen. Dabei werden Membranproteinkomplexe zunächst in einem geeigneten Detergens solubilisiert. Durch

2. MATERIAL UND METHODEN

Zugabe des Farbstoffs Serva Blau G-250 wird eine negative Nettoladung in die Proteinkomplexe eingeführt, die eine Auftrennung im elektrischen Feld erlaubt.

Sammel-, Trenn- und Bodengel hatten eine Größe von jeweils 10 x 150 x 8 bzw. 90 x 150 x 8 bzw. 5 x 150 x 8 mm und hatten folgende Zusammensetzung:

- Bodengel: 20 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0, 0,05 % APS, 0,025 % TEMED
- Trenngel: linearer Gradient von 6-13 % Acrylamid, 0,36-0,8 % Bisacrylamid, und 0-16 % Glycerin, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0, 0,04 % APS, 0,04 % TEMED.
- Sammelgel: 3,8 % Acrylamid, 0,12 % Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris, pH 7,0, 0,08 % APS, 0,08 % TEMED

Mitochondrien bzw. Außenmembranvesikel (50 µg pro Gelspur) wurden in 40 µl Puffer N (1 % Digitonin, 0,1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) für 30 min bei 4°C lysiert, nicht solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation (20 min, 30000xg, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 4 µl Probenpuffer (5 % Serva Blau G-250, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 100 mM Bistris, pH 7,1) versetzt und auf das Nativgel aufgetragen. Der Kathodenpuffer A bestand aus 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, pH 7,0, 0,02 % Serva Blau G-250. Der Kathodenpuffer B hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings ohne Farbstoff. 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0 diente als Anodenpuffer. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt, sie wurde zuerst bei 100 V gestartet und nach dem Einlaufen der Proben in das Gel bei 500 V fortgesetzt. Die Stromstärke war dabei auf 15 mA limitiert. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine auf PVDF-Membran transferiert. Folgende Markerproteine dienten als Längenstandard: Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (150 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa).

2.3.6. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.3.6.1. Silberfärbung

Zur Detektion schwacher Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese einer Silberfärbung unterzogen. Dazu wurde das Gel zu Beginn in einer Lösung aus 12 % TCA

und 40 % Methanol 30 min lang fixiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure für weitere 30 min. Zur Reduktion der im Gel enthaltenen Proteine wurde das Gel danach für 20 min in einer frisch angesetzten Lösung aus 4 mM Natriumthiosulfat und 0,13 % Glutaraldehyd inkubiert, anschließend wurde es 5x für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Das eigentliche Färbereagenz wurde durch langsames Eintropfen einer 1,2 M Silbernitratlösung in eine Lösung aus 21 ml 0,1 M NaOH mit 1,6 % (w/v) Ammoniak hergestellt. Nach Zugabe von etwa 4 ml wird die Braunfärbung des eingetropften Silbernitrats durch die vorgelegte Lösung nicht mehr vollständig neutralisiert. Kurz vor Erreichen dieses Umschlagpunktes ist die Zubereitung der Färbelösung abgeschlossen. Ein leichter Überschuss an Silbernitrat führt zu einem braunen Niederschlag elementaren Silbers, welcher durch nachträgliche Zugabe von weniger als 1 µl einer 20 %igen Ammoniaklösung wieder in Lösung gebracht werden kann. Die Färbelösung wird mit destilliertem Wasser auf 40 bis 100 ml aufgefüllt (je nach Größe des Gels) und das Gel für 15 min darin geschwenkt. Die Lösung wird anschließend in einen Sammelbehälter abgegossen und das Gel erneut 5x für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgt bei gedämpftem Licht durch Zugabe einer Lösung aus 2,5 mM Zitronensäure und 0,02 % Formaldehyd. Die Reaktion wird vor Erreichen der gewünschten Färbeintensität durch Wässern des Gels (2-3 Stunden) mit destilliertem Wasser abgebrochen. Während des Wässerns dunkelt das Gel noch nach. Anschließend wird das Gel zwischen wasserdurchlässiger Einmachfolie in einem Spannrahmen getrocknet.

2.3.6.2. Färbung mit Coomassie-Blau

Die zu färbenden Gele wurden in eine Färbelösung aus 40 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0,1 % (w/v) Coomassie Blau G-250 eingelegt. Die Färbedauer betrug je nach Frische der Lösung zwischen 10 und 30 min. Anschließend wurden die Gele in einer Entfärbelösung aus 40 % Methanol und 10 % Essigsäure partiell entfärbt, bis ein optimaler Kontrast zwischen den anzufärbenden Proteinbanden und dem Gelhintergrund erreicht war.

2.3.7. Transfer von Proteinen auf Membranen

Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden nach der von Towbin et al., 1979 und Kyhse Andersen, 1984 beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF- Membran (Porengröße: jeweils 0,2 µm) übertragen (Towbin et al., 1979, Kyhse Andersen, 1984). Die Membran und das Gel wurden zwischen mehrere mit Blotpuffer (20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und zwischen zwei Graphitelektroden geklemmt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 1 mA/cm². Anschließend wurden die Proteine durch Behandlung mit Ponceau S (0,2 % (w/v) in 3 % (w/v) TCA) angefärbt.

Die Besonderheit beim Blotten auf PVDF- Membranen bestand darin, daß die Membran zuerst mit Methanol benetzt und anschließend mit Blotpuffer äquilibriert wurde.

2.3.8. Autoradiographie und Laserdensitometrie

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurde das entfärbte Gel unter Vakuum bei 80°C getrocknet, Nitrocellulose- bzw. PVDF- Membranen wurden unter Rotlicht getrocknet. Nach Exposition auf Röntgenfilm (Kodak XR5, Kodak BioMax MR, Fuji New RX) wurden die Signale mit einem Densitometer quantifiziert.

2.3.8. Gelfiltration

Die Gelfiltration diente der Analyse von Proteinkomplexen bzw. der Abtrennung niedermolekularer Proteine von Proteinkomplexen.

Vor der Gelfiltration wurde unlösliches Material durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 30000xg). Der Überstand wurde auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen (25 ml Säulenvolumen, Amersham Pharmacia Biotech), die vorher mit Gelfiltrationspuffer (50 mM Kaliumacetat, pH 7,0, 20 % Glycerol, 0,5 % Digitonin) äquilibriert worden war. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 0,25 ml/min; die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml. Der Verlauf der Elution wurde mit einem UV-Monitor verfolgt, je 100 µl der gesammelten Fraktionen wurden mit TCA präzipitiert sowie durch SDS-PAGE und nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose mittels Immundekoration analysiert. Die

Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte mit den extern zugesetzten Markerproteinen Thyreoglobulin (669 kDa, 13,7 ml), Apoferritin (443 kDa, 14,5 ml), α -Amylase (200 kDa, 15,7 ml) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa, 16,5 ml).

2.4. Biophysikalische Methoden

2.4.1. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Oberflächenresonanzspektroskopie ist eine Methode zur direkten Analyse der Interaktion von auf einer Matrix immobilisierten Molekülen und Molekülen, die sich in einer daran angrenzenden der beweglichen Phase befinden (zur Übersicht: (Szabo, 1995, Fivash, 1998). Sie beruht auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz, die entsteht, wenn polarisiertes Licht, aus einer Phase mit niedrigem refraktorischem Index kommend in einem Winkel α (α größer als der für das Phänomen kritische Winkel) auf eine Phase mit höherem refraktorischem Index auftrifft und von dieser reflektiert wird. Durch die Oberflächenplasmonresonanz wird die Intensität des reflektierten Lichts in einer spezifischen Kombination von Wellenlänge und Winkel reduziert. Durch biomolekulare Bindungsereignisse ändert sich der refraktorische Index an der Phasengrenze, was eine Änderung des Signals der Oberflächenplasmonresonanz zur Folge hat. Die Änderung der Oberflächenplasmonresonanz, die durch Anreicherung eines Proteins an der Phasengrenze verursacht wird, ist proportional zur Masse und der Konzentration dieses Proteins an der Phasengrenze. Daher ist es möglich, mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie die Interaktion von Proteinen quantitativ zu analysieren.

Für die Untersuchung der Bindung an den TOM-Komplex wurden pSu9(1-69)-DHFR-GST bzw. DHFR-GST verwendet. Die Messungen wurden mit dem Oberflächenplasmonresonanzspektrometer BIAcore 2000 unter Verwendung des Sensorchips CM5 durchgeführt.

Zunächst wurden monoklonale Antikörper gegen DHFR durch chemische Quervernetzung auf dem Chip immobilisiert. Dazu wurde der Antikörper in Bindungspuffer (0,25 % Digitonin, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM MOPS, pH 7,0) verdünnt und mit einer Flußrate von 5 μ l/min über den Chip geleitet, bis ca. 10000 RU (Resonanzeinheiten) am Chip gebunden waren. Durch Injektion von 75 μ l eines Quervernetzergemischs (0,05 M N-Hydroxysuccinimide, 0,2 M 1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)-carbodiimide) wurde der Antikörper kovalent an die Chipmatrix gebunden. Im Anschluß daran wurden ca. 2,5 nM pSu9-DHFR-GST bzw. DHFR-GST mit einer Flußrate von 5 μ l/min über den Chip

geleitet und an den Antikörper gebunden. Um die Interaktion zwischen dem Präprotein und den TOM-Komplex zu untersuchen, wurde der TOM-Komplex mit einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Chip geleitet und die Bindung an der Chip analysiert.

2.4.2. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

(Ehrenberg, 1974, Elson, 1974)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist eine Mikroskopgestützte Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung von Molekülen.

Sie basiert auf der statistischen Analyse der Diffusion von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Molekülen, die über deren Fluoreszenz gemessen wird.

Durch einen mikroskopisch kleinen Laserfokus wird ein ca. 1 fl großes Volumen mit Licht einer Wellenlänge λ_1 beleuchtet. Solange sich Moleküle innerhalb dieses Volumens befinden, emittieren sie Licht mit der Wellenlänge λ_2 . Die zeitabhängige Messung und statistische Auswertung der Emission erlaubt es, die Dauer des Aufenthalts eines Moleküls im beleuchteten Volumen und damit die Diffusionsgeschwindigkeit zu bestimmen.

In Abhängigkeit davon, ob ein markiertes Molekül mit einem anderen, unmarkierten Molekül interagiert, diffundiert es aufgrund der unterschiedlichen Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das beleuchtete Volumen. Durch Bestimmung der Diffusionszeit der Moleküle, die frei bzw. in gebundener Form durch das Volumen diffundieren, ist es möglich, die Interaktion der Moleküle miteinander zu untersuchen.

Für die Untersuchung der Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA-5-Maleimid markiertes pSu9-DHFR bzw. DHFR verwendet und mit nicht markiertem TOM-Komplex inkubiert.

Die FCS-Messungen wurden mit einem ConfoCor Fluoreszenzkorrelationsspektrometer (Carl Zeiss Jena, Jena und Evotec Systems, Hamburg) durchgeführt. In dieser Konfiguration wird Laserlicht eines Ar/Ne-Lasers durch einen 543 nm-Filter geleitet und durch ein Zeiss C-Apochromatobjektiv (40x1,2 W korr.) in die Probenlösung focussiert. Die emittierte Fluoreszenz wurde durch das selbe Objektiv gesammelt, die Laserstreuung wurde durch einen dichroitischen Farbteiler umgelenkt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Avalanche Photodiode detektiert und durch eine 288-Kanal Hardware PC-Karte prozessiert. Die experimentellen Autokorrelationskurven wurden anschließend unter Verwendung des FCSplus 1.0-Softwarepakets (Evotec Biosystems) durch theoretische Autokorrelationsfunktionen gefittet, somit konnten die Diffusionszeiten des freien und

gebundenen fluoreszierenden Vorstufenproteins bestimmt werden. Um die Dimensionen des beleuchteten Volumens zu bestimmen, wurde eine Messung mit einem Molekül mit bekanntem Diffusionskoeffizienten (Rhodamine 6G) durchgeführt. Die Messungen wurden in typischen Probenvolumen von 40 µl in einer Mikrotiterplatte mit 384 Kammern durchgeführt, die Diffusionszeiten individueller fluoreszierender Moleküle wurden aus den zeitabhängigen Fluktuationen des fluoreszierenden Signals in einem confocalen Volumenelement errechnet. Die Konzentrationen des TOM-Komplexes betragen 1-300 nM, die Konzentration an markiertem Präprotein variierte zwischen 5 und 20 nM. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in Importpuffer (20 mM KCl, 0,25 % BSA, 0,5 % Digitonin, 5 % Glycerol, 10 mM MOPS, pH 7,0) durchgeführt.

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Tom6 und Tom7

Um einen Antikörper gegen Tom6 und Tom7 zu gewinnen, wurden folgende Peptide ausgewählt, die den aminoterminalen 12 Aminosäuren von Tom6 und Tom7 entspricht:

Tom6: Pro-Ser –Ala-Lys-Tyr-Ile-Glu-Arg-Pro-Gly-Gly-Ser-Cys

Tom7: Met-Phe-Ala-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp-Lys-glu-Arg-Ile-Cys

Das Peptid wurde über das zu diesem Zweck eingeführte carboxyterminale Cystein kovalent an das Maleimid-aktivierte Trägerprotein Hämocyanin (Imject, Pearce) gekoppelt. Hierzu wurden die Peptide (2 mg/200 µl) in 900 mM NaCl, 0,1 M EDTA, 0,02 % Natriumazid, 83 mM NaP_i, pH 7,2 gelöst und mit Maleimid-aktiviertem Hämocyanin (2 mg/200 µl) vermischt. Das Gemisch wurde 2 h bei 25°C inkubiert und das Konjugat anschließend mit Hilfe einer 5 ml-Gelfiltrationssäule (Pierce, Imject) entsalzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

200 µg an das Trägerprotein gekoppeltes Peptid, das in 200 µl 900 mM NaCl, 83 mM NaP_i, pH 7,2 gelöst war, wurden mit 200 µl Immunstimulans (Titermax bzw. bei Folgeinjektionen Freund's inkomplettes Adjuvans) versetzt. Die Lösungen wurden so lange gevortext, bis sich eine Emulsion bildete, die dann subcutan an mehreren Stellen in ein Kaninchen injiziert wurde. Nach 8-10 Tagen wurden aus der Ohrvene 30-40 ml Blut entnommen, das nach ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur vollständig geronnen war. Durch

zwei Zentrifugationen (3000xg, 5 min, 2°C und 27000xg, 15 min, 2°C) wurde das Serum gewonnen. Anschließend wurde das Komplementsystem durch Erhitzen für 30 min auf 56°C inaktiviert. Das Antiserum wurde aliquotiert bei -20°C gelagert. Zwischen den aufeinanderliegenden Immunisierungen lagen 4-6 Wochen.

Die Antiseren gegen Tom6 und Tom7 erkennen auf Western-Blots von isolierten Mitochondrien, Außenmembranvesikeln und isoliertem TOM-Komplex jeweils eine einzelne Bande von ca. 6-8 kDa.

2.5.2. Präparation gereinigter Immunoglobuline (IgG)

Die Isolierung der IgGs aus Antiseren erfolgte durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein-A-Sepharose. Jeweils 5 ml Antiserum wurden mit jeweils 10 ml 100 mM KPi, pH 8,5 (Auftragspuffer) verdünnt und mit einem Sterilfilter (0,2 µm) filtriert. Das Antiserum wurde auf eine 1 ml-Protein-A-Sepharose Säule (HiTrap, Amersham Pharmacia Biotech), die zuvor mit 20 Säulenvolumen Auftragspuffer äquilibriert worden war aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen Auftragspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte mit 100 mM Natriumcitratpuffer, pH 4,0, es wurden 1 ml-Fractionen in Eppendorfgefäßen gesammelt, in die jeweils 100 µl 1M Tris-HCl, pH 8,0 vorgelegt waren, um eine sofortige Neutralisation des sauren Antikörpereluats zu erreichen.

Die erhaltenen IgGs wurden gegen Wasser (bidest.) dialysiert und durch Gefriertrocknung konzentriert. Die IgGs wurden abschließend in einer Endkonzentration von 10 bis 50 mg/ml in Wasser resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.3. Immunologischer Nachweis von auf Nitrocellulose bzw. PVDF- Membranen immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran übertragenen Proteinen erfolgte durch Immundekoration.

Zunächst wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran für 45 min mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (9 g/l NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für 1 h mit spezifischen Antiseren, die 1:200 bis 1:2000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran je 15 min mit TBS, TBS mit 0,05 % (v/v) Triton X-100 und erneut mit TBS gewaschen. Der Nachweis des

gebundenen Antikörpers erfolgte durch Inkubation für 1 h mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase, das 1:10.000 in Milchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran wie beschrieben gewaschen und mit Luminol-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech) benetzt.

Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion konnten die Banden auf einem Röntgenfilm (Fuji New RX) detektiert werden.

Für den Nachweis von Tom7 mit dem spezifischen Tom7-Peptidantikörper wurde ein abgewandeltes Protokoll der Immundetektion verwendet: anstelle von 5 % (w/v) Magermilchpulver wurde 0,5 % DIG-Blocklösung (Roche Diagnostics) zum Absättigen der Membran sowie zum Verdünnen des Antikörpers verwendet.

2.5.4. Immunfällung

2.5.4.1. Immunfällung unter stringenten Bedingungen

Mitochondrien bzw. Außenmembranvesikel mit einer Proteinkonzentration von 0,2-1 mg/ml wurden in Triton X100-Puffer (1 % (w/v) Triton X100, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) im Überkopfschüttler solubilisiert. Nach dem Abtrennen von unlöslichem Material (25.000xg, 2°C, 15 min) wurde der Überstand als Ausgangsmaterial für die Immunfällung eingesetzt. Dazu wurden spezifische Antiseren oder auch IgGs im Überkopfschüttler in 300 µl Triton X100-Puffer bei 4°C an Protein-A-Sepharose (PAS; 10 µl Antiserum bzw. 70 µg IgG pro Milligramm PAS) vorgebunden. Die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Antikörpern wurde abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 sec) und mit den Triton X100-Extrakten aus Mitochondrien bzw. Außenmembranvesikeln inkubiert (Überkopfschüttler, 1 h, 4°C). Die an die Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 sec), zweimal mit Triton X100-Puffer und zweimal mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit Laemmli-Auftragspuffer dissoziiert, für 5 min bei 56°C inkubiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. Immundekoration analysiert. Um eine Überlagerung der resultierenden Banden durch schwere oder leichte IgG-Ketten zu vermeiden, wurde dem Laemmli-Auftragspuffer H₂O₂ (0,05%) zugesetzt, außerdem enthielt der Puffer kein Mercaptoethanol, somit wurde eine Dissoziation der IgGs in schwere und leichte IgG-Ketten vermindert.

2.5.4.2. Coimmunfällung

Zur Kopplung der Immunglobuline IgG (IgG) an Protein-A-Sepharose (PAS) wurden 10-20 µl PAS mit Lysepuffer (50 mM Kaliumacetat, pH 7,0, 100 mM NaCl) gewaschen, mit 30 µl Antiserum in 300 ml Lysepuffer für 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert und nochmals mit Lysepuffer gewaschen. Mitochondrien oder OMV mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml wurden vor der Coimmunfällung für 30 min bei 4°C im Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde nicht lysiertes sowie aggregiertes Material abzentrifugiert (15 min, 25.000xg, 2°C). Der Überstand wurde zur PAS gegeben, an die zuvor Immunglobuline (IgG) gekoppelt worden waren. Die Bindung der Antigen-Komplexe an die IgGs erfolgte während einer Inkubation im Überkopfschüttler für 1 h bei 4°C. Anschließend wurde zweimal mit Lysepuffer und einmal mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen.

Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Immunblot und gegebenenfalls durch Autoradiographie und Densitometrie analysiert.

2.6. Mikrobiologische Methoden

2.6.1. Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 1 % (w/v) Bacto-Trypton
 0,5 % (w/v) NaCl

E. coli-Medien wurden 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von Platten wurde 2 % (w/v) Bacto-Agar zugegeben. Zu Selektiv-Medien wurde gegebenenfalls 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

2.6.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte wie von Rose et al., 1990 beschrieben, das Standard-Medium war YPD. Die Kultivierung in flüssigen Medien erfolgte unter Schütteln (120-160 Upm) in Erlenmeyer-Kolben. Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Hefezellen in Laktatmedium angezogen.

- YPD-Medium 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Bacto-Pepton, 2 % (w/v) Glucose
- Laktat-Medium 0,3 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,1 % (w/v) Glucose, 0,1 % (w/v) KH_2PO_4 , 0,1 % (w/v) NH_4Cl , 0,05 % (w/v) CaCl_2 , 0,06 % NaCl , 0,06 % MgSO_4 , 0,0015 % FeCl_3 , 2 % Laktat, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,5 eingestellt

Zur Herstellung von Platten wurde 2 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Bacto-Agar, Zucker und Medien wurden getrennt autoklaviert.

2.6.3. Kultivierung von *Neurospora crassa*

10 ml *Neurospora crassa* (Wildtyp 74A) Konidiensuspension (108/ml) wurden in 1 Liter Medium aus 930 ml autoklaviertem Wasser, 20 ml Vogels Minimalmedium (Vogel, 1964) und 40 ml 1,4 M Saccharoselösung eingebracht und 15 Stunden bei 25°C unter Weisslicht und ständiger Luftzufuhr kultiviert. Pro Liter Kulturflüssigkeit wurden auf diese Weise 5 bis 10 g Pilzmyzel erhalten.

2.7. Geräte, Chemikalien und Enzyme

2.7.1 Geräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten, Schlauchpumpe „Minisart“

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevomatic 60

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Spannungsgeräte, FPLC-System,

Chromatographiesystem „Äkta purifier“, Schlauchpumpe P1, Chromatographiesäulen

Appligene, Heidelberg: Agarose-Imaging-system „The Imager™“

BDK, Hamburg: Sterilbank

Beckman Coulter, München: Kühlzentrifugen J2-21, Avanti J25, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge Optima TLX100, alle einschließlich Rotoren und Zentrifugenbecher bzw. -röhrchen

Biacore AB, Freiburg: Oberflächenplasmonresonanzspektrometer BIAcore 2000

Bio-Rad, München: “Gene Pulser” für Elektroporation

Biometra, Göttingen: programmierbarer Thermostat für PCR-Reaktionen „Trio-Thermocycler“

B. Braun-Biotech, Melsungen: Schüttelwasserbäder und Schüttler “Certomat”, Homogenisatoren
Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415
Evotec, Hamburg: Fluoreszenzkorrelationsspektrometer „Confocor“
Fuji, Düsseldorf: Phosphoimaging BAS-Reader System 1500
Heraeus (Kendro), Osterode: Tischzentrifugen, Wärmeschränke
H+P Labortechnik, Oberschleißheim: Autoklav „Varioklav“
IKA, Staufen: Magnetrührer
Infors HT, Einsbach: Schüttler für Bakterien- und Hefekulturen
Memmert, Hannover: Wärmeschränke
Merck Eurolab, München: Vortex-Mixer
MWG Biotech, Ebersberg: Thermocycler „Primus 25“
Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Pufferfiltrationsgerät
Schütt, Göttingen: Autoklav “Bioclav”
Shimadzu, Kyoto, Japan: Spectrophotometer UV 240
Sigma, München: Tisch-Kühlzentrifuge MK
Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München: Gelapparaturen, Gel Trockner, Semi-Dry-Blotkammern, Fermenter für *Neurospora crassa*-Kultivierung, automatische Homogenisatoren, Zelmühlen

2.7.2. Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Desoxyribonukleotide, Glutathionsepharose CL4B, Luminol-Reagenz (ECL), ³⁵S-Methionin, 7-Methyl-guanosintriphosphat (m⁷G(5')ppp(5')XG), PD10-Gelfiltrationssäulen, ProteinA-Sepharose CL4B(PAS), Ribonukleotide
ARK-Sigma, Darmstadt: Oligonukleotide
Behringwerke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans
Biacore AB, Freiburg: BIAcore Sensorchip CM5
Biometra, Göttingen: Kit für die Polymerase-Kettenreaktion (“Prime Zyme”)
Biorad, München: Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase, Proteinreagenz und Proteinstandard für die Proteinbestimmung (“Proteinassay”)
Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach: Digitonin

2. MATERIAL UND METHODEN

CytRX, Norcross, USA: Immunstimulanz "Titer Max™"

Difco Lab., Detroit, USA: Bacto-Agar, Bacto-Hefe-Extrakt, Bacto-Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton

Eurogentec, Seraing, Belgien: Oligonukleotide

Fluka, Buchs, CH: Trichloressigsäure (TCA)

Fuji: Röntgenfilme

Genomed, Bad Oeynhausen: Kit zur Präparation von Plasmid-DNA ("Jetstar")

Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH, IPTG, Tris

Gibco/BRL, Eggenstein: Agarose, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, Klenow-Enzym

ICN Pharmaceuticals, Eschwege: [³⁵S]-Methionin (1100-1499mCi/mmol)

Invitrogen, Groningen: TOPO-TA Cloning Kit

Kodak, München: Röntgenfilme

Merck, Darmstadt: Aceton, Aminosäuren, Ammoniumacetat, Chloroform, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, EDTA, Essigsäure, Galactose, Glucose, Glycerin, Glycin, HCl, H₂SO₄, Isoamylalkohol, Isopropanol, KCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, Kaliumacetat, KOH, LiCl, Methanol, MgCl₂, Magnesiumacetat, MgSO₄, Milchsäure, MnCl₂, Natriumacetat, Natriumcitrat, NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaOH, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, Phenol, Saccharose, Sorbitol, Tris, Triton X-100

Molekular Probes, Eugene: TAMRA-5-Maleimid

Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide

Nestle, München: Magermilchpulver

New England Biolabs, Schwalbach, Taunus: Restriktionsenzyme, DNA-Polymerase, dNTP, T4-DNA-Ligase,

Pall-Gelman, Dreieich: PVDF-Blotmembranen, Nylonmembranen, Filter, Sterilfilter

Pierce, Rochester, USA: chemische Quervernetzer, BCA-Proteinassay-Kit

Promega, Madison, USA: Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin), Retikulozytenlysat, RNAsin, SP6-Polymerase, pGEM-Vektoren

Roche Diagnostics, Mannheim: Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase), Creatinkinase, Ethidiumbromid, Proteaseinhibitoren, Proteinase K, Restriktionsenzyme

Schleicher und Schuell, Dassel: Faltenfilter, Filterpapier, Nitrocellulose BA83, Whatman-3MM-Filterpapier

Seikagaku Kogyo, Tokyo: Zymolyase

2. MATERIAL UND METHODEN

Serva, Heidelberg: Acrylamid, Aminosäuren, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie-Brilliant-Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, TEMED, Xylenyanol

Sigma, München: Agarose, Aminosäuren, Ampicillin, APS, Apyrase Grade VIII, Creatinphosphat, Ethidiumbromid, Glycerol, Lachsspermien-DNA, β -Mercaptoethanol, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE und für die Analyse nativer Proteinkomplexe, MOPS, Oligomycin, Phenylmethylsulfonsäure (PMSF), Rinderserumalbumin (BSA), Trypsin, Trypsin-Inhibitor (STI, aus Sojabohne), Uracil, Valinomycin

USB, Cleveland, Ohio, USA: Pepton, Trypton

Qiagen, Hamburg: Ni-NTA-Agarose, Nylon-Membranen, Kit zur Präparation von Plasmid-DNA, Kit zur Extraktion von DNA aus Agarosegel

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung von *Neurospora crassa* TOM6 und TOM7

Durch die Herstellung des *Neurospora crassa* Stammes GR107, in dem Tom22 mit einem Hexahistidyltag am Carboxyterminus exprimiert wird, war es erstmals möglich, den TOM-Komplex mittels NiNTA-Affinitätschromatographie zu reinigen sowie dessen Struktur und Zusammensetzung zu analysieren (Künkele et al., 1998). Die Ergebnisse der elektrophoretischen Analyse des gereinigten TOM-Komplexes deuteten darauf hin, daß der TOM-Komplex neben den vier bekannten TOM-Komponenten Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70 noch drei weitere, bislang nicht identifizierte Komponenten mit Molekulargewichten von 5–7 kDa enthält (siehe Abb. 3). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, diese Proteine zu identifizieren, ihre vollständige Sequenz zu bestimmen und die Proteine zu charakterisieren. Da der TOM-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* drei Komponenten mit einer Größe von 5-8 kDa, Tom5 (Dietmeier et al., 1997), Tom6 (Kassenbrock et al., 1993, Alconada et al., 1995) und Tom7 (Hönlinger et al., 1996) enthält, lag nahe, daß es sich bei den unbekanntenen Komponenten des TOM-Komplexes aus *Neurospora crassa* um Orthologe dieser Proteine handelt.

3.1.1. Strategie zur Klonierung der kleinen Tom-Proteine

Es sei hier zunächst die Strategie dargestellt, mit welcher die kleinen Tom-Proteine auf molekularer Ebene identifiziert wurden. In den folgenden Kapiteln wird die Klonierung der einzelnen Komponenten detailliert dargestellt.

Der erste Schritt zur Identifizierung der drei neuen Proteine bestand in der aminoterminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau. Da durch Edman-Abbau jedoch nur eine Teilsequenz bestimmt werden kann - unter optimalen Bedingungen können maximal 20-30 Aminosäurereste sicher identifiziert werden - musste die vollständige Proteinsequenz mittels anderer Verfahren bestimmt werden.

Aufgrund der durch den Edman-Abbau erhaltenen Aminosäuresequenzen bestand die Möglichkeit, Genfragmente unter Verwendung degenerierter Primer in der PCR zu amplifizieren, mit deren Hilfe das vollständige Gen isoliert werden sollte.

Als Matritze für die Polymerasekettenreaktion wurde eine *Neurospora crassa*-cDNA-Phagenbibliothek verwendet, deren Vorteil gegenüber genomischen DNA-Bibliotheken

darin besteht, daß die kodierende Sequenz nicht durch mögliche Introns in der DNA-Sequenz unterbrochen wird. Zudem ist eine direkte Übersetzung erhaltener Aminosäuresequenzen in die entsprechenden DNA-Sequenzen und umgekehrt von erhaltenen DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen möglich.

Die Klonierung der Tom-Gene erfolgte in mehreren Schritten. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen dienten zunächst dazu, Primer mit möglichst hoher Spezifität für die gesuchten DNA-Fragmente zu entwerfen. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes war es notwendig, degenerierte Primer zu konstruieren. Dabei wurde darauf geachtet, Bereiche der Aminosäuresequenz für die Primer auszuwählen, deren

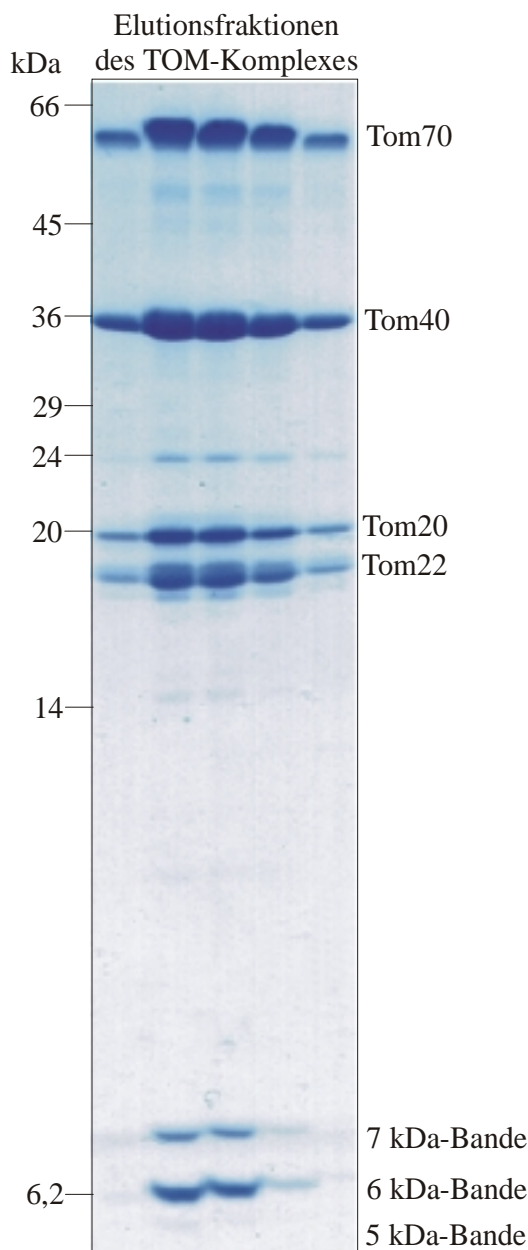


Abb.3: Elektrophoretische Analyse des TOM-Komplexes aus *Neurospora crassa*: Der TOM-Komplex wurde aus OMV, die aus dem *Neurospora crassa*-Stamm GR 107 gewonnen wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Komponenten des TOM-Komplexes wurden auf einem High-Tris-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt.

Aminosäuren von möglichst wenigen synonymen Codons codiert werden, und daß möglichst nur für das jeweils dritte Nukleotid eines Triplets mehrere Nukleotide berücksichtigt werden mussten. Zur Minderung der Sequenzvarianten der Primer wurden Purin (R), das mit Cytosin und Thymin paart sowie Pyrimidin (Y), das mit Adenin und Guanodin paart verwendet.

Das PCR-Produkt mit der erwarteten Größe wurde mittels TA-Klonierung in einen PCR-TOPO-Vector kloniert und anschließend unter Verwendung von Vectorprimern sequenziert. Die Richtigkeit der amplifizierten DNA-Sequenz wurde durch Übersetzung in die durch Edman-Abbau ermittelte Aminosäuresequenz überprüft.

In den nächsten Schritten sollten die 5' und 3' gelegenen Bereiche des Gens ausgehend von dem bekannten Stück mittels „nested PCR“ amplifiziert werden. Hierfür wurden jeweils zwei neue spezifische Primer in 5'- als auch in 3'-Richtung mit den flankierenden Vectorprimern in der PCR kombiniert.

Die Durchführung einer nested PCR diente im wesentlichen der Erhöhung der Spezifität sowie der leichteren Erkennung der spezifischen PCR-Produkte aufgrund ihres zu erwartenden geringen definierten Größenunterschieds. Durch das Zusammenfügen der 5' und 3' amplifizierten Fragmente mit dem bekannten Stück konnten die vollständigen cDNA-Sequenzen ermittelt werden. Parallel dazu wurde mit Hilfe der zuerst gewonnenen Fragmente eine mit Digoxigenin markierte genspezifische DNA-Sonde erzeugt und zur Durchmusterung der cDNA-Bank mittels Plaquehybridisierung eingesetzt. Die anschließende Isolierung und Umwandlung des entsprechenden Phagen in den Bluescript SK-Vector ergab ebenfalls die vollständige cDNA-Sequenz.

Um die Genstruktur zu erfassen, wurde zusätzlich eine sortierte genomische *Neurospora crassa*-Cosmid-DNA-Bibliothek durch Hybridisierung mit den Digoxigenin-markierten DNA-Sonden durchmustert. Es konnten auch hier mit verschiedenen Sonden positive Cosmide isoliert und analysiert werden.

Dieser Schritt diente gleichzeitig der Verifizierung der erhaltenen cDNA-Sequenz, da die Methode sowohl der Amplifizierung der cDNA-Bibliothek, als auch der Analyse der cDNA-Sequenzen der zu sequenzierenden Komponenten auf der Polymerasekettenreaktion basierte und Fehler nicht ausgeschlossen werden können.

3.1.2. Der TOM-Komplex aus *N.crassa* enthält 2 bislang unbekannte Proteine, Tom6 und Tom7.

Zur Sequenzierung des Aminoterminus der drei unbekanntes TOM- Komponenten durch Edman-Abbau wurden die Komponenten des TOM-Komplexes zunächst auf einem High-Tris-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die entsprechenden Proteinbanden (siehe auch Abb. 3) wurden ausgeschnitten und sequenziert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Tabelle 1 gezeigt. Die ersten 28 Aminosäurereste der 6 kDa-Bande zeigen eine sehr hohe Sequenzidentität zu denen von Tom7 aus *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Abb. 3 und Abb. 12). Deshalb wurde das 6 kDa-Protein im folgenden als *Neurospora crassa Tom7* bezeichnet.

Im weiteren Verlauf der Klonierung des entsprechenden Gens stellte sich heraus, daß die Aminosäuresequenz des 7 kDa-Proteins im Carboxyterminus sehr ähnlich zum Tom6 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist, deshalb wird dieses Protein von nun an als *Neurospora crassa Tom6* bezeichnet.

Tom-Komponente	Aminoterminale Aminosäuresequenz
5 kDa-Bande	MFALSEESKER
6 kDa- Bande	MFALSEESKERIGKLIDISEVVVHYGYL
7 kDa-Bande	PSAKYIERPGGSRKSKGFIRSTYDQL

Tabelle 1: Aminoterminale Sequenzierung der 5 kDa-, 6 kDa- und 7 kDa-Bande durch Edman- Abbau

Basierend auf den Erkenntnissen, die in *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wurden, war zu erwarten, daß eine der drei zu identifizierenden Komponenten des TOM-Komplexes von *Neurospora crassa* (siehe Abb. 3, (Künkele et al., 1998)) ein Ortholog von Tom5 ist.

Es schien möglich zu sein, dass die in Abb. 3 gezeigte 5 kDa-Bande Tom5 repräsentiert. Die Sequenzanalyse dieser Bande durch Edman-Abbau ergab jedoch eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des die 5 kDa-Bande repräsentierenden Proteins mit der Sequenz *Neurospora crassa Tom7* (siehe Tabelle 1). Daher lag die Schlußfolgerung nahe, daß es sich bei dem die 5 kDa-Bande repräsentierenden Protein um ein Abbauprodukt von Tom7 handelt, wobei der Abbau vom Carboxy-Terminus erfolgt

(siehe Abb. 5). Diese PCR-Produkte wurden ausgewählt, in den PCR-TOPO-Vector kloniert und sequenziert. Das ca. 500 Basenpaare große PCR-Produkt Tom6 Fw1-T7 sowie das ca. 1300 bp große PCR-Produkt Tom6 Rev2-T3 (siehe Abb. 5, jeweils mit Pfeil gekennzeichnet) konnten als Tom6- kodierende DNA-Sequenz identifiziert werden (siehe Abb. 7c). Parallel wurde versucht, die cDNA-Phagenbibliothek durch Plaque-Hybridisierung zu durchmustern und den Phagen zu isolieren, der die *TOM6*-cDNA enthält.

Dazu wurde eine *TOM6*-spezifische Digoxigenin- markierte DNA-Sonde amplifiziert und für die Durchmusterung der cDNA- Bibliothek verwendet.

E.coli-Zellen wurden mit der cDNA-Phagenbibliothek infiziert und ausplattiert, die Phagen-DNA wurde auf Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit der *TOM6*-spezifischen DNA-Sonde analysiert (siehe Abschnitt 2.1.7.5 und 2.1.7.6. sowie Abb. 6a). Phagen, deren DNA mit der *TOM6*-DNA hybridisierte wurden isoliert. Um Einzelphagen zu erhalten, wurden im weiteren *E.coli*- Zellen mit den isolierten Phagen infiziert und einer erneuten Analyse durch Southernblot und Hybridisierung mit der *TOM6*-spezifischen DNA- Sonde unterzogen (Abb. 6b).

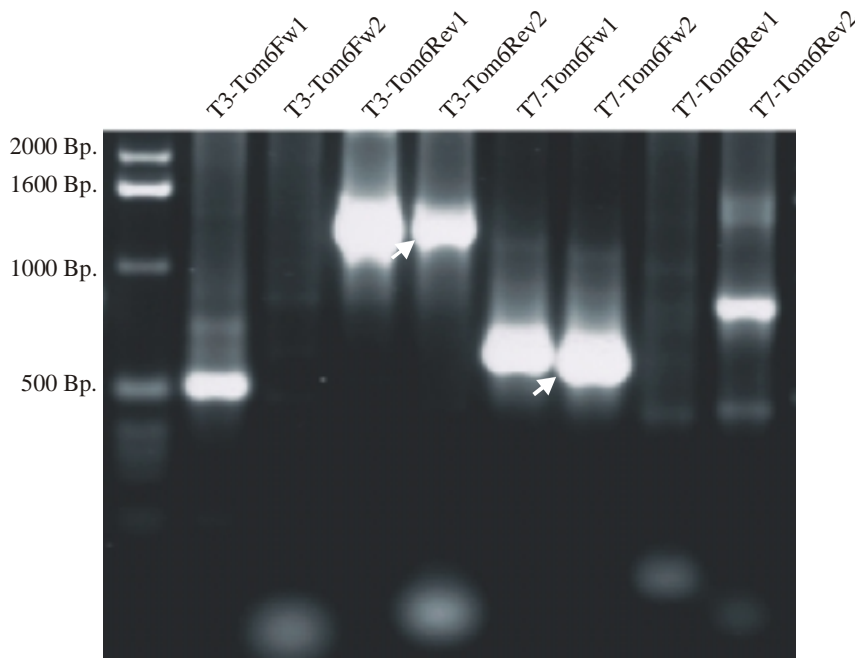


Abb. 5: Amplifikation der cDNA von *N.crassa* Tom6. Es wurde eine PCR mit einer cDNA-Bibliothek als Matritze und den angegebenen Primerpaaren durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Amplifikate auf einem 2 %-Agarosegel getrennt. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete PCR-Produkt wurde für die weitere Klonierung verwendet.

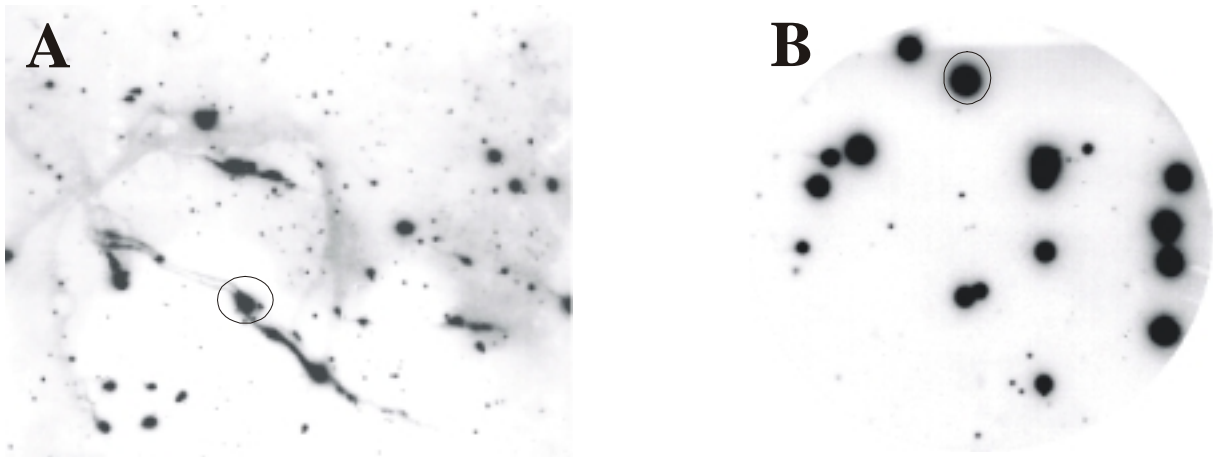


Abb. 6: Durchmusterung einer cDNA-Phagenbibliothek nach der cDNA von Tom6 (A) *E.coli*- Zellen wurden mit einer λ -Phagenbibliothek infiziert. Die abgebildete Platte enthielt ca. 200.000 Phagen. Ein Abbild der Platte wurde durch Übertragen der Phagen-DNA auf Nylonmembranen erstellt und dieses durch Hybridisierung mit Tom6-spezifischer, Digoxigenin-markierter DNA analysiert. (B) Tom6-DNA enthaltende Phagen wurden isoliert und für die erneute Infektion von *E.coli* verwendet. Die abgebildete Platte enthielt ca. 30 Phagen. Die Analyse erfolgte wie in A beschrieben. Die in (A) und (B) durch einen Kreis markierten Bereiche auf den DNA-Blots kennzeichnen je ein Beispiel für TOM6-spezifische Signale. Die zugehörigen Phagen wurden isoliert und weiter analysiert.

Die isolierten Phagen wurden in das Plasmid Bluescript SK umgewandelt und dessen Insert sequenziert. Die Sequenz des translatierenden Bereichs der cDNA stimmte mit der durch die PCR-Methode erhaltenen Sequenz überein und ist in Abb. 7c dargestellt.

Bei der Analyse der durch Übersetzung der cDNA-Sequenz erhaltenen Aminosäuresequenz von Tom6 ergab sich ein Konflikt am Aminosäurerest 26. Dieser Aminosäurerest war im Edman-Abbau als Glutamin bestimmt worden, die DNA- Sequenz kodiert jedoch für Serin. Serin kann hierbei als richtig bestimmter Aminosäurerest angesehen werden, da die Richtigkeit der Tom6-cDNA-Sequenz durch die im folgenden beschriebenen weiteren DNA-Sequenzierungen bestätigt werden konnte. Dagegen ist die Wahrscheinlichkeit fehlerhafter Aminosäurebestimmungen durch Edman-Abbau nach 25 Abbauten sehr hoch, zumal die Retentionszeiten der PITC-Derivate von Serin und Glutamin nach der reversed phase-HPLC sehr ähnlich sind.

Um die Genstruktur zu erfassen, wurde zusätzlich eine in Mikrotiterplatten sortierte genomische Cosmid-DNA-Bibliothek (Orbach, 1994) durch Dot-Blot- und Koloniehybridisierung mit einer Tom6-spezifischen Digoxigenin- markierten DNA-Sonde durchmustert.

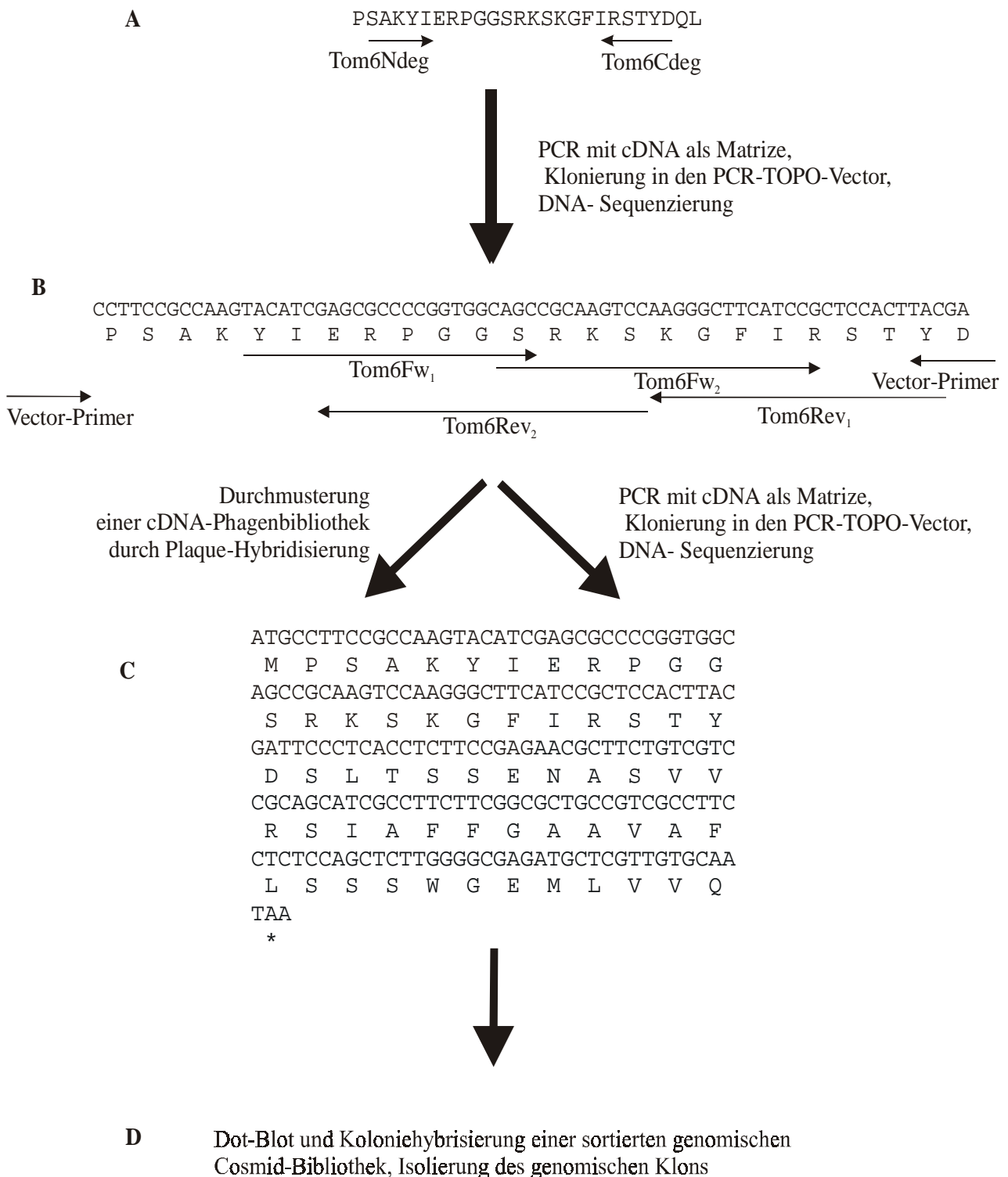


Abb. 7: Bestimmung der cDNA- und genomischen Sequenz von *N.crassa* Tom6. (A) Auf Grundlage der durch Edman-Abbau bestimmten Aminosäuresequenz wurde das entsprechende DNA-Fragment mit degenerierten Primern amplifiziert. (B) Zur Amplifizierung der gesamten cDNA wurde eine PCR durchgeführt, in der Tom6-spezifische Primer mit den Vectorprimern T3 bzw. T7 kombiniert wurden. Alternativ wurde die cDNA-Phagenbibliothek durch Plaque-Hybridisierung durchmusterung. (C) Translatierender Bereich der cDNA-Sequenz von *N.crassa* Tom6 (D) Weg zur genomischen Sequenz von *Neurospora crassa* Tom6.

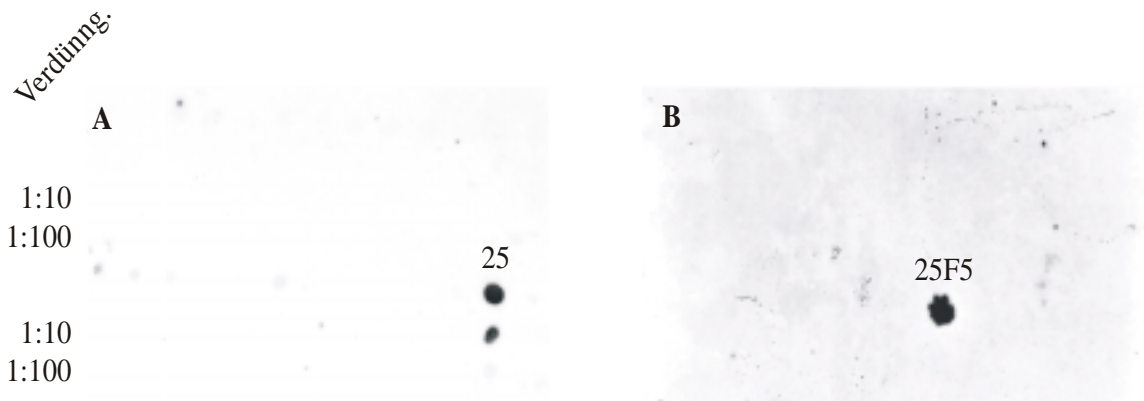


Abb. 8: Durchmusterung einer sortierten genomischen DNA-Bibliothek nach dem *TOM6*-Gen. (A) Je 2 μ l der gesamten aus einer Mikrotiterplatte der Bibliothek isolierten DNA wurden in verschiedenen Verdünnungen auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit *TOM6*-spezifischer DNA analysiert. (B) Ein Abbild der Mikrotiterplatte #25 der genomischen DNA-Bibliothek wurde auf eine Nylonmembran übertragen und wie in A beschrieben analysiert. Das Cosmid #25F5 enthält das Gen von *TOM6*.

Zum Auffinden der Mikrotiterplatten, die ein Cosmid mit dem Tom6-Gen enthalten, wurde zunächst der gesamte in einer Mikrotiterplatte enthaltene Cosmidpool isoliert, auf eine Nylon-Membran übertragen und durch Dot-Blot-Hybridisierung mit einer Tom6-spezifischen DNA-Sonde durchmustert (Abb. 8a). Zur Identifizierung des das *TOM6*-Gen enthaltenden Cosmids wurde die Platte #25 durch Koloniehybridisierung analysiert, dabei konnte gezeigt werden, daß das Cosmid #25F5 die Gensequenz von *TOM6* enthält (siehe Abb. 8b).

Dieses Cosmid wurde isoliert und unter Verwendung der Primer Tom6C sowie Tom6N sequenziert, die erhaltene genomische Sequenz ist in Abb. 9 dargestellt.

Die genomische Sequenz von *TOM6* enthält 2 Introns, die 121 bzw. 79 bp lang sind und die für *Neurospora crassa*-Introns spezifischen 5'- und 3'-Splice Sequenzen sowie die für ein Intron geforderte Lariat-Sequenz (Bruchez et al., 1993) enthalten.

Ein Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von Tom6 in *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* offenbart eine hohe Sequenzidentität im Bereich der potentiellen Transmembrandomäne und im Carboxyterminus, während im Aminoterminus lediglich eine geringe Sequenzhomologie erkennbar ist. Vielmehr ist der Aminoterminus von *Neurospora crassa* Tom6 im Vergleich zum Tom6 aus *Saccharomyces cerevisiae* durch eine wesentlich höhere Anzahl geladener Aminosäuren gekennzeichnet, wobei der Anteil positiv geladener Aminosäuren überwiegt. (siehe Abb. 9b).

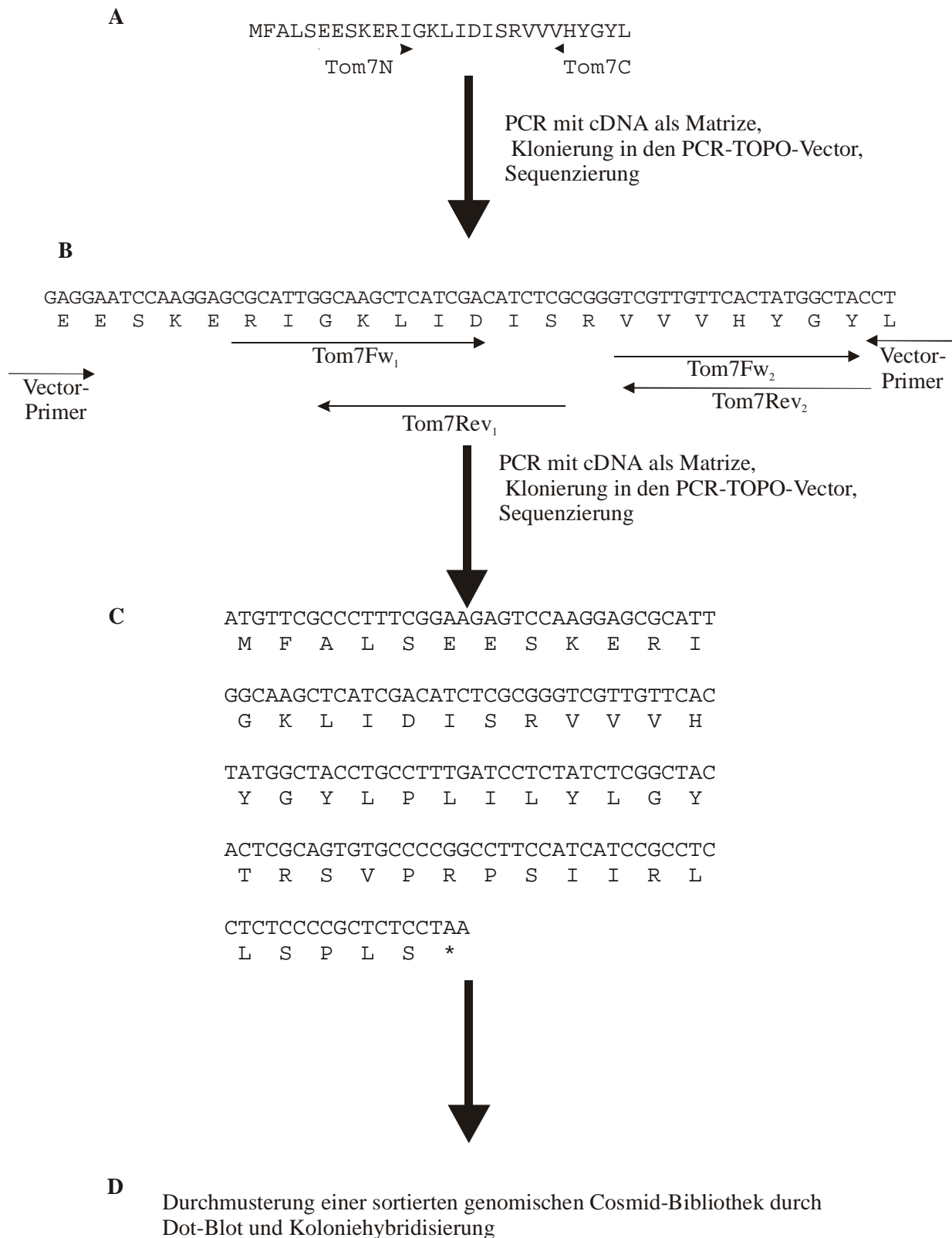


Abb. 10: Bestimmung der cDNA- und genomischen Sequenz von *Neurospora crassa* Tom7. (A) Auf Grundlage der durch Edman-Abbau bestimmten Aminosäuresequenz wurden degenerierte Primer entworfen und eine PCR durchgeführt. Das erhaltene Amplifikat wurde in den PCR-TOPO-Vector kloniert und sequenziert. (B) Zur Amplifizierung der gesamten cDNA-Sequenz wurde eine PCR durchgeführt, in der TOM7-spezifische Primer mit den Primern T3 und T7 kombiniert wurden. Das erhaltene Amplifikat wurde in den PCR-TOPO-Vector kloniert und sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz ist in (C) dargestellt. Zum Erlangen der genomischen Sequenz wurde eine Strategie wie in (D) angegeben verfolgt.

Aus der erhaltenen DNA-Sequenz kann die durch Edman-Abbau bestimmte Aminosäuresequenz von Tom7 (siehe Abb. 10b) abgeleitet werden.

Für die Amplifizierung der gesamten cDNA wurden im folgenden weitere Polymerasekettenreaktionen durchgeführt, wobei die Primer Tom7Fw1 und Tom7Fw2 sowie die Primer Tom7Rev1 und Tom7Rev2 jeweils mit den Primern T3 und T7 kombiniert wurden. Die PCR-Produkte wurden analog der für *TOM6* beschriebenen Kriterien ausgewählt und sequenziert. Der im Ergebnis erhaltene codierende Bereich der *TOM7*-cDNA-Sequenz ist in Abb. 10b dargestellt.

Die Durchmusterung der genomischen DNA-Bibliothek erfolgte durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten, *TOM7*-spezifischen DNA-Sonde, die durch PCR unter Verwendung der Primer Tom7N und Tom7C sowie genomischer DNA als Matritze amplifiziert wurde. Die erste Dot-Blot-Hybridisierung mit aus den Mikrotiterplatten isolierten Cosmidpools ergab 4 positive Cosmidpools. Die Koloniehybridisierung dieser einzelnen Pools ergab schließlich, daß *TOM7* in den Cosmiden #15G8, #12D11, #3B11 und #22H6 enthalten ist. Für die Bestimmung der gesamten genomischen Sequenz von *TOM7* wurden die Cosmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und eine Southernblotanalyse durchgeführt.

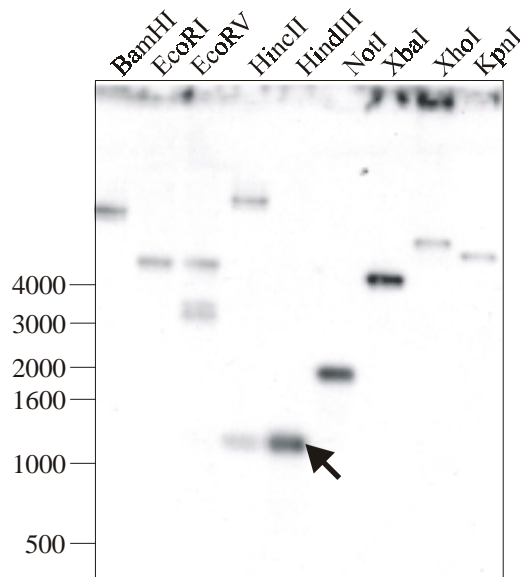


Abb 11: Restriktionsverdau und Southernblotanalyse des *TOM7* enthaltenden Cosmids #12D11. Je 5 µg DNA des Cosmids #12D11 wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit *TOM7*-spezifischer DNA analysiert. Die DNA-Bande, die der durch einen Pfeil gekennzeichneten Bande entspricht wurde in den pGEM4-Vektor kloniert und für die weitere Sequenzierung verwendet.

Wie Abb. 11 zeigt, konnte dabei u.a. ein 1200bp- HindIII- Fragment des Cosmids #12D11 identifiziert werden, welches *TOM7* enthält. Dieses Fragment wurde isoliert und in den pGEM4-Vector kloniert. Das Ergebnis der Sequenzierung mit Vectorprimern ist in Abb. 12a dargestellt. Wie Abb. 12a zeigt, enthält das *TOM7*-Gen 3 Introns, die alle ca.70-80 bp lang sind und die für *Neurospora crassa* typischen 5'-und 3'-Splice-Sequenzen sowie die für ein Intron geforderte Lariat-Sequenz enthalten.

Tom7 konnte außer in *Saccharomyces cerevisiae* auch in anderen Organismen identifiziert werden (siehe Abb. 13). Die Aminosäuresequenz von Tom7 ist sehr stark konserviert, beim Vergleich der Sequenz von *Neurospora crassa* Tom7 mit den Tom7-Sequenzen aus anderen Organismen lässt sich eine hohe Sequenzähnlichkeit feststellen, zwischen *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* sind die Sequenzen sogar zu 44%, zwischen *Neurospora crassa* und *Homo sapiens* zu 35% identisch (siehe Abb. 12b und Abb. 13).

3.2. Charakterisierung von Tom6 und Tom7 aus *Neurospora crassa*

3.2.1. Tom6 und Tom7 sind Bestandteil des TOM-Core Komplexes

Zur Charakterisierung von Tom6 und Tom7 wurden mit Hilfe von synthetischen Peptiden Antikörper gegen die jeweils ersten zwölf aminoterminalen Aminosäuren gewonnen. Diese Antikörper erkennen monospezifisch Tom6 und Tom7. Abb. 14a zeigt die Anreicherung von Tom6 und Tom7 in den verschiedenen Aufreinigungsstufen, von Mitochondrien über OMV zu isoliertem TOM-Komplex und belegt, daß es sich bei Tom6 und Tom7 tatsächlich um Komponenten des TOM-Komplexes handelt.

Der TOM-Komplex ist eine dynamische Translokationsmaschine, die in verschiedenen Zustandsformen existiert. Aus der Literatur ist bekannt, daß der TOM-Komplex Komponenten enthält, die fest miteinander assoziiert sind und den TOM-Core-Komplex bilden, wie Tom 22 und Tom40 (Dekker et al., 1998, Ahting et al., 1999). Daneben gibt es TOM-Komponenten, die nur peripher mit dem Komplex assoziiert sind und somit leicht vom Komplex abdissoziieren. Zu letzteren Komponenten zählen Tom20 und Tom70 (Dekker et al., 1996, Dekker et al., 1998). Für Tom6 und Tom7 des TOM-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde berichtet, daß diese beiden Komponenten zwar feste Bestandteile des TOM-Komplexes sind, aber nach Solubilisierung von Mitochondrien mit dem Detergens TritonX100 unter den Bedingungen der Blaunativgelelektrophorese vollständig vom TOM-Komplex abdissoziieren (Dekker et al., 1998).

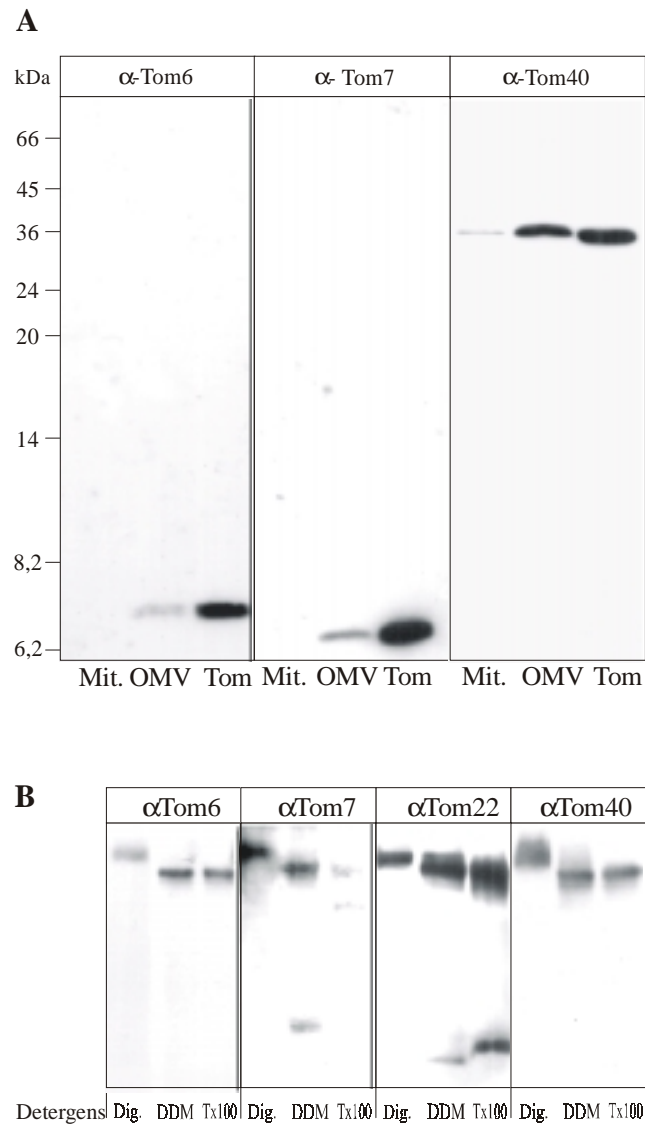


Abb. 14: Tom6 und Tom7 sind integrale Bestandteile des TOM-Core-Komplexes. (A) Tom6 und Tom7 sind Bestandteile des isolierten TOM-Komplexes. Je 50 μ g Mitochondrien, OMV und gereinigter TOM-Komplex wurden auf ein High-Tris-Harnstoffgel geladen, auf PVDF-Membranen geblottet und durch Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tom6, Tom7 und Tom40 analysiert. (B) Tom6 und Tom7 sind Bestandteile des TOM-Core-Komplexes. Je 20 μ g OMV wurden in Probenpuffer, der jeweils 1% des angegebenen Detergens enthielt solubilisiert und die Proteine durch Blaunativgelelektrophorese getrennt. Nach dem Blotten auf PVDF erfolgte die Analyse durch Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tom6, Tom7, Tom22 und Tom40.

Um die Assoziation von Tom6 und Tom7 mit den Komponenten des *Neurospora crassa* Tom-Core-Komplexes zu charakterisieren, wurden Außenmembranvesikel (OMV) mit verschiedenen Detergentien solubilisiert und anschließend eine Blaunativgelelektrophorese durchgeführt.

Wie Abb. 14b zeigt, sind Tom6 und Tom7 im TOM-Core-Komplex enthalten, da sie nach einer Blaunativgelelektrophorese zusammen mit Tom22 und Tom40 in einer Bande mit apparenter molekularer Masse von ca. 400 kDa detektiert werden konnten. Selbst nach der Solubilisierung mit 1% DDM und 1% Triton X100, unter Bedingungen, unter denen

peripher assoziierte Komplexproteine wie Tom20 und Tom70 vom TOM-Komplex abdissoziieren, comigrierten Tom6 und Tom7 noch weitestgehend mit dem hochmolekularen Kernkomplex.

Eine weitere Methode, die Assoziation von Proteinen mit dem TOM-Komplex zu charakterisieren ist die Coimmunfällung. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment OMV mit Digitonin bzw. DDM solubilisiert und deren Proteine mit Antikörpern gegen verschiedene TOM-Proteine immunopräzipitiert.

Nach der Solubilisierung der OMV mit Digitonin konnten sowohl Tom6, als auch Tom7 effizient mit Antikörpern gegen Tom22 und Tom40 copräzipitiert werden (siehe Abb. 15a). Dagegen wurde nur ein geringer Anteil von Tom6 und Tom7 mit Antikörpern gegen Tom70 kopräzipitiert.

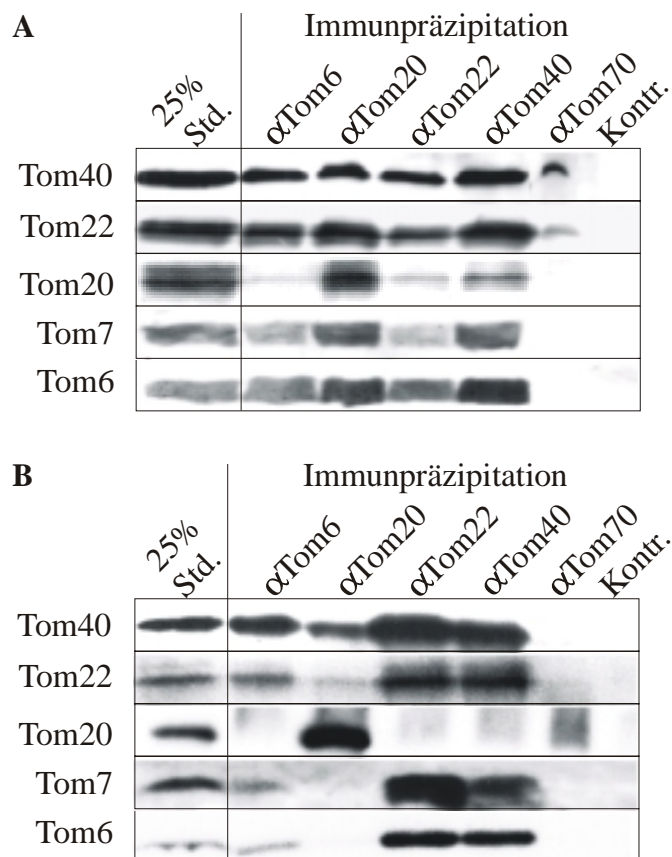


Abb. 15: Coimmunfällung von OMV-Proteinen. (A) OMV (50 μ g pro Spur) wurden mit Puffer, der 1% Digitonin enthielt, lysiert und anschließend mit Protein-A-Sepharose inkubiert, an die Antikörper gegen die angegebenen Proteine gebunden waren. Anschließend wurden die an die Protein-A-Sepharose gebundenen Proteine eluiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel geblottet und mit Antikörpern gegen die auf der linken Seite angegebenen Tom-Proteine dekoriert. (B) OMV (50 μ g pro Spur) wurden mit Puffer, der 1% DDM enthielt, lysiert und die Coimmunfällung wie in (A) beschrieben durchgeführt.

Dies ist ein weiteres Argument dafür, daß beide Proteine eng mit den Proteinen des Tom-Core-Komplexes assoziiert sind. Interessanterweise konnten Tom6 und Tom7, wie auch Tom22 und Tom40 ebenfalls effizient mit Tom20-Antikörpern gefällt werden. Andererseits konnte Tom20 nur in geringen Mengen mit Antikörpern gegen Tom6, Tom7, Tom22 und Tom40 gefällt werden. Somit muss Tom20 ebenfalls ein stabil gebundener Bestandteil des TOM-Holo-Komplexes sein. Neben dem im TOM-Komplex vorkommenden Tom20 gibt es eine Population von Tom20, die frei bzw. nur lose mit dem TOM-Komplex assoziiert ist.

Nach Solubilisierung der OMV mit 1% DDM, also unter Bedingungen, bei denen nur der TOM-Core-Komplex erhalten bleibt, konnte Tom20 nicht mit Antikörpern gegen Komponenten des Core-Komplexes präzipitiert werden (siehe Abb. 15b) . Dagegen wurden Tom6 und Tom7 auch unter diesen Bedingungen effizient mit Antikörpern gegen die Komponenten des TOM-Core-Komplexes präzipitiert (siehe Abb. 15b). Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, daß beide Proteine integrale Bestandteile des TOM-Core-Komplexes sind.

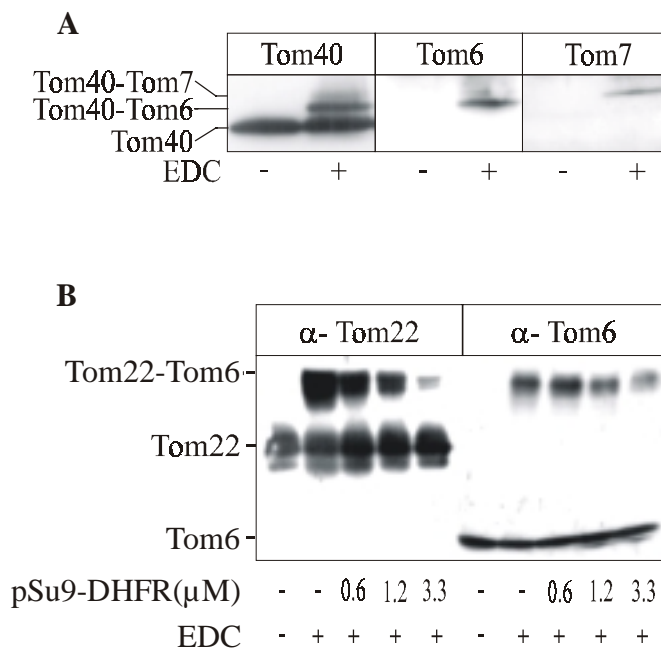


Abb. 16: Tom6 und Tom7 sind in engem und dynamischem Kontakt zu anderen TOM-Proteinen. (A) Tom6 und Tom7 sind in engem Kontakt zu Tom40. Je 150 μ g OMV wurden für 25 min bei 25°C ohne bzw. mit dem Quervernetzer EDC inkubiert. Anschließend wurde jede Probe in drei Aliquots aufgeteilt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Analyse erfolgte durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Tom6, Tom7 und Tom40. (B) Tom6 ist in dynamischem Kontakt zu Tom22. OMV wurden mit den angegebenen Mengen des Präproteins pSu9-DHFR sowie dem Quervernetzer EDC für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde jede Probe in zwei Aliquots aufgeteilt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Analyse erfolgte durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Tom6 und Tom22.

3.2.2. Tom6 steht in engem Kontakt zu Tom22 und Tom40

Für das Verständnis der Struktur und Funktion von Tom6 und Tom7 ist es wichtig, deren Position im TOM-Komplex zu kennen. In *Saccharomyces cerevisiae* führt die Disruption von Tom6 zu einem partiellen Zerfall des TOM-Komplexes in Subkomplexe. Deshalb wurde für Tom6 eine Rolle als Bindeglied zwischen Tom22 und Tom40 postuliert (Dekker et al., 1998).

Die chemische Quervernetzung von Proteinen bietet die Möglichkeit, die in direkter räumlicher Nähe von Tom6 und Tom7 befindlichen Komponenten des TOM-Komplexes zu identifizieren.

OMV wurden dazu mit EDC, einem Quervernetzer, der Aminogruppen unmittelbar mit Carboxygruppen verbindet, inkubiert und anschließend durch Immundekoration analysiert. Hierbei konnte je ein Quervernetzungsprodukt zwischen Tom6 und Tom40 (Abb. 16a) sowie zwischen Tom6 und Tom22 (Abb. 16b) identifiziert werden. Dies deutet auf einen direkten Kontakt zwischen Tom6 und den beiden anderen Tom-Proteinen hin. Die Interaktion des TOM-Komplexes mit dem Substrat pSu9-DHFR führt sowohl zu einer verminderten Effizienz der Quervernetzung von Tom6 mit Tom22 (siehe Abb 16b.), als auch der Quervernetzung von Tom6 mit Tom40 (Rapaport et al., 1998). Diese Verminderung ist offenbar eine Folge von Konformationsänderungen, die der TOM-Komplex während der Interaktion mit Präproteinen durchläuft.

3.2.3. Tom7 kann mit Tom40 quervernetzt werden

Nach Inkubation von OMV mit dem Quervernetzer EDC konnte ein Quervernetzungsprodukt von Tom7 mit Tom40 nachgewiesen werden (siehe Abb 16a.). Dies deutet auf einen direkten Kontakt zwischen Tom7 und Tom40 hin. Ein Quervernetzungsprodukt zwischen Tom7 und Tom22 wurde jedoch nicht beobachtet.

3.3. Insertion und Assemblierung von *in vitro* synthetisierten Vorstufen von Tom6 und Tom7 in den TOM-Komplex

Im Vergleich zur Biogenese von Matrixproteinen ist die Biogenese von Außenmembranproteinen bislang nur sehr wenig untersucht. So sind die Mechanismen des Imports in die Außenmembran und der Assemblierung in die entsprechenden

Proteinkomplexe weitgehend unbekannt. Zwar wurde der Import von Tom6 in Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* durch Expression *in vivo* und durch *in vitro*-Experimente untersucht. Allerdings wurde bei den *in vitro*-Importexperimenten bislang ausschließlich die Carbonatextraktion als Importkriterium herangezogen (Cao and Douglas, 1995, Cao and Douglas, 1996). Diese erlaubt es zwar, Rückschlüsse über die Insertion eines Proteins in die Membran zu ziehen, lässt allerdings offen, ob diese Proteine auch tatsächlich in den TOM-Komplex assemblieren. Um die tatsächliche Assemblierung der radioaktiv markierten Vorstufen in den TOM-Komplex zu analysieren, wurde die Coimmunfällung sowie die Blaunativgelelektrophorese gewählt. Die Coimmunfällung erlaubt es, die stabile Interaktion radioaktiv markierter Vorstufenproteine mit Komponenten des TOM-Komplexes nachzuweisen. Ebenso ist die Blaunativgelelektrophorese eine geeignete Methode für die Verfolgung der Inkorporation von Präproteinen in den TOM-Komplex, da nur in den Komplex inserierte Präproteinmoleküle zusammen mit den anderen TOM-Komponenten im hochmolekularen TOM-Komplex migrieren. Gleichzeitig ist diese Methode leicht quantifizierbar.

Für die Untersuchung des Imports von Tom6 und Tom7 in Mitochondrien wurden in Retikulozytenlysat synthetisierte, mit ³⁵S-Methionin markierte Präproteine verwendet.

Um ein stärkeres Signal zu erhalten, wurde die cDNA beider Präproteine so kloniert, daß sie am Carboxyterminus ein zusätzliches Methionin enthalten. Abb. 17a und Abb. 17b zeigen, daß sowohl die radioaktiv markierten Vorstufen von Tom6 als auch von Tom7 in Mitochondrien importiert werden und in den TOM-Core-Komplex assembliert werden. Tom6 und Tom7 migrieren im Blaunativgel mit gleicher Geschwindigkeit wie in gleicher Weise importiertes Tom22 und Tom40. Die Assemblierung aller Proteine ist somit abhängig von der Temperatur während der Importreaktion. Die Analyse durch nachträgliche Immundekoration mit Tom22- und Tom40-Antikörpern ergab, daß der die radioaktiv markierten Proteine enthaltende Komplex die gleiche Größe wie der endogene TOM-Komplex hat. Somit müssen die radioaktiv markierten Proteine in bereits bestehende TOM-Komplexe assembliert worden sein. Aus Abb. 17b ist ersichtlich, daß DHFR-Tom6 ebenfalls in den TOM-Komplex assemblieren kann. Bedingt durch die mit dem Tom6 fusionierte DHFR migriert das in den TOM-Komplex integrierte DHFR-Tom6 allerdings etwas langsamer als der TOM-Komplex.

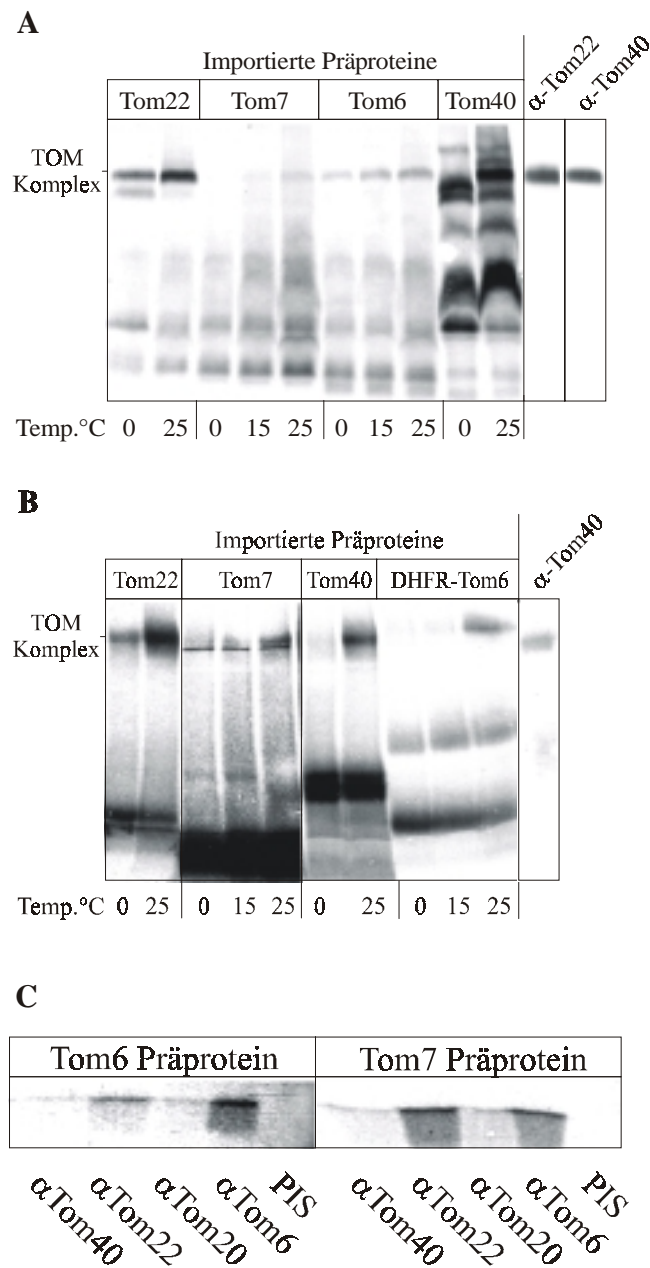


Abb. 17: Tom6 und Tom7 können *in vitro* in den TOM-Komplex assemblieren. (A) Analyse des Imports mit der Blaunativgelelektrophorese. In Retikulozytenlysat synthetisierte, mit ^{35}S markierte Präproteine von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom40 wurden zusammen mit jeweils 50 μg Mitochondrien für 20 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien gewaschen, reisoliert, in Probenpuffer mit 1% Digitonin solubilisiert und auf ein Blaunativgel geladen. Die Analyse erfolgte durch Autoradiographie. Die Position des endogenen TOM-Komplexes wurde durch Immundeckoration mit Antikörpern gegen Tom22 und Tom40 bestimmt. (B) Analyse des Imports mit der Blaunativgelelektrophorese nach Solubilisierung mit DDM. Der Import und die Analyse des Imports wurden wie in A angegeben durchgeführt. Nach dem Import wurden die Mitochondrien in Probenpuffer mit 0,5 % DDM solubilisiert und auf ein Blaunativgel geladen. (C) Analyse des Imports durch Coimmunpräzipitation. Tom6 und Tom7 wurden für 20 min bei 25°C mit Mitochondrien inkubiert, anschließend wurden die Mitochondrien gewaschen, reisoliert, in Solubilisierungspuffer mit 1% Digitonin solubilisiert und Proteine durch an Protein-A-Sepharose gebundene Antikörper immobilisiert (PIS: Präimmunserum). Die immobilisierten Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und auf ein High-Tris-Harnstoffgel geladen, die Analyse erfolgte durch Autoradiographie.

Für viele nachfolgend beschriebene Experimente wurde deshalb DHFR-Tom6 verwendet, um aufgrund der höheren Anzahl ³⁵S-markierter Methionine pro Molekül den Import leichter verfolgen zu können.

Ein weiteres Kriterium für die korrekte Assemblierung der radioaktiven Vorstufen in den TOM-Komplex war die Coimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen verschiedene Komponenten des TOM-Komplexes. Auch hier konnte eine spezifische Integration beider Proteine in den TOM-Komplex nachgewiesen werden (Abb. 16c).

3.3.1. Tom6 und Tom7 werden über den normalen Importweg in bereits bestehende TOM-Komplexe inseriert

Theoretisch ist es denkbar, daß Tom6 und Tom7 direkt in die Außenmembran inserieren, ohne daß Komponenten des TOM-Komplexes involviert sind.

Eine Möglichkeit, die Beteiligung von Komponenten des TOM-Komplexes an der Importreaktion zu untersuchen ist die Vorbehandlung der Mitochondrien mit Proteasen. Dies führt zur Abspaltung der cytosolischen Domänen von Tom20, Tom70 und Tom22. Der Verlust dieser Domänen führt z.B. zur Hemmung des Imports von Präproteinen, die in die Matrix bzw. Innenmembran importiert werden (Pfaller et al., 1989). Um zu überprüfen, ob die Rezeptoren des TOM-Komplexes für den Import von Tom6 benötigt werden, wurden Mitochondrien vor dem Import von Tom6 mit Trypsin vorbehandelt und nachfolgend die Importeffizienz analysiert. Abb. 18a zeigt, daß der Import von Tom6 gehemmt wird. Dies deutet darauf hin, daß die Rezeptorkomponenten für die Insertion von Tom6 in den Komplex benötigt werden.

Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, inwieweit Tom6 und Tom7 die TOM-Maschinerie für den eigenen Import nutzen, ist die Konkurrenz mit dem Präprotein pSu9-DHFR, das in die mitochondriale Matrix importiert wird. Chemische Mengen dieses Proteins akkumulieren an der Oberfläche der Mitochondrien und blockieren die TOM-Importpore, wenn sie in Gegenwart von Methotrexat mit Mitochondrien inkubiert werden (Ungermann et al., 1994, Dekker et al., 1997).

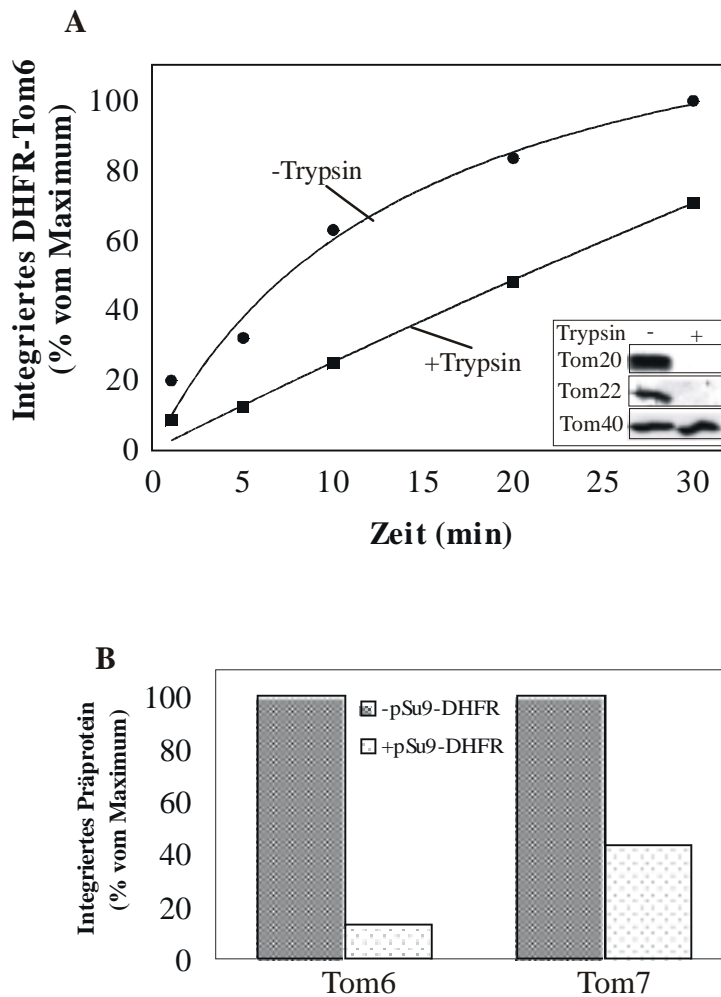


Abb. 18: Tom6 und Tom7 werden über den TOM-Komplex in Mitochondrien importiert. (A) Die Assemblierung von Tom6 und Tom7 ist abhängig von den cytosolischen Rezeptordomänen des TOM-Komplexes. DHFR-Tom6 wurde für die angegebene Zeit bei 25°C in Importpuffer mit intakten Mitochondrien bzw. Mitochondrien, die vorher 20 min auf Eis mit Trypsin (200 µg/ml) behandelt wurden inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien gewaschen, reisoliert, in Probenpuffer mit 1% Digitonin resuspendiert und auf ein Blaunativgel geladen. Die Assemblierung in den TOM-Komplex wurde durch Quantifizierung der radioaktiven Banden, die mit dem endogenen TOM-Komplex migrierten analysiert. Der maximale Import wurde dabei als 100% definiert. (B) Das Präprotein pSu9-DHFR kann die Assemblierung in den TOM-Komplex hemmen. Radioaktiv markierte Vorstufen von Tom6 bzw. Tom7 wurden für 20 min bei 25°C in Importpuffer mit 0,5 mM NADPH und 1 µM MTX und Mitochondrien (-pSu9-DHFR) bzw. Mitochondrien, die 20 min auf Eis mit 12 µM pSu9-DHFR vorinkubiert worden waren (+pSu9-DHFR) inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie in A beschrieben behandelt. Die Assemblierung in den TOM-Komplex von Mitochondrien ohne pSu9-DHFR wurde als 100% definiert.

Wie aus Abb. 18b ersichtlich ist, führte Konkurrenz des Imports mit pSu9-DHFR zu einer signifikanten Hemmung der Assemblierung von Tom6 und Tom7 in den TOM-Komplex. Somit ist es sehr wahrscheinlich, daß beide Proteine über die TOM-Importpore in Mitochondrien importiert werden und in den TOM-Komplex assemblieren.

3.3.2. Untersuchungen zur Targeting- Information in der Aminosäuresequenz von Tom6

Im Gegensatz zu Proteinen, die in die Matrix importiert werden und eine durch MPP abspaltbare Präsequenz enthalten, gibt es kein einheitliches Modell für Signalsequenzen von Proteinen in der mitochondrialen Außenmembran (siehe auch Abschnitt 1.2.4.).

Die Aminosäuresequenz von *Neurospora crassa* Tom6 enthält eine am Carboxyterminus gelegene potentielle Transmembrandomäne, die den einzigen möglichen Membrananker des Proteins darstellt. Für Tom6 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, daß diese Domäne sowie Aminosäurereste, welche die Transmembrandomäne auf der cytosolischen Seite flankieren, essentiell für den Import des Proteins in Mitochondrien sind. Dagegen hat der Aminoterminus des Proteins keine Bedeutung für den Import (Cao and Douglas, 1995; Cao and Douglas, 1996).

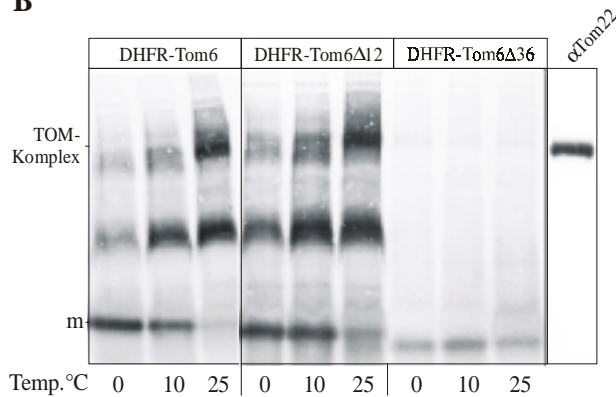
Ziel dieses Abschnitts war es, die für die Membran- und Komplexinsertion wichtigen Bereiche in der Sequenz von *Neurospora crassa* Tom6 zu charakterisieren. Dazu wurden Tom6-Präproteine konstruiert, bei denen die ersten 12, bzw. die ersten 36 Aminosäurereste fehlten. Um den Import dieser Konstrukte besser verfolgen zu können, wurden die Tom6-Präproteine als Fusionsproteine mit Maus-DHFR am Aminoterminus konstruiert (Abb. 19a).

Wie Abb. 19b zeigt, assemblierten DHFR-Tom6 wie auch DHFR-Tom6 Δ 12 sehr effizient in den TOM-Komplex, während DHFR-Tom6 Δ 36 nicht in den TOM-Komplex integrierte. Bei Analyse des Imports durch Coimmunfällung mit Antikörpern gegen Tom22 und Tom40 konnte dagegen auch DHFR-Tom6 Δ 36, wenn auch mit verminderter Effizienz, copräzipitiert werden (Abb. 19c). Das deutet darauf hin, daß DHFR-Tom6 Δ 36 zwar nicht in den TOM-Komplex assembliert, aber spezifisch mit ihm interagiert und Translokationsintermediate ausbildet. Ebenso wurde durch Carbonatextraktion nachgewiesen, daß auch die nicht in den Komplex integrierenden Präproteine in die Membran inserierten (nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse der Funktionalität und Lokalisierung verschiedener Tom22-Konstrukte erhalten. So waren GFP-Tom22-Fusionskonstrukte mit einer Deletion des für die korrekte Assemblierung in den TOM-Komplex essentiellen Bereichs zwar nicht funktionell, aber in Mitochondrien lokalisiert (Egan et al., 1999).

A

DHFR-TOM6 : DHFR-MPSAKYIERPGGSRKSKGFIRSTYDSLTSSENASVVRSTAFFGAAVAFLSSSWGEMLVVQ
 DHFR-Tom6Δ12: DHFR-----SRKSKGFIRSTYDSLTSSENASVVRSTAFFGAAVAFLSSSWGEMLVVQ
 DHFR-TOM6Δ36: DHFR-----RSTAFFGAAVAFLSSSWGEMLVVQ

B



C

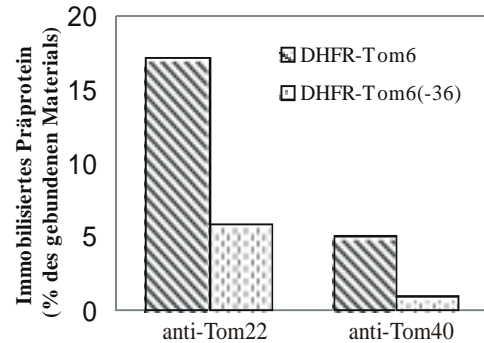


Abb. 19: Das Segment von Aminosäure 13-36 ist essentiell für die Assemblierung in den TOM-Komplex A. Aminosäuresequenzen der verwendeten DHFR-Tom6-Konstrukte. Die Transmembrandomäne von Tom6 ist unterstrichen. **B.** DHFR-Tom6-Fusionsproteine wurden für 20 min bei der angegebenen Temperatur mit Mitochondrien inkubiert und anschließend wie in Abb. 18 beschrieben behandelt. Für die Darstellung des Imports von DHFR-Tom6Δ12 und DHFR-Tom6Δ36 wurde der Blot länger exponiert. „m“ bezeichnet die an die Mitochondrien gebundenen, nicht in den TOM-Komplex assemblierten, monomeren Präproteine. **C.** DHFR-Tom6 und DHFR-Tom6Δ36 wurden für 20 min bei 25°C mit Mitochondrien inkubiert. Im Anschluss an die Importreaktion wurden die Mitochondrien gewaschen und reisoliert. Die Proben wurden in vier gleiche Teile aufgeteilt, ein Teil wurde direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen, die anderen Teile wurden mit Solubilisierungspuffer, der 0,3% TritonX100 enthielt solubilisiert, anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tom22, Tom40 bzw. aus einem Präimmenserum (PIS) durchgeführt. Mit PIS konnten keine Präproteine präzipitiert werden.

Somit befindet sich die für die Assemblierung von Tom6 notwendige Information im Bereich der Aminosäurereste 13-60. Während die Aminosäuresequenzen von Tom6 aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* sich am Aminoterminus stark unterscheiden, weisen die Carboxytermini eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zueinander auf. Daher lag es nahe, die Spezifität des Imports beider Proteine in Mitochondrien zu untersuchen und *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 in Mitochondrien zu importieren, die aus *Neurospora crassa* isoliert wurden und umgekehrt. Gleichzeitig erschien es interessant zu untersuchen, ob ein Hybridkonstrukt, welches aus den 36 aminoterminalen Aminosäureresten von *Neurospora crassa* Tom6 sowie dem Carboxyterminus von *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 besteht (Abb. 20a), in Mitochondrien aus beiden Organismen importiert werden kann und in die entsprechenden TOM-Komplexe assembliert.

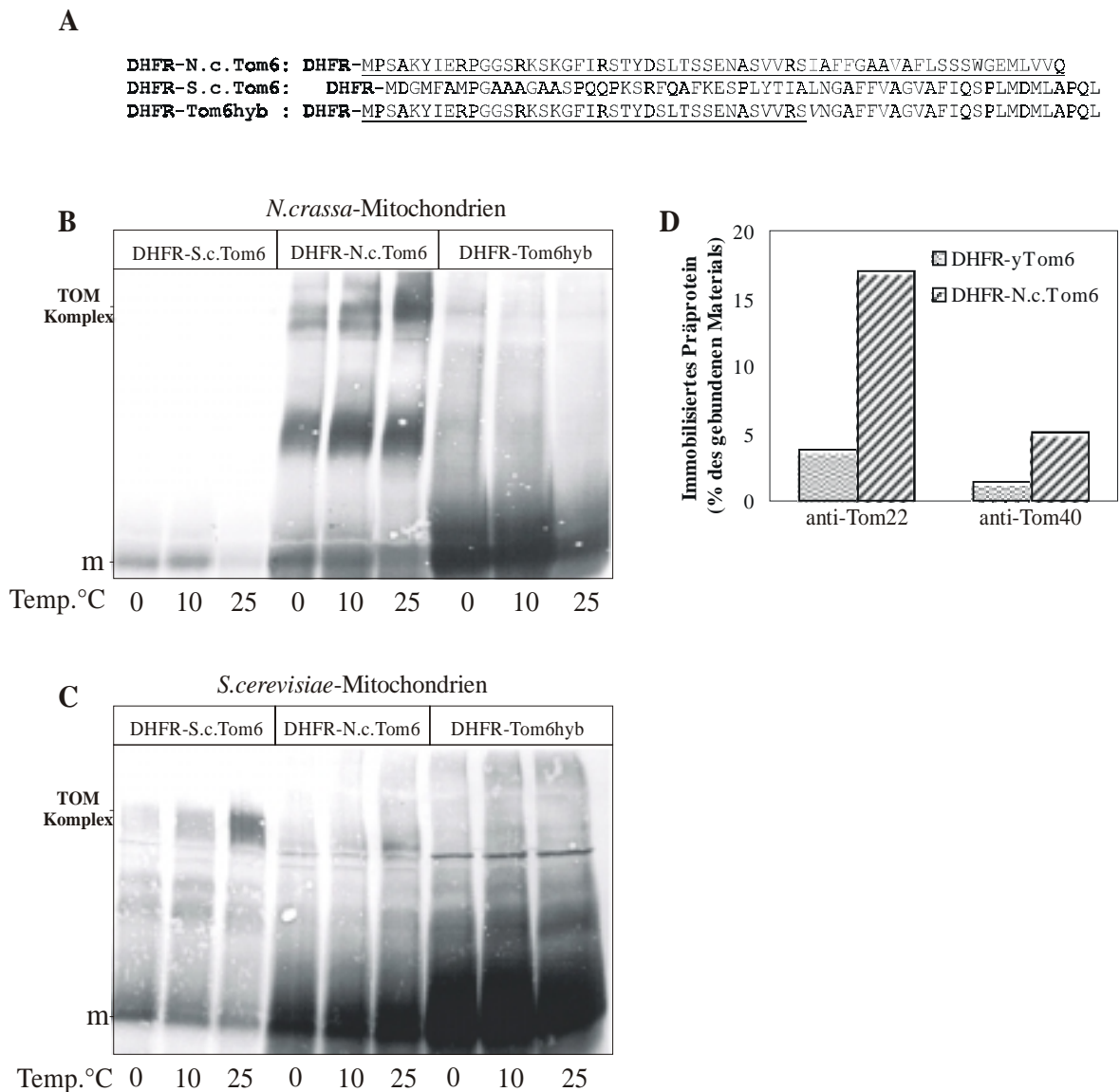


Abb. 20: Tom6-Präproteine integrieren spezifisch in den TOM-Komplex des entsprechenden Organismus. (A) Aminosäuresequenzen der verwendeten DHFR-Fusionskonstrukte. (B) S.c.-Tom6 und ein Hybrid aus *Neurospora crassa*- und *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 integrieren nicht in *Neurospora crassa* Tom-Komplexe. DHFR-Tom6-Fusionsproteine wurden für 20 min mit Mitochondrien bei der angegebenen Temperatur inkubiert, im Anschluss daran erfolgte die Behandlung wie in Abb. 18 beschrieben. Nicht integrierte, monomere Präproteine sind mit „m“ gekennzeichnet. (C) N.c.-Tom6 und das Hybridprotein aus *Neurospora crassa*- und *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 werden nicht in TOM-Komplexe aus *Saccharomyces cerevisiae* integriert. Import und Analyse wurden wie in B durchgeführt. (D) DHFR-N.c.Tom6 bzw. DHFR-S.c.Tom6 wurden mit Mitochondrien für 30 min bei 25°C inkubiert, die weiteren Schritte erfolgten wie in Abb. 18C beschrieben.

Wie Abb. 20 zeigt, erfolgt die Assemblierung der DHFR-Tom6-Konstrukte spezifisch für die jeweiligen Mitochondrien, d.h. DHFR-S.c.Tom6 kann nicht in den TOM-Komplex aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* assembliert werden und umgekehrt. Allerdings binden die nicht Assemblierungs-kompetenten Proteine an Mitochondrien und bilden Translokationsintermediate. Diese bleiben zwar nach dem Waschen an Mitochondrien gebunden, aber unter den Bedingungen der Blaunativgelelektrophorese dissoziieren sie

vom TOM-Komplex ab (Abb. 20b, Abb. 20c). Diese Bindung kann auch durch die auf den Import folgende Coimmunfällung mit Antikörpern gegen Tom22 und Tom40 dokumentiert werden: Die Coimmunfällung nicht assemblierender Proteine war zwar in ihrer Effizienz vermindert, aber spezifisch, da mit Präimmunantikörpern keine Coimmunfällung möglich war (Abb. 20d). Diese Befunde bestätigen die Vermutung, daß der Carboxyterminus essentiell für die initiale Interaktion von Tom6 mit den Komponenten des TOM-Komplexes ist. Diese Interaktion erfolgt nicht selektiv in Bezug auf die Spezies, während die Assemblierung in den TOM-Komplex ein spezifischer Prozess ist, der in *Neurospora crassa* Tom6 durch die Aminosäurereste 13-36 vermittelt wird.

Aufgrund der oben bereits erwähnten hohen Sequenzidentität im Carboxyterminus von Tom6 stand zu erwarten, daß eine Assemblierung des Hybridkonstrukts DHFR-Tom6hyb (Abb. 20a) in den TOM-Komplex aus *Neurospora crassa* möglich ist. Allerdings assemblierte dieses Protein weder in TOM-Komplexe aus *Neurospora crassa*-, noch aus *Saccharomyces cerevisiae*-Mitochondrien. Es konnten lediglich Translokationsintermediate beobachtet werden (Abb. 20b, Abb. 20c). Offenbar ist eine spezifische Interaktion zwischen der Transmembrandomäne und den aminoterminal angrenzenden Aminosäuren nötig, um eine Assemblierung von Tom6 in den TOM-Komplex zu gewährleisten.

In der Aminosäuresequenz von *Neurospora crassa* Tom6 befindet sich mit Arg₃₇ ein positiv geladener Aminosäurerest in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne. Für einige Außenmembranproteine konnte gezeigt werden, daß positiv geladenen Aminosäureresten in der Nähe der Transmembrandomäne eine Bedeutung für den Import in die mitochondriale Außenmembran zukommt. Deshalb wurde die Assemblierung des Proteins DHFR-N.c.Tom6 R37Q untersucht, in dem das positiv geladene Arg₃₇ von Tom6 durch Gln₃₇ ersetzt war. Wie Abb. 21b zeigt, können DHFR-N.c.Tom6 und DHFR-N.c.Tom6 R37Q mit vergleichbarer Effizienz in *Neurospora crassa*-Mitochondrien importiert werden und assemblieren in bereits bestehende TOM-Komplexe. Somit hat der Verlust der positiven Ladung in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne von *Neurospora crassa* Tom6 keine Auswirkungen auf dessen Assemblierung in den TOM-Komplex.

A

DHFR-N.c.Tom6 : DHFR-MPSAKYIERPGGSRKSKGFIRSTYDSLTSSENASVVR**RSIAFFGAAVAFLSSSWGEMLVVQ**
 DHFR-N.c.Tom6R37Q: DHFR-MPSAKYIERPGGSRKSKGFIRSTYDSLTSSENASVVR**QSTAFFGAAVAFLSSSWGEMLVVQ**

B

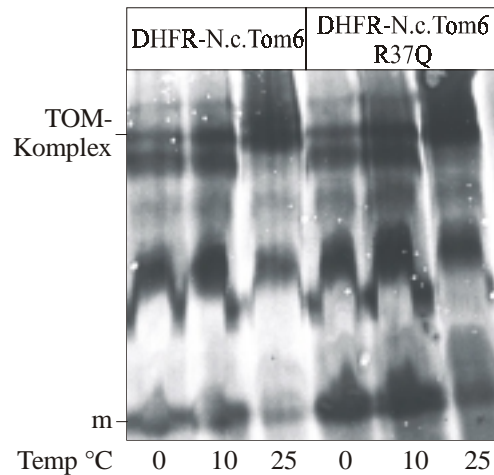


Abb. 21: Positiv geladene Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne von *Neurospora crassa* Tom6 haben keine Bedeutung für die Assemblierung in bestehende TOM-Komplexe. (A) Aminosäuresequenzen der verwendeten DHFR-Fusionskonstrukte. Die ausgetauschten Aminosäurereste sind fett markiert, die Transmembrandomäne von Tom6 ist unterstrichen (B) N.c.-Tom6 und N.c.-Tom6R37Q können in den *Neurospora crassa* Tom-Komplex assemblieren. DHFR-N.c.Tom6-Fusionsproteine wurden für 20 min mit Mitochondrien bei der angegebenen Temperatur inkubiert, im Anschluss daran erfolgte die Behandlung wie in Abb. 18 beschrieben. Nicht integrierte, monomere Präproteine sind mit „m“ gekennzeichnet.

3.4. Charakterisierung der Bindung von mitochondrialen Vorstufenproteinen an den isolierten TOM-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Zu den bislang kaum untersuchten Aspekten des mitochondrialen Imports zählt die quantitative Analyse der Interaktion von Präproteinen mit dem TOM-Komplex. Der Einsatz von isoliertem TOM-Komplex und chemischen Mengen eines Präproteins eröffnete die Möglichkeit, die Bindung dieses Präproteins an den TOM-Komplex näher zu charakterisieren. Im Gegensatz zu früheren Experimenten anderer Arbeitsgruppen sollte hier die Bindung direkt, ohne sekundäre Nachweismethoden wie z.B. Antikörperbindung nachgewiesen werden.

Im ersten Ansatz war beabsichtigt, die Interaktion von Präproteinen an isoliertem TOM-Komplex mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (BIAcore) zu analysieren. Das Ziel bestand darin, die Bindung des TOM-Komplexes an das Präprotein pSu9-DHFR, welches durch Bindung an einen kovalent an die Oberfläche der Chipmatrix gekoppelten Antikörper auf der Chipmatrix immobilisiert war, zu untersuchen. Allerdings gelang es nicht, das Präprotein in einer aktiven Konformation an die Chipmatrix zu binden. Vielmehr wurde eine unspezifische und irreversible Aggregation auf der Chipmatrix

beobachtet. Ebenso erfolgte eine unspezifische und irreversible Integration des TOM-Komplexes in die Chipmatrix. Somit war es nicht möglich, die Affinität der Bindung des TOM-Komplexes an pSu9-DHFR verlässlich zu bestimmen, weshalb von weiteren Messungen abgesehen wurde.

Eine weitere mögliche Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Liganden ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität und der Möglichkeit, die Interaktion einzelner Moleküle miteinander nachzuweisen und zu quantifizieren. Da die Fluoreszenzmessungen in einem konfokalen Volumen erfolgen, kann die Interaktion frei beweglicher Moleküle untersucht werden. Es ist nicht nötig, einen der Interaktionspartner auf einer Matrix zu immobilisieren.

Für die Experimente wurden pSu9-DHFR bzw. DHFR mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA-5-maleimid markiert, mit isoliertem TOM-Komplex inkubiert und die Bindung der markierten Proteine an den TOM-Komplex untersucht.

3.4.1. Das Vorstufenprotein pSu9-DHFR bindet spezifisch und reversibel an isolierten TOM-Komplex

Zunächst sollte die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex nachgewiesen und die Affinität der Bindung bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Mengen an TOM-Core- bzw. Holokomplex mit jeweils 6 nM markiertem pSu9-DHFR inkubiert und die Bindung des markierten Proteins an den TOM-Komplex untersucht. Wie Abb. 22 zeigt, bindet pSu9-DHFR mit hoher Affinität an den TOM-Komplex, während DHFR nur in geringem Maße an den TOM-Komplex bindet. So beträgt der maximale Bindungsanteil von pSu9-DHFR an den TOM-Holokomplex 33,57 %, während er bei DHFR lediglich 13,2 % beträgt. Beim TOM-Core-Komplex beträgt der maximale Bindungsanteil für pSu9-DHFR 24,63 %, während er für DHFR 10,84 % beträgt. Die durch nichtlineare Regression errechnete scheinbare Bindungskonstante beträgt $1,342 \pm 0,27$ nM für den TOM-Holokomplex sowie $3,408 \pm 1,04$ nM für den TOM-Core-Komplex.

Eine weitere wichtige Fragestellung war, ob die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex reversibel ist. Hierzu wurde der TOM-Komplex zunächst mit markiertem pSu9-DHFR inkubiert, anschließend wurden verschiedene Mengen nicht-markierten Proteins zur Probe dazugegeben und die Bindung des markierten pSu9-DHFR an den TOM-Komplex untersucht. Wie Abb. 23a zeigt, sinkt der Anteil des an den TOM-

Komplex gebundenen pSu9-DHFR mit steigender Konzentration des nicht-markierten Proteins. Die scheinbare IC_{50} -Konstante beträgt 126 nM.

In einem Kontrollexperiment wurde der TOM-Komplex zunächst mit unterschiedlichen Mengen nicht-markiertem pSu9-DHFR vorinkubiert, anschließend wurde markiertes pSu9-DHFR zu den Proben gegeben und die Fluoreszenz gemessen. Wie aus Abb. 23b ersichtlich ist, sinkt auch hier die Menge des gebundenen markierten pSu9-DHFR an den TOM-Komplex mit steigender Konzentration von nicht-markiertem pSu9-DHFR. Die scheinbare IC_{50} -Konstante beträgt 66 nM. Die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex ist also reversibel. Die Hemmung der Bindung des markierten pSu9-DHFR an den TOM-Komplex erfolgt unabhängig davon, in welcher Reihenfolge das markierte und das nicht-markierte Präprotein zum TOM-Komplex dazugegeben werden.

3.4.2. Die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex kann durch hohe Ionenstärke inhibiert werden

Der amphipathische Charakter der die mitochondriale Präsequenz bildenden α -Helix (ein Teil der Helix enthält ungeladene, der andere positiv geladene Aminosäuren) lässt vermuten, daß die Interaktion des Präproteins mit dem TOM-Komplex auf elektrostatischer Wechselwirkung basiert (siehe auch Abschnitt 1.4.). Zur Untersuchung des Charakters der Bindung erfolgte die Bindung von pSu9-DHFR an den isolierten TOM-Komplex in Pufferlösung, die unterschiedliche Konzentrationen KCl enthielt. Aus Abb. 23 ist ersichtlich, daß mit steigender KCl-Konzentration der Bindungsanteil von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex drastisch reduziert ist. Dies deutet auf eine ionische Wechselwirkung zwischen pSu9-DHFR und dem TOM-Komplex hin.

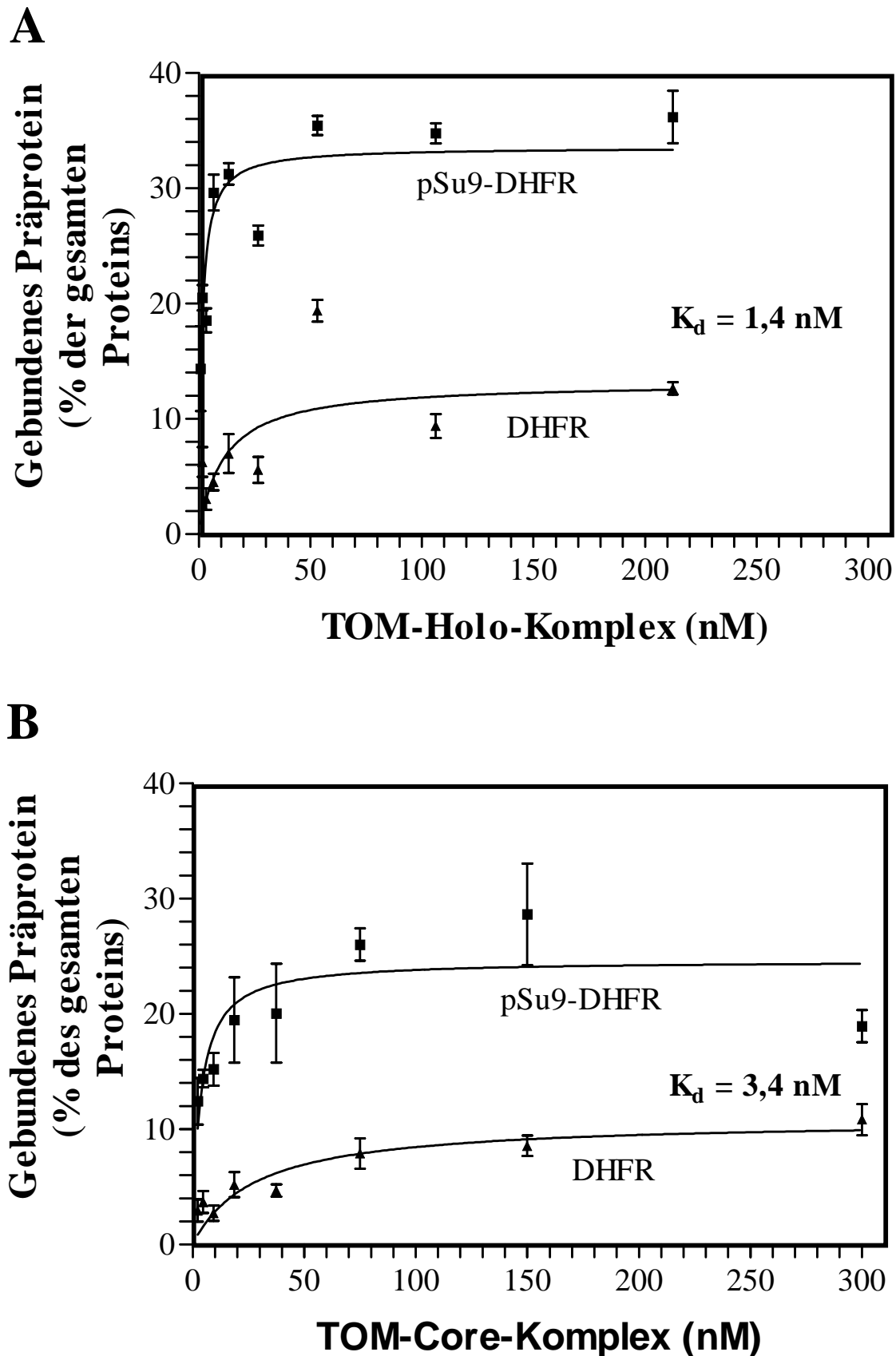


Abb. 22: pSu9-DHFR bindet spezifisch und mit hoher Affinität an isolierten TOM-Komplex. Je 6 nM mit TAMRA-5-Maleimid markierte pSu9-DHFR bzw. DHFR wurden mit verschiedenen Mengen an (A) TOM-Holokomplex und (B) TOM-Core-Komplex inkubiert. Die Bindung von pSu9-DHFR an TOM wurde durch Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie bestimmt.

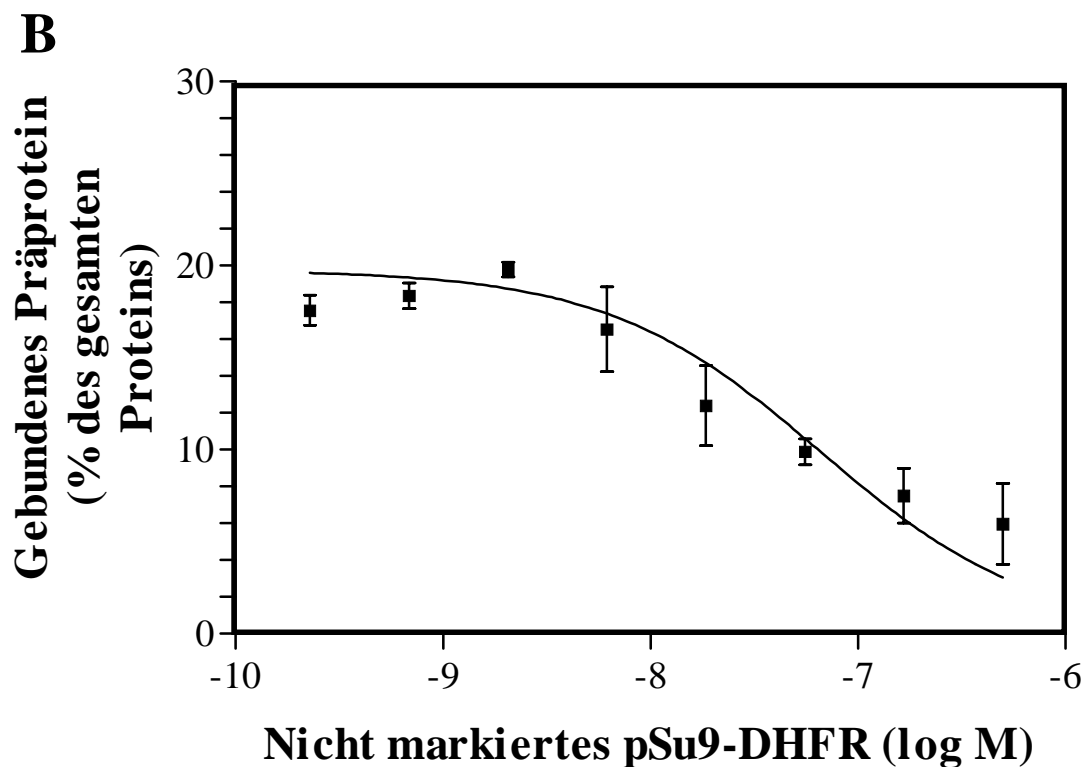
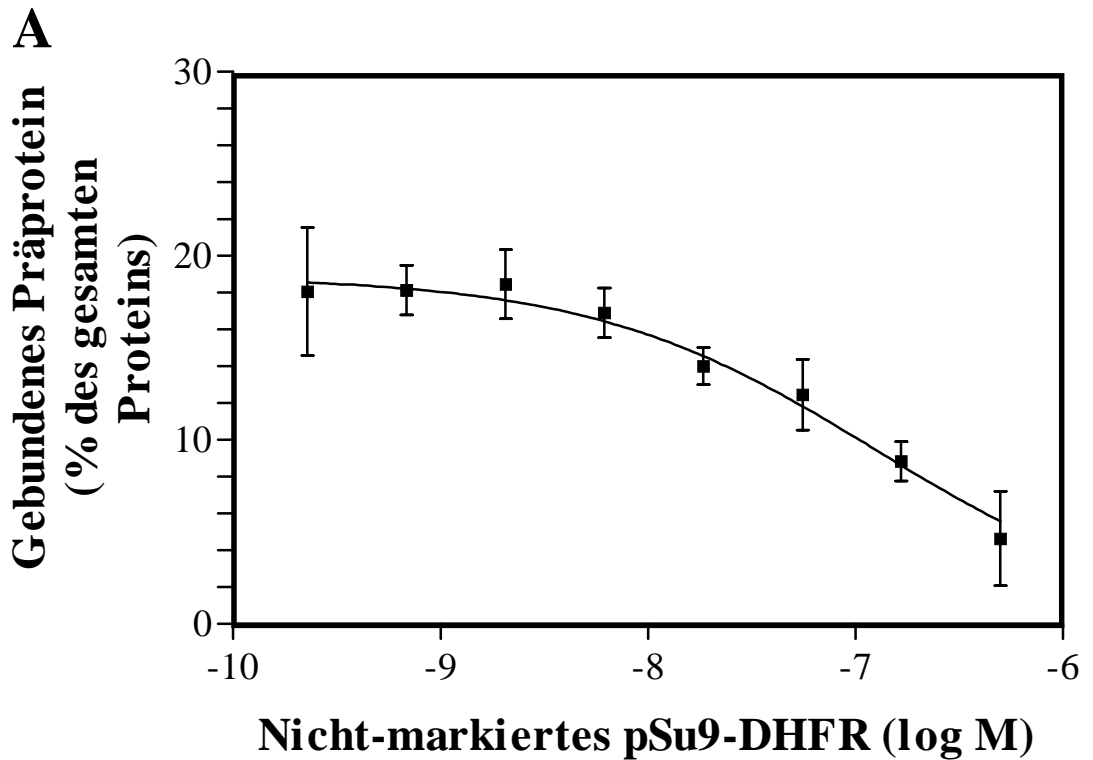


Abb. 23: pSu9-DHFR bindet reversibel an den TOM-Komplex. (A) Je 64 nM TOM-Komplex wurden mit verschiedenen Konzentrationen nicht markierten pSu9-DHFR für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde das gleiche Volumen mit markiertem pSu9-DHFR (Endkonzentration 6 nM) zu den Proben gegeben und die Bindung des markierten Proteins an den TOM-Komplex durch FCS gemessen. (B) Je 64 nM TOM-Komplex wurden mit markiertem pSu9-DHFR (Endkonzentration 12 nM) für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde das gleiche Volumen, das unterschiedliche Mengen nichtmarkierter pSu9-DHFR enthielt zu den Proben gegeben und die Bindung des markierten Proteins an den TOM-Komplex durch FCS gemessen.

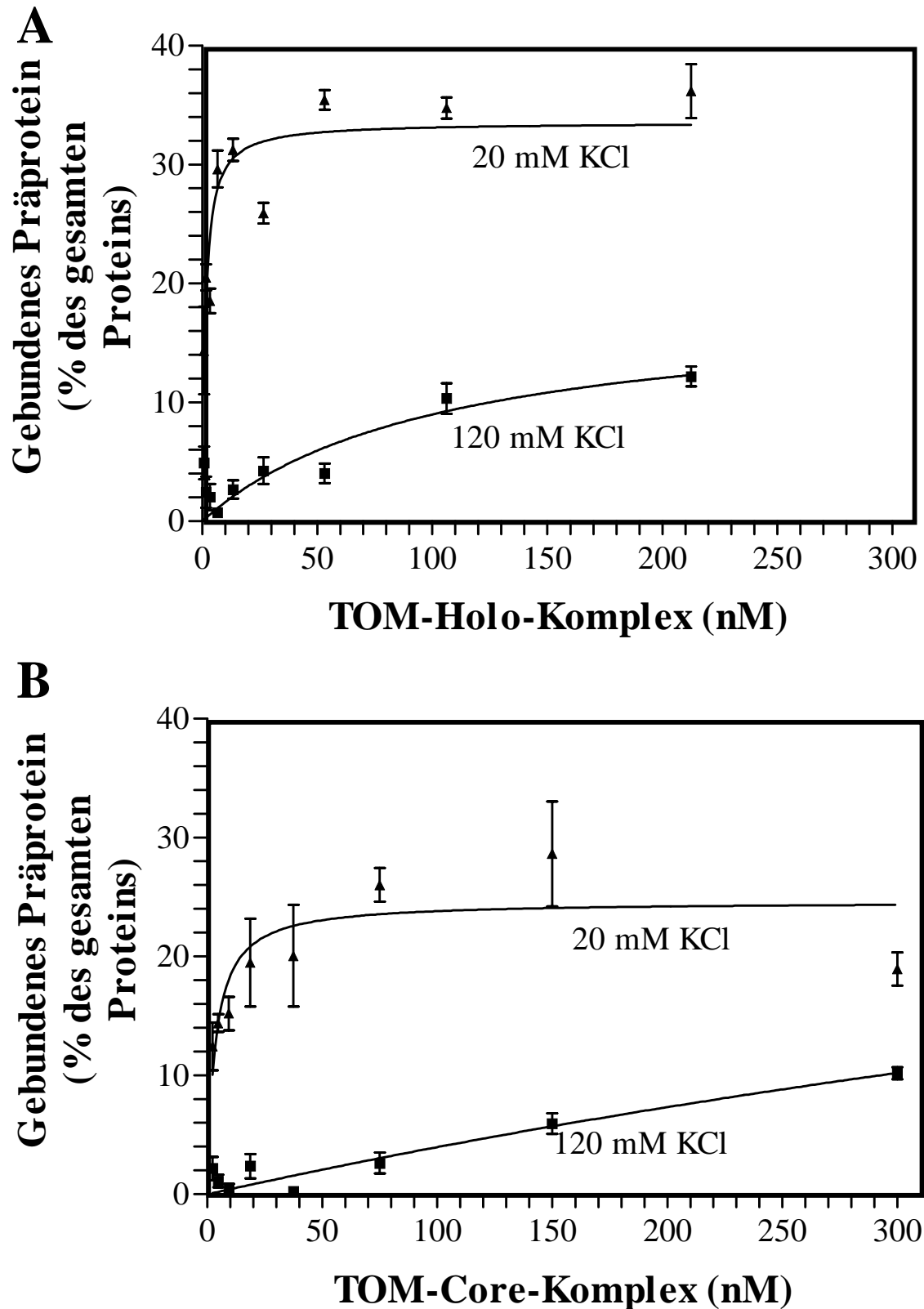


Abb. 24: Die Affinität der Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex hängt von der Ionenstärke ab. Jeweils 6 nM mit TAMRA-5-Maleimid markiertes pSu9-DHFR bzw. DHFR wurden in Puffern, die entweder 20 mM KCl oder 120 mM KCl enthielten mit verschiedenen Mengen an (A) TOM-Holo-Komplex bzw. (B) TOM-Core-Komplex inkubiert. Die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex wurde durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt.

3.4.3. Die Bindung von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Komplex kann nicht erfolgen, wenn das Protein künstlich in gefaltetem Zustand gehalten wird.

Die Notwendigkeit der Entfaltung von Proteinen während der Translokation durch die mitochondriale Außenmembran wird in der Literatur rege diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex und die Insertion in die Importpore mit der Entfaltung des Proteins einhergeht (Mayer et al., 1995, Rapaport et al., 1998). Außerdem ergab die Strukturanalyse des TOM-Komplexes, daß dieser Poren ausbildet, die einen Durchmesser von ca. 2 nm haben. Daraus ergibt sich ebenfalls die Notwendigkeit, Präproteine während ihrer Translokation durch die Außenmembran zu entfalten (Künkele et al., 1998, Hill et al., 1998, Ahting et al., 1999).

In vorliegender Arbeit war es erstmals möglich, mit Hilfe des isolierten TOM-Komplexes zu untersuchen, inwieweit die Entfaltung des Präproteins essentiell für die Bindung an isolierten TOM-Komplex ist.

Dazu wurde pSu9-DHFR vor der Inkubation mit dem TOM-Komplex mit Methotrexat, einem Folsäureanalog, vorinkubiert. Dadurch wurde die DHFR-Domäne in einem stabil gefalteten Zustand gehalten. Dies führt zu einer drastischen Reduktion der Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex (Abb. 25). Die Entfaltung der DHFR-Domäne ist somit essentiell für die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex.

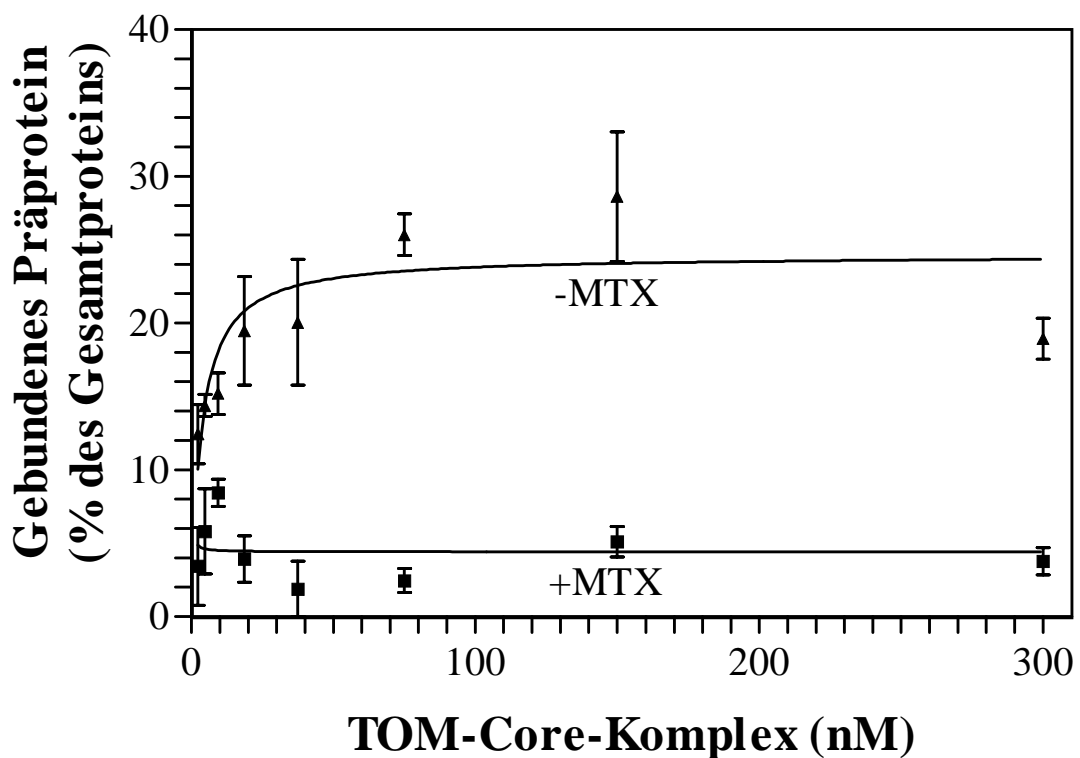
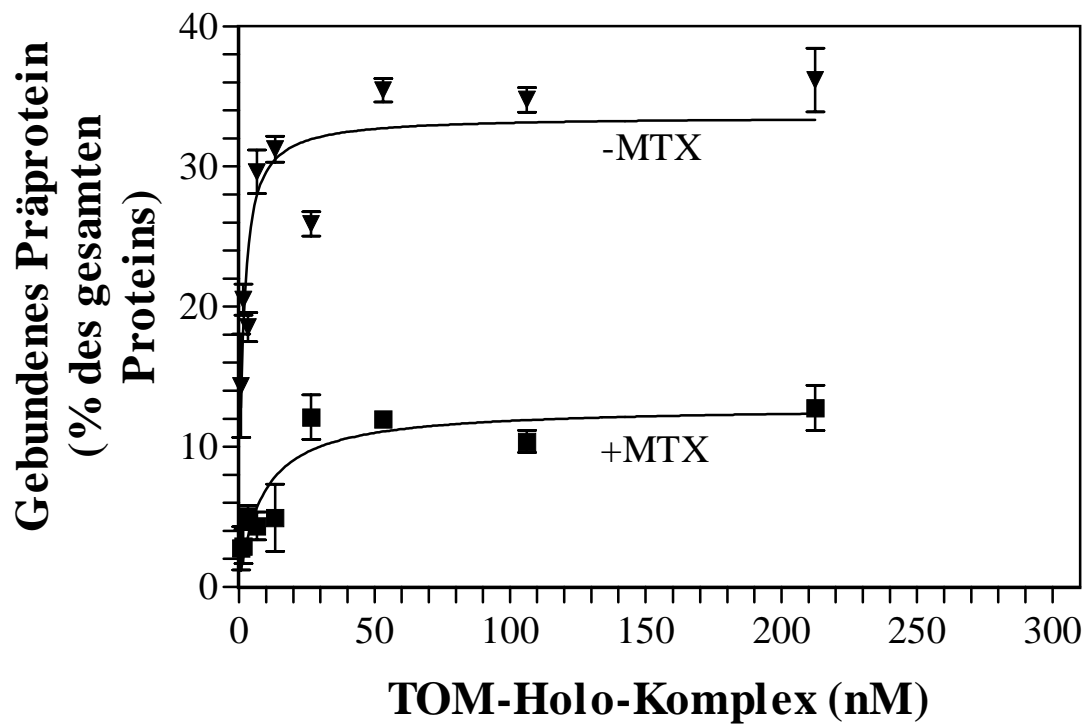


Abb. 24: Die Entfaltung von pSu9-DHFR ist essentiell für die Bindung an den TOM-Komplex. 12 nM pSu9-DHFR wurden mit 1 μ M MTX und 0,5 mM NADPH für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen, das unterschiedliche Mengen (A) TOM-Holo-Komplex, bzw. (B) TOM-Core-Komplex enthielt versetzt. Die Bindung an den TOM-Komplex wurde durch FCS bestimmt.

4. DISKUSSION

4.1. Tom6 und Tom7 im TOM-Komplex von *Neurospora crassa* und anderen

Organismen

Die Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM-Komplex) in *Neurospora crassa* besteht aus mehreren Untereinheiten, von denen zu Beginn dieser Arbeit lediglich Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70 näher charakterisiert waren. In vorliegender Arbeit gelang es, zwei weitere Untereinheiten, Tom6 und Tom7 zu identifizieren und zu charakterisieren.

Dabei wurde die Strategie verfolgt, die Aminosäuresequenz bislang unbekannter Komponenten des TOM-Komplexes durch Edman-Abbau gereinigter Proteine aus isoliertem TOM-Komplex zu bestimmen. Es wurden die cDNA-Sequenz sowie die genomische Sequenz von *TOM6* und *TOM7* bestimmt. In beiden Genen ist der kodierende Bereich der Sequenz durch mehrere Introns unterbrochen.

Die Aminosäuresequenzen von Tom6 und Tom7 umfassen 60 bzw. 53 Aminosäurereste, wobei jeweils die Aminotermini einen hohen Anteil an geladenen Resten enthalten. Beide Proteine besitzen am Carboxyterminus eine potentielle Transmembrandomäne, bestehend aus hydrophoben Aminosäureresten.

Im Zeitraum der Erstellung vorliegender Arbeit wurden die Gene von Tom7 auch in diversen anderen Organismen identifiziert (RA Wilson et al., 1994, Hönlinger et al., 1996, Jansch et al., 1998, RA Hu et al., 2000). Eine vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen von Tom7 zeigt, daß *Neurospora crassa* Tom7 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Tom7 aus anderen Organismen aufweist. Unklar ist die Bedeutung dieser starken Konservierung für die Funktion des TOM-Komplexes. Zumindest in *Saccharomyces cerevisiae* überleben die Zellen die Disruption von *TOM7*, auch die Funktion des TOM-Komplexes ist durch die Disruption kaum beeinträchtigt (Hönlinger et al., 1996).

Im Gegensatz zu Tom7 war Tom6 bislang lediglich in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert worden (Kassenbrock et al., 1993, Alconada et al., 1995). Der Vergleich mit der nun ermittelten Aminosäuresequenz von Tom6 ergibt eine lediglich auf die Transmembrandomäne und den Carboxyterminus beschränkte Sequenzähnlichkeit.

Mit der in der vorliegenden Arbeit verfolgten Strategie gelang es zunächst nicht, das Ortholog von Tom5 im TOM-Komplex von *Neurospora crassa* zu identifizieren. Die *Neurospora crassa* Tom5 repräsentierende Bande auf dem High-Tris-Harnstoffgel (siehe

Abb. 3) enthält zusätzlich ein Abbauprodukt von Tom7. Außerdem ist *Neurospora crassa* Tom5 offenbar nicht zugänglich für die Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau. Daher gelang es erst nach Abschluß der Experimente zu dieser Arbeit, die mögliche Sequenz von *Neurospora crassa* Tom5 durch „Peptide mass fingerprinting“ zu identifizieren. Zwar konnte die Präsenz des identifizierten Proteins im TOM-Komplex von *Neurospora crassa* noch nicht durch unabhängige Methoden bestätigt werden. Da das als *Neurospora crassa* Tom5 identifizierte Protein jedoch eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *Saccharomyces cerevisiae* Tom5 aufweist, ist die Richtigkeit der Identifizierung sehr wahrscheinlich. Somit weist der TOM-Komplex von *Neurospora crassa* auch in Bezug auf Tom5 eine hohe Ähnlichkeit zum TOM-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* auf. Möglicherweise kommt Tom5 eine ähnlich wichtige Rolle bei der Translokation von mitochondrialen Vorstufenproteinen über die Außenmembran zu wie in *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Abschnitt 1.3. (Dietmeier et al., 1997, Dekker et al., 1998)).

4.2. Die Interaktion von Tom6 und Tom7 mit anderen Komponenten des TOM-Komplexes

4.2.1. Tom6 und Tom7 sind Bestandteile des TOM-Core-Komplexes

Wie in Abschnitt 1.2.1.2. bereits beschrieben, besteht der TOM-Komplex aus fest miteinander assoziierten Komponenten, die den TOM-Core-Komplex (Ahting et al., 1999, Dekker et al., 1998) bilden sowie eher lose assoziierten Rezeptorkomponenten. So sind Tom20 und Tom70 nicht Bestandteil des TOM-Core-Komplexes und dissoziieren unter den Bedingungen der Blaunativgelelektrophorese bzw. nach Behandlung des TOM-Komplexes mit Dodecylmaltosid vom hochmolekularen TOM-Komplex ab. Außerdem ist eine Coimmunfällung von Tom70 mit Antikörpern gegen andere Tom-Komponenten nicht möglich (Dekker et al., 1998, Meisinger et al., 2001, vorliegende Arbeit).

Dagegen konnten nach Solubilisierung von OMV mit Digitonin Tom6, Tom7, Tom22 und Tom40 mit hoher Effizienz durch den Tom20-Antikörper präzipitiert werden. Allerdings war es nicht möglich, Tom20 mit Antikörpern gegen diese TOM-Komponenten zu präzipitieren. Somit ist *Neurospora crassa* Tom20 ein fest assoziierter Bestandteil des TOM-Komplexes. Allerdings existiert es offenbar in zwei Formen: in freier und mit dem TOM-Komplex assoziierter Form. Die in *Saccharomyces cerevisiae* erhaltenen Daten bestätigen im Wesentlichen diese Sichtweise. Zwar wurde zunächst postuliert, daß Tom20, ebenso wie Tom70 lediglich peripher mit dem TOM-Komplex assoziiert ist (Dekker et al.,

1998). In späteren Experimenten, die unter anderen Lyse- und Koimmunfällungsbedingungen durchgeführt wurden, zeigte sich jedoch, daß in *Saccharomyces cerevisiae* Tom20 im Gegensatz zu Tom70 ebenfalls in stabil mit dem TOM-Komplex assoziierter Form vorliegt (van Wilpe et al., 1999, Meisinger et al., 2001). Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Assoziation von Tom6 und Tom7 mit dem TOM-Komplex in *Neurospora crassa* zu untersuchen. Mit Hilfe der Coimmunfällung aus Außenmembranvesikeln (OMV) konnte gezeigt werden, daß Tom6 und Tom7 eng mit anderen TOM-Komponenten assoziiert sind, da sie effizient mit Antikörpern gegen Tom22 und Tom40 kopräzipitiert werden können. Da diese Präzipitation auch nach Solubilisierung der OMV mit DDM möglich war, sind Tom6 und Tom7 Bestandteile des TOM-Core-Komplexes. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der Analyse des TOM-Komplexes durch Blaunativgelelektrophorese bestätigt: Unabhängig davon, ob Mitochondrien mit Digitonin, DDM oder Triton X100 solubilisiert wurden, konnten Tom6 und Tom7 zusammen mit Tom22 und Tom40 im hochmolekularen TOM-Komplex detektiert werden. Zwar migrierte der TOM-Komplex nach Solubilisierung der OMV mit Digitonin etwas höher, dies wird jedoch nicht von einer anderen Proteinzusammensetzung, sondern einem höheren Gehalt an Phospholipiden bestimmt (Stan et al., 2000). Der Befund, daß Tom6 und Tom7 auch nach Solubilisierung in Puffer mit 1% Triton X100 Bestandteile des TOM-Core-Komplexes sind, steht im Gegensatz zu den für Tom6 und Tom7 aus *Saccharomyces cerevisiae* veröffentlichten Daten (Dekker et al., 1998). Allerdings wurde in neueren Untersuchungen zur Stabilität des TOM-Komplexes gegenüber dem denaturierenden Einfluss von Harnstoff gezeigt, daß auch *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 und Tom7 Komponenten des TOM-Core-Komplexes sind (Meisinger et al., 2001). Somit stehen die in *Saccharomyces cerevisiae* erhaltenen Daten in Einklang mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit.

4.2.2. Tom6 und Tom7 befinden sich in räumlicher Nähe zu anderen Komponenten des TOM-Core-Komplexes

Durch chemische Quervernetzungsexperimente mit dem Quervernetzer EDC konnte gezeigt werden, daß Tom6 und Tom7 innerhalb des TOM-Komplexes in unmittelbarer Nähe zu Tom40 gelegen sein müssen. Außerdem befindet sich Tom6 in unmittelbarer Nähe zu Tom22. Dagegen konnten keine Quervernetzungsprodukte zwischen Tom22 und Tom40 sowie zwischen Tom7 und Tom22 nachgewiesen werden.

Durch die räumliche Nähe zwischen Tom6 und Tom40 bzw. Tom22 wird die für *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 aufgestellte Hypothese gestützt, wonach Tom6 eine Funktion für die Aufrechterhaltung der Struktur des TOM-Komplexes innehat und als Bindeglied zwischen Tom22 und Tom40 fungiert (Dekker et al., 1998).

Während der Interaktion des TOM-Komplexes mit dem Substrat pSu9-DHFR verändert sich offenbar die Lage von Tom6 in Bezug auf Tom22 und Tom40, der Abstand zu Tom22 und Tom40 ändert sich, wenn pSu9-DHFR an die Importpore gebunden ist. Frühere Experimente unter Bedingungen, bei denen das Substrat lediglich an die Rezeptoren, nicht jedoch an die Importpore gebunden ist, zeigten weiterhin, daß sich in diesem Fall der Abstand zwischen Tom40 und Tom6 ändert (Rapaport et al., 1998). Wahrscheinlich durchläuft der TOM-Komplex während der Präproteinbindung Konformationsänderungen, in deren Folge sich die Lage von Tom6 zu anderen Komponenten des TOM-Core-Komplexes ändert.

4.3. Assemblierung von Tom6 und Tom7 in bereits bestehende TOM-Komplexe

4.3.1. Tom6 und Tom7 werden über den generellen Importweg in den TOM-Komplex assembliert

Die Frage, wie Proteine der mitochondrialen Außenmembran in die Mitochondrien importiert werden, wird für verschiedene Außenmembranproteine unterschiedlich beantwortet. Proteine wie Porin, Tom22, Tom40 und Tom70 benutzen dafür den generellen Importweg (Keil and Pfanner, 1993, Keil et al., 1993, Rapaport and Neupert, 1999, Schlossmann and Neupert, 1995). Dagegen wird angenommen, daß einige Proteine mit nur einem Membrananker, wie Tom20 und Bcl2 unabhängig von Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes importiert werden (Schneider et al., 1991, Nakai et al., 1993, Nguyen et al., 1993). Basierend auf den in *Saccharomyces cerevisiae* erhaltenen Daten schien Tom6 bislang unabhängig vom TOM-Komplex in die Mitochondrien importiert zu werden (Cao and Douglas, 1995). Die Ergebnisse vorliegender Arbeit legen jedoch nahe, daß Tom6, wie auch Tom7, ebenfalls über den generellen Importweg in die Mitochondrien importiert werden. So ist der Import von Tom6 abhängig von den Rezeptoren des TOM-Komplexes, die Konkurrenz mit dem Präprotein pSu9-DHFR bewirkt eine starke Hemmung des Imports von Tom6 und Tom7.

Die unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen zur Untersuchung des Importweges von Tom6 sind möglicherweise der Grund für die derzeit widersprüchliche Datenlage. So wurde in *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt, daß *in vivo* die *tom40-3-ts*-Mutante keinen Einfluss auf den Import von Tom6 hat (Cao and Douglas, 1995). Allerdings führt diese Mutante auch nicht zu einem verminderten Import von Porin, während andere Mutanten, wie die *tom40-2*- und die *tom40-4-ts*-Mutante einen drastisch verschlechterten Import von Porin zur Folge haben (Krimmer et al., 2001). Offenbar ist in der *tom40-3-ts*-Mutante die Struktur des TOM-Komplexes in einer Weise verändert, durch die der Import von Außenmembranproteinen nicht beeinträchtigt ist. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei Verwendung von anderen als der untersuchten *tom40-3-ts*-Mutante ebenfalls einen schlechterer Import von Tom6 registriert worden wäre.

Außerdem diente bei den Experimenten in *Saccharomyces cerevisiae* die Carbonatextraktion als Kriterium für die Untersuchung des Imports von Tom6 *in vitro*. Somit wurde nicht spezifisch die Assemblierung in den TOM-Komplex, sondern lediglich die Insertion des Proteins in Membranen untersucht. Beim Import von Tom70 erfolgt die Membraninsertion ebenfalls unabhängig von Komponenten des TOM-Komplexes, während die Assemblierung abhängig von Komponenten des TOM-Komplexes ist (Schlossmann and Neupert, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse des Imports erstmals nicht die Carbonatextraktion, sondern die Blaunativgelelektrophorese durchgeführt. Dadurch war es möglich, spezifisch die Assemblierung von Tom6 und Tom7 in bereits bestehende TOM-Komplexe zu untersuchen. Diese Methode ist besser geeignet, um den Import von Tom6 und Tom7 in Mitochondrien zu untersuchen.

4.3.2. Der Carboxyterminus von Tom6 ist für die Membraninsertion verantwortlich, der die Transmembrandomäne flankierende aminoternale Bereich vermittelt die Assemblierung in bestehende TOM-Komplexe

Der Carboxyterminus von Tom6 enthält eine konservierte Sequenz, die potentielle Transmembrandomäne. Dieser Bereich der Aminosäuresequenz ist essentiell für die Membraninsertion und Assemblierung von Tom6 in den TOM-Komplex. Zusätzlich ist in *Saccharomyces cerevisiae* noch der aminoternale an die Transmembrandomäne angrenzende Bereich notwendig für die korrekte Assemblierung (Cao and Douglas, 1995, Cao and Douglas, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Befunde für

Neurospora crassa Tom6 bestätigt werden. Dazu wurden Importexperimente unter Verwendung verschiedener DHFR-Tom6-Konstrukte durchgeführt. Die für die korrekte Assemblierung von *Neurospora crassa* Tom6 notwendige Information liegt im Bereich zwischen den Aminosäureresten 13-36. Eine Verkürzung des Aminoterminus um 12 Aminosäuren beeinträchtigte die Assemblierung von Tom6 kaum, während DHFR-Tom6(Δ 36), ein DHFR-Tom6-Konstrukt, bei dem die ersten 36 Aminosäurereste von Tom6 fehlen, nicht mehr in den TOM-Komplex assemblierte.

Damit ergeben sich für Tom6 Gemeinsamkeiten mit anderen Außenmembranproteinen: Im Tom22 befindet sich die Information für die korrekte Assemblierung ebenfalls in unmittelbarer Nachbarschaft zur Transmembrandomäne (Rodriguez-Cousino et al., 1998, Egan et al., 1999). Auch bei anderen Proteinen mit einer am Carboxyterminus gelegenen Transmembrandomäne, wie cytb5, VAMP-1B und Monoaminoxidase ist die Information für den spezifischen Import in Mitochondrien im Bereich des Carboxyterminus lokalisiert (Mitoma and Ito, 1992, Kuroda et al., 1998, Isenmann et al., 1998). Jedoch ist bei diesen Proteinen der carboxyterminal an die Transmembrandomäne angrenzende Bereich der Aminosäuresequenz ausreichend für den spezifischen Import in Mitochondrien, während bei Tom6 und Tom22 das Importsignal auf beiden Seiten der Transmembrandomäne lokalisiert ist. Im Gegensatz zu cytb5 und VAMP-1B, bei denen positiv geladene Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomäne eine wichtige Funktion für den Import in Mitochondrien haben, enthält dieser Bereich von Tom6 keine (in *Saccharomyces cerevisiae*) bzw. nur einen (in *Neurospora crassa*) positiv geladenen Aminosäurerest. Der Austausch dieses Aminosäurerests in *Neurospora crassa* Tom6 gegen Glutamin hatte keinen verminderten Import zur Folge. Somit beruht der Import von Tom6 in Mitochondrien offenbar auf anderen Charakteristika als der von cytb5 und VAMP-1B.

Obwohl DHFR-Tom6(Δ 36) nicht in den TOM-Komplex assembliert wird, interagiert es mit dessen Komponenten, wenn auch mit geringerer Effizienz als DHFR-Tom6. Dies deutet darauf hin, daß Tom6 während des Imports mehrere Stadien durchläuft, darunter die Erkennung durch den TOM-Komplex und die Insertion in die Membran sowie schließlich die Assemblierung in den TOM-Komplex. Offenbar ist der Carboxyterminus von Tom6 ausreichend, um mit den Komponenten des TOM-Komplexes zu interagieren.

Durch weitere Experimente wurde versucht, diese These zu untermauern. Die Carboxytermini und insbesondere die Transmembrandomäne von Tom6 in *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* zeichnen sich durch eine hohe Sequenzähnlichkeit aus. Beim Import von DHFR-Tom6 in Mitochondrien des jeweils anderen Organismus

fand eine Assemblierung in den TOM-Komplex nicht statt. Allerdings bildeten auch die nicht assemblierenden Proteine Translokationsintermediate aus, die unter den Bedingungen der Blaunativgelelektrophorese vom TOM-Komplex abdissoziierten und als an Mitochondrien gebundene Monomere nachweisbar waren. Außerdem konnte durch Coimmunfällung mit Antikörpern gegen TOM-Komponenten nachgewiesen werden, daß auch nicht assemblierende DHFR-Tom6-Konstrukte mit den Komponenten des TOM-Komplexes interagieren. Somit umfasst der Import von Tom6 zwei nicht miteinander gekoppelte Stadien, zunächst die vom Carboxyterminus vermittelte Interaktion mit Komponenten des TOM-Komplexes, und daran anschließend die Assemblierung in den TOM-Komplex, die eine spezifische Interaktion des aminoterminal an die Transmembrandomäne angrenzenden Bereichs mit anderen TOM-Komponenten voraussetzt. Allerdings ist dieser Bereich allein nicht ausreichend für eine korrekte Assemblierung: Das Hybridkonstrukt DHFR-Tom6hyb, bestehend aus dem Carboxyterminus von *Saccharomyces cerevisiae* Tom6 und der aminoterminalen Domäne von *Neurospora crassa* Tom6 bildet zwar Translokationsintermediate, wird jedoch nicht in den *Neurospora crassa* Tom-Komplex assembliert. Eine spezifische Interaktion zwischen der Transmembrandomäne und der aminoterminalen Domäne von Tom6 scheint für die korrekte Assemblierung des Proteins in den TOM-Komplex notwendig zu sein.

4.4. Bindung von Präproteinen an den isolierten TOM-Komplex

Im Gegensatz zum *in vitro*-Import von Präproteinen in Mitochondrien eröffnet die Untersuchung der Bindung von Präproteinen an die mitochondrialen Proteintranslokasen bzw. deren isolierte Komponenten die Möglichkeit, deren Rolle bei der Translokation von Präproteinen und somit den Mechanismus des mitochondrialen Imports insgesamt besser zu verstehen. Bislang wurde lediglich die Bindung von Präproteinen und Peptiden an rekombinant exprimierte und gereinigte Domänen verschiedener Rezeptoren des TOM-Komplexes untersucht (Brix et al., 1997, Komiya et al., 1997 Komiya et al., 1998, Iwata K., 1998). Im Unterschied dazu erfolgte in dieser Arbeit erstmals die Analyse einiger Aspekte der Bindung von Präproteinen an den gesamten TOM-Komplex. Dabei ermöglichte es die Anwendung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) als Nachweismethode, die Interaktion des Präproteins mit dem TOM-Komplex direkt zu untersuchen und eine quantitative Analyse der Bindung durchzuführen. Dabei kann auf eine anschließende Separation des an die TOM-Komponenten gebundenen Präproteins

durch Affinitätschromatographische Methoden u.ä. verzichtet werden. Somit können im Vergleich zu anderen Nachweismethoden bei der FCS Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden, wo alle beteiligten Komponenten frei beweglich sind und nicht eine der Komponenten auf einer Matrix immobilisiert ist.

4.4.1. pSu9-DHFR bindet spezifisch und mit hoher Affinität an den TOM-Komplex

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie nachgewiesen werden, daß das rekombinante Präprotein pSu9-DHFR an den isolierten TOM-Komplex binden kann. Diese Bindung wird hauptsächlich von der pSu9-Präsequenz vermittelt. DHFR ohne die pSu9-Präsequenz wurde nur in geringem Maße an den TOM-Komplex gebunden. Anders als bei Komiya et al. (Komiya et al., 1997) waren jedoch cytosolische Chaperone wie Hsp70 bzw. MSF nicht notwendig für die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex. Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß die Bindung von Präproteinen an die cytosolischen Domänen von Komponenten des TOM-Komplexes auch in Abwesenheit von cytosolischen Chaperonen erfolgt (Brix et al., 1997), (Iwata et al., 1998). Somit ist fraglich, inwieweit cytosolischen Chaperonen eine essentielle Rolle bei der Bindung von Präproteinen an den TOM-Komplex zukommt. Vielmehr scheint deren Bedeutung für den mitochondrialen Import hauptsächlich darin zu bestehen, Präproteine im Cytosol vor Aggregation zu bewahren und in einer importkompetenten Form zu stabilisieren.

Die scheinbaren Affinitätskonstanten für die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex liegen im Bereich 10^{-9} M, somit ist diese Bindung durch eine hohe Affinität gekennzeichnet. Die hier durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersuchte Interaktion von pSu9-DHFR mit dem isolierten TOM-Komplex weist eine höhere Affinität auf als die mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz untersuchte Interaktion von pSu9-DHFR mit den cytosolischen Domänen der Rezeptoren Tom20 ($K_d=47$ nM) und Tom70 ($K_d=110$ nM) (Iwata et al., 1998). Allerdings sind die Analysebedingungen in beiden Arbeiten nicht direkt vergleichbar: Während der Reaktionspuffer in vorliegender Arbeit 20 mM KCl enthielt, wurden die Oberflächenplasmonresonanzexperimente in Gegenwart von 150 mM KCl durchgeführt, was die verminderte Affinität der Bindung von Präproteinen an den TOM-Komplex begründen könnte.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen zur Bindung von pSu9-DHFR an den isolierten TOM-Komplex in Gegenwart von Digitonin durchgeführt, während Iwata et al. auf den Einsatz von Detergentien verzichteten. Es wurde jedoch berichtet, daß einige nichtionische Detergentien die Bindung von Präproteinen an den TOM-Komplex befördern (Schleiff et al., 1997). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch Digitonin als nichtionisches Detergens einen Einfluss auf die Bindung von Präproteinen an den TOM-Komplex hat.

Schließlich repräsentieren die bei Iwata et al. verwendeten cytosolischen Domänen von Tom20 und Tom70 lediglich die Rezeptoren des TOM-Komplexes, während in der vorliegenden Arbeit der gesamte TOM-Komplex für die Untersuchung der Bindung verwendet wurde. Dies könnte eine stabilere Bindung des Präproteins und eine höhere Bindungsaffinität zur Folge haben.

Die hier mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sowie parallel zu dieser Arbeit mit anderen Analysemethoden (Stan et al., 2000) untersuchte Affinität der Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Core-Komplex, der kein Tom20 und Tom70 enthält ist vergleichbar mit der Affinität der Bindung an den TOM-Holokomplex. Offenbar wird die hier nachgewiesene Bindung des Präproteins pSu9-DHFR an den TOM-Komplex nicht von Tom20 und Tom70, sondern von Komponenten des TOM-Core-Komplexes verursacht. Dies bestätigt die Auffassung, daß die Bindung von Präproteinen an die Rezeptoren Tom20 und Tom70 durch eine niedrigere Affinität und Stabilität gekennzeichnet ist als die Bindung an Komponenten des TOM-Core-Komplexes (Komiya et al., 1998, Rapaport et al., 1998).

4.4.2. Charakter der Bindung, Schlussfolgerungen über den Mechanismus der Translokation von Präproteinen über die Außenmembran

Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem pSu9-DHFR an den TOM-Komplex konnte durch Zugabe von unmarkiertem pSu9-DHFR gehemmt werden. Dieser Effekt wird unabhängig davon erreicht, in welcher Reihenfolge fluoreszenzmarkiertes und unmarkiertes pSu9-DHFR mit dem TOM-Komplex inkubiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex reversibel ist. Andererseits könnte die uneingeschränkte Reversibilität der Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex auch ein Hinweis darauf sein, daß die Interaktion des Präproteins mit anderen

Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerien, z.B. Tim23 oder Faktoren des Intermembranraums wahrscheinlich nicht notwendig ist, um an den TOM-Komplex gebundene Präproteine vom Komplex zu lösen.

Wie der Vergleich der IC_{50} -Konstanten zeigt, ist die Hemmung der Bindung von fluoreszenzmarkiertem pSu9-DHFR an den TOM-Komplex durch unmarkiertes pSu9-DHFR effizienter als die Hemmung der Bindung von Präproteinen an cytosolische Rezeptordomänen von Tom20, Tom22 und Tom70 durch verschiedene Peptide (Brix et al., 1997, Komiya et al., 1997). Dieser Unterschied liegt darin begründet, daß die verwendeten Peptide nur einen Teil einer mitochondrialen Präsequenz umfassen. Bei der Bindung eines Präproteins an den TOM-Komplex findet jedoch nicht nur eine Interaktion der Präsequenz, sondern auch des reifen Teils des zu importierenden Präproteins mit den Komponenten des Komplexes statt (Rapaport et al., 1998, Kanamori et al., 1999).

Die Bindung von pSu9-DHFR sowohl an den TOM-Holokomplex, als auch an den TOM-Core-Komplex ist sehr sensitiv gegenüber höheren Ionenstärken: Schon in Gegenwart von 120 mM KCl wird die Bindung stark gehemmt. Dies bestätigt die bereits früher gemachte Beobachtung, daß höhere Salzkonzentrationen zu einer Hemmung des Imports von Präproteinen in Mitochondrien bzw. bei der Bindung von Präproteinen an cytosolische Domänen der Rezeptoren des TOM-Komplexes führen. Somit spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Präproteins mit den Komponenten des TOM-Komplexes (Haucke et al., 1995, Mayer et al., 1995, (Brix et al., 1997, Komiya et al., 1997, Schleiff et al., 1997).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Bindung von Präproteinen an den TOM-Komplex ist die Entfaltung des Präproteins während des Durchgangs durch die vom TOM-Komplex gebildete Importpore. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führte die Zugabe von Methotrexat, welches die Entfaltung des Präproteins verhindert zu einer drastisch verminderten Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex. Somit ist die Entfaltung des Präproteins essentiell für eine stabile Interaktion der Präproteine mit dem TOM-Komplex. Dieser Befund bestätigt die These, daß die Interaktion der positiv geladenen Präsequenz mit negativ geladenen Domänen der Komponenten des TOM-Komplexes nicht ausreichend für die Translokation eines Präproteins über die mitochondriale Außenmembran ist. Vielmehr kommt der Interaktion von Teilen des reifen Proteins mit dem TOM-Komplex ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Translokation über die Außenmembran zu (siehe auch Rapaport et al., 1998).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteintranslokase in der mitochondrialen Außenmembran (TOM-Komplex) ist verantwortlich für die Erkennung von mitochondrialen Präproteinen und deren Translokation über die mitochondriale Außenmembran. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Klonierung und Charakterisierung von bislang nicht identifizierten Komponenten des TOM-Komplexes in *Neurospora crassa* sowie in der Charakterisierung der Bindung von Präproteinen an den isolierten TOM-Komplex. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt: Es wurden zwei bislang unbekannte, ca. 6 bzw. 7 kDa grosse Komponenten des *Neurospora crassa* TOM-Komplexes, Tom6 und Tom7, identifiziert. Deren Gene wurden mittels Durchmusterung einer cDNA-Phagenbibliothek sowie einer sortierten genomischen DNA-Bibliothek identifiziert und sequenziert. Das *TOM6*-Gen umfasst drei Exons und zwei Introns, während das *TOM7*-Gen vier Exons und drei Introns enthält.

Die Aminosäuresequenzen von *Neurospora crassa* Tom6 und Tom7 weisen eine hohe Ähnlichkeit zu denen von Tom6 und Tom7 aus anderen Organismen auf. Dabei erstreckt sich der homologe Bereich bei Tom7 über die gesamte Aminosäuresequenz, während er bei Tom6 auf den carboxyterminalen Bereich beschränkt ist. Für beide Proteine wurde jeweils eine potentielle Transmembrandomäne an ihrem Carboxyterminus vorausgesagt.

Sowohl Tom6, als auch Tom7 sind integrale Bestandteile des TOM-Core-Komplexes und befinden sich in engem Kontakt zu anderen Komponenten des TOM-Komplexes. Es konnte mit Hilfe von chemischen Quervernetzungsexperimenten gezeigt werden, daß sich Tom6 und Tom7 im TOM-Komplex von *Neurospora crassa* in direkter räumlicher Nähe zu Tom 40 befinden. Außerdem konnte ein direkter Kontakt zwischen Tom6 und Tom22 nachgewiesen werden, welcher durch Bindung des Präproteins pSu9-DHFR moduliert wird.

Ein weiterer Schwerpunkt bei der Charakterisierung von *Neurospora crassa* Tom6 und Tom7 bestand in der Untersuchung des Imports dieser Proteine in Mitochondrien sowie deren Assemblierung in bereits bestehende TOM-Komplexe. Sowohl Tom6, als auch Tom7 konnten *in vitro* in Mitochondrien importiert werden und in bereits bestehende TOM-Komplexe assemblieren. Dabei benutzen sie teilweise den generellen Importweg von Präproteinen in Mitochondrien. Der Import von Tom6 umfasst zwei nicht miteinander gekoppelte Schritte. Zunächst findet eine vom Carboxyterminus vermittelte Interaktion mit Komponenten des TOM-Komplexes statt, es folgt die Assemblierung in den TOM-

Komplex. Die Assemblierung von Tom6 in den TOM-Komplex setzt eine spezifische Interaktion des aminoterminal an die Transmembrandomäne angrenzenden Bereichs mit anderen TOM-Komponenten voraus. Daneben ist eine Interaktion der Transmembrandomäne von Tom6 mit dem aminoterminal an die Transmembrandomäne angrenzenden Bereich von Tom6 essentiell für die korrekte Assemblierung von Tom6 in den TOM-Komplex. Im Gegensatz zu anderen Außenmembranproteinen kommt bei *Neurospora crassa* Tom6 positiv geladenen Aminosäuren im an die Transmembrandomäne angrenzenden Bereich keine Bedeutung für den Import zu.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung einiger Aspekte der Bindung des mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Präproteins pSu9-DHFR an den isolierten TOM-Komplex unter Anwendung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Die Bindung dieses Präproteins an den TOM-Komplex ist reversibel und wird spezifisch von der Präsequenz vermittelt. Die apparenten Bindungskonstanten betragen 1,3 nM für den TOM-Holokomplex sowie 3,4 nM für den TOM-Core-Komplex.

Ein wichtiges Merkmal der Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex sind elektrostatische Wechselwirkungen, da eine Erhöhung der Ionenstärke im Reaktionspuffer eine drastische Verminderung der Bindung zur Folge hatte. Des Weiteren geht die Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex einher mit der Entfaltung der DHFR. Eine Verhinderung der Entfaltung der DHFR durch Komplexbildung mit Methotrexat führte zu einer stark verminderten Bindung von pSu9-DHFR an den TOM-Komplex.

6. 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 Bauer, M. (1999). Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* **18**, 313-319.

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.

Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A., and Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol* **15**, 6196-205.

Arretz, M., Schneider, H., Guiard, B., Brunner, M., and Neupert, W. (1994). Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **269**, 4959-67.

Arretz, M., Schneider, H., Wienhues, U., and Neupert, W. (1991). Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed Biochim Acta* **50**, 403-12.

Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D., and Schatz, G. (1990). A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature* **348**, 605-609.

Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. and Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**, 25-31.

Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., and Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**, 33-41.

Beasley, E.M., Muller, S., and Schatz, G. (1993). The signal that sorts yeast cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space contains three distinct functional regions. *EMBO J* **12**, 2303-11.

Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., and M., F. (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**, 1085-93.
- Bird, P., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1987). Translocation in yeast and mammalian cells: not all signal sequences are functionally equivalent. *J Cell Biol* **105**, 2905-14.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., and Lithgow, T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J* **14**, 6318-26.
- Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B.S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. and Schatz G. (1994). A mitochondrial homologue of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.* **13**, 1998-2006.
- Bomer, U., Pfanner, N. and Dietmeier, K. (1996). Identification of a third yeast mitochondrial Tom protein with tetratricopeptide repeats. *FEBS Lett.* **382**, 153-158.
- Brix, J., Dietmeier, K., and Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem* **272**, 20730-20735.
- Bruchez, J.J.P., Eberle, J., and Russo, V.E.A. (1993). Regulatory sequences in the transcription of *Neurospora crassa* genes: CAAT box, TATA box, Introns, Poly(A) tail formation sequences. *Fungal Genetics Newsletter* **40**, 89-96.
- Köhler, C.M. (2000). Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* **476**, 27-31.
- Cao, W. and Douglas, M.G. (1995). Biogenesis of ISP6, a small carboxyl-terminal anchored protein of the receptor complex of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **270**, 5674-5679.
- Cao, W. and Douglas, M.G., (1996). Specific targeting of ISP6 to mitochondria is mediated by sequences other than its amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 457-461.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L. and Horwich, A.L. (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**, 620-5.
- Court, D.A., Kleene, R., Neupert, W. and Lill, R. (1996). Role of the N- and C-termini of porin in import into the outer membrane of *Neurospora* mitochondria. *FEBS Lett* **390**, 73-7.
- Court, D.A., Nargang, F.E., Steiner, H., Hodges, R.S., Neupert, W. and Lill, R. (1996). Role of the intermembrane-space domain of the preprotein receptor Tom22 in protein import into mitochondria. *Mol Cell Biol* **16**, 4035-42.

- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
- Dekker, P., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993). Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett* **330**, 66-70.
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J. and Pfanner, N. (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J* **16**, 5408-19.
- Dekker, P.J., Muller, H., Rassow, J. and Pfanner, N. (1996). Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 535-538.
- Dekker, P.J.T., Ryan, M.T., Brix, J., Müller, H., Hönlinger, 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.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B. and Lill, R.. (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **96**, 11752-11757.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J.T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. and Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* **388**, 195-200.
- 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.
- Egan, B., Beilharz, T., George, R., Isenmann, S., Gratzer, S., Wattenberg, B. and Lithgow, T. (1999). Targeting of tail-anchored proteins to yeast mitochondria in vivo. *FEBS Lett* **451**, 243-248.
- Ehrenberg M. and Rigler, R. (1974). Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *J.Chem.Phys:* **4**, 390-410.
- Elson, E.L. and Madge, D. (1974). Fluorescence korrelation spectroscopy(I). Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers* **13**, 1-27.
- Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993). MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol* **122**, 1003-12.
- 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.
- Fivash, M., Towler, E.M. and Fisher, R.J. (1998). BIAcore for macromolecular interaction. *Curr. Biol.* **9**, 97-101.

Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J* **15**, 479-87.

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.

Glick, B.S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* **80**, 11-4.

Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T. and Mihara, K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J* **13**, 5146-54.

Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995). Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* **376**, 705-709.

Hamajima, S., Sakaguchi, M., Mihara, K., Ono, S. and Sato, R. (1988). Both amino- and carboxy-terminal portions are required for insertion of yeast porin into the outer mitochondrial membrane. *J.Biochem. (Tokyo)* **104**, 362-367.

Hammen P.K. and Weiner, H. (2000). Structure of the cytosolic domain of TOM5, a mitochondrial import protein. *FEBS Lett.* **468**, 101-104.

Harkness, T.A., Nargang, F.E., van der Klei, I., Neupert, W. and Lill, R. (1994). A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol* **124**, 637-648.

Hartl, F.U., Pfanner, N., Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* **988**, 1-45.

Haucke, V., Lithgow, T., Rospert, S., Hahne, K. and Schatz, G. (1995). The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 5565-5570.

Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U. and Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* **53**, 795-806.

Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein import machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **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.

Herrmann, R.G. (1997). Eukaryotism, toward a new interpretation. In *Eukaryotism and symbiosis*, Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. and Schwemmler, W., ed. (Heidelberg, New York: Springer), pp. 73-118.

- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516-521.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brutsch, H., and Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J* **9**, 3191-3200.
- Höhfeld J. and Hartl, U. (1994). Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **126**, 305-315.
- Hönlinger, A., Bömer, 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**, 2125-37.
- Hönlinger, A., Kübrich, M., Moczko, M., Gärtner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., Jacquet, M. and Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins. *Mol Cell Biol* **15**, 3382-3389.
- Horst, M., Hilfiker Rothenfluh, S., Oppliger, W. and Schatz, G. (1995). Dynamic interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria. *EMBO J* **14**, 2293-7.
- Hurt, E.C., Muller, U. and Schatz, G. (1985). The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane. *EMBO J* **4**, 3509-18.
- Isenmann, S., Khew-Goodall, Y., Gamble, J., Vadas, M. and Wattenberg, B.W. (1998). A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1649-1660.
- Iwahashi, J., Yamazaki, S., Komiya, T., Nomura, N., Nishikawa, S., Endo, T. and Mihara, K. (1997). Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. *J Biol Chem* **272**, 18467-18472.
- Iwata, K. and Nakai, M. (1998). Interaction between mitochondrial precursor proteins and cytosolic soluble domains of mitochondrial import receptors, Tom20 and Tom70, measured by surface plasmon resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 648-652.
- Jamet Vierny, C., Contamine, V., Boulay, J., Zickler, D. and Picard, M. (1997). Mutations in genes encoding the mitochondrial outer membrane proteins Tom70 and Mdm10 of *Podospira anserina* modify the spectrum of mitochondrial DNA rearrangements associated with cellular death. *Mol Cell Biol* **17**, 6359-66.
- Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1998). Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 17251-17257.

- Jensen, R.E., Emtage, J.L.T., Ryan, K. and Kalish, J. (1993). MAS6 encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import: *Am. Soc. Cell Biol.*
- Johnson, A.E. (1997). Protein Translocation at the ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends Cell Biol.* **7**, 90-95.
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M. and Mihara, K. (2000). Characterization of the signal that directs tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* **151**, 277-288.
- Kanamori, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Shin, I., Schultz, P. and Endo, T. (1999). Uncoupling of transfer of the presequence and unfolding of the mature domain in precursor translocation across the mitochondrial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3634-3639.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. and Douglas, M.G. (1993). Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J* **12**, 3023-34.
- Keil, P. and Pfanner, N. (1993). Insertion of MOM22 into the mitochondrial outer membrane strictly depends on surface receptors [published erratum appears in *FEBS Lett* 1993 Jul 12;326(1-3):299]. *FEBS Lett* **321**, 197-200.
- Keil, P., Weinzierl, A., Kiebler, M., Dietmeier, K., Söllner, T. and Pfanner, N. (1993). Biogenesis of the mitochondrial receptor complex. Two receptors are required for binding of MOM38 to the outer membrane surface. *J Biol Chem* **268**, 19177-19180.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **139**, 1663-1675.
- Kerscher O., Sepuri, N.B. and Jensen, R.E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **11**, 103-116.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I. J., Pfanner, N. and Neupert, W. (1993). The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* **74**, 483-492.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Sollner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature* **348**, 610-616.
- Klösgen, R. B. (1997). Protein transport into and across the thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **38**, 1-9.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. and Schatz, G. (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 2141-2146.

- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K.. (1998). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1187-1193.
- Köhler, 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**, 369-73.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. and Mihara, K. (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO-J* **17**, 3886-98
issn: 0261-4189.
- Komiya, T., Rospert, S., Schatz, G. and Mihara, K. (1997). Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *EMBO J* **16**, 4267-4275.
- Komiya, T., Sakaguchi, M. and Mihara, K. (1996). Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *Embo J* **15**, 399-407.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E. and Pfanner, N. (2001). Biogenesis of Porin of the Outer Mitochondrial Membrane Involves an Import Pathway via Receptors and the General Import Pore of the TOM Complex. *J. Cell Biol.* **152**, 289-300.
- Kronidou, N.G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. and Horst, M.S.O. (1994). Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12818-12822.
- Künkele, 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**, 1009-19.
- Künkele, K.P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F.E., Henry, J.P., Neupert, W., Lill, R. and Thieffry, M. (1998). The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem* **273**, 31032-9.
- Kuroda, R., Ikenoue, T., Honsho, M., Tsujimoto, S., Mitoma, J.Y. and Ito, A. (1998). Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. *J. Biol. Chem.*, 31097-31102.

- Kyhse Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J-Biochem-Biophys-Methods* **10**, 203-9 issn: 0165-022x.
- Larsson, N.G. and Luft, R.. (1999). Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett.* **455**, 199-202.
- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W. and Stuart, R. A. (1999). The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J. Biol. Chem.* **274**, 20937-20942.
- Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S. and Schatz, G. (1994). The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11973-7.
- Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. and Meijer, M. (1992). MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *Embo J* **11**, 3619-28.
- Maarse, A.C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. and Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *Febs Lett* **349**, 215-21.
- Matouschek, A., Azem, A., Ratliff, K., Glick, B.S., Schmid, K. and Schatz, G. (1997). Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein import. *EMBO J* **16**, 6727-36.
- Mayer, A., Lill, R. and Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol* **121**, 1233-1243.
- Mayer, A., Nargang, F.E., Neupert, W. and Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J* **14**, 4204-11.
- Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995). Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **270**, 12390-7.
- Mayer, A., Neupert, W., Lill, R. and Matlin, K.S. (1995). Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell* **80**, 127-37.
- McBride, H. M., Millar, D.G., Li, J.M. and Shore, G.C. (1992). A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **119**, 1451-7.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable tom40-tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol.Cell Biol.* **21**, 2337-2348.

- Meisinger, C., Brix, J., Model, K., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (1999). The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: receptors and a general import pore. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 817-824.
- Mihara, K. (2000). Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane. *Bioessays* **22**, 364-371.
- Mihara, K. and Omura, T. (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria - the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol* **6**, 104-108.
- Millar, D.G. and Shore, G.C. (1996). Signal anchor sequence insertion into the outer mitochondrial membrane. Comparison with porin and the matrix protein targeting pathway. *J-Biol-Chem* **271**, 25823-9.
- Mitoma J. and Ito, A. (1992). Mitochondrial targeting signal of rat liver monoamine oxidase B is located at its carboxy terminus. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 20-24.
- Moczko, M., Ehmann, B., Gartner, F., Honlinger, A., Schafer, E. and Pfanner, N. (1994). Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem* **269**, 9045-51.
- Moczko, M., Gartner, F. and Pfanner, N. (1993). The protein import receptor MOM19 of yeast mitochondria. *Febs Lett* **326**, 251-4.
- 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.
- Nakai, M., Kinoshita, K. and Endo, T. (1995). Mitochondrial receptor complex protein. The intermembrane space domain of yeast MAS17 is not essential for its targeting or function. *J Biol Chem* **270**, 30571-5.
- Nakai, M., Takeda, A., Cleary, M.L. and Endo, T. (1993). The bcl-2 protein is inserted into the outer membrane but not into the inner membrane of rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 233-9.
- Nargang, F.E., Künkele, K.P., Mayer, A., Ritzel, R.G., Neupert, W. and Lill, R. (1995). 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J* **14**, 1099-1108.
- Nargang, F.E., Rapaport, D., Ritzel, R.G., Neupert, W. and Lill, R. (1998). Role of the negative charges in the cytosolic domain of TOM22 in the import of precursor proteins into mitochondria. *Mol-Cell-Biol* **18**, 3173-81.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**, 863-917.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* **268**, 25265-25268.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1989). Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4340-4.
- Orbach, M. (1994). A cosmid with a HyR marker for fungal library construction and screening. *Gene* **150**, 159-162.
- 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.
- Pfaller, R., Pfanner, N. and Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. Bypass of proteinaceous surface receptors can occur with low specificity and efficiency. *J Biol Chem* **264**, 34-39.
- Pfaller, R., Steger, H.F., Rassow, J., Pfanner, N. and Neupert, W. (1988). Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J Cell Biol* **107**, 2483-90.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K. and Shore, G.C. (1996). Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem Sci* **21**, 51-2.
- Pfanner, N., and Meijer, M. (1995). Protein sorting. Pulling in the proteins. *Curr Biol* **5**, 132-5.
- RA Hu, R.M., Han, Z.G., Song, H.D., Peng, Y.D., Huang, Q.H., Ren, S.X., RA Gu, Y.J., Huang, C.H., Li, Y.B., Jiang, C.L., Fu, G., Zhang, Q.H., RA Gu, B.W., Dai, M., Mao, Y.F., Gao, G.F., Rong, R., Ye, M., Zhou, J., RA Xu, S.H., Gu, J., Shi, J.X., Jin, W.R., Zhang, C.K., Wu, T.M., RA Huang, G.Y., Chen, Z., Chen, M.D. and Chen, J.L. (2000). Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal RT axis and full-length cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9543-9548.
- RA Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Ropra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Sims, M., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonnhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterson, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J. and Wohldman, P. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. RT elegans*. *Nature* **368**, 32-38.
- 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.

- Rapaport, D., Künkele, K. P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F. E., Neupert, W. and Lill, R. (1998). Dynamics of the TOM Complex of Mitochondria during Binding and Translocation of Preproteins. *Mol Cell Biol* **18**, 5256-5262.
- Rapaport, D. and Neupert, W. (1999). Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J. Cell Biol.* **146**, 321-331.
- Rapaport, D., Neupert, W. and Lill, R. (1997). Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *J Biol Chem* **272**, 18725-31.
- Rapaport D., Mayer A., Neupert W. and Lill, R. (1998). *cis* and *trans* Sites of the TOM Complex of Mitochondria in Unfolding and Initial Translocation of Preproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 8806-8813.
- Rapaport, D., Taylor, R.D., Käser, M., Langer, T., Neupert, W. and Nargang, F.E. (2001). Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **12**, 5
- Rapaport, T.A., Jungnickel, B. and Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**, 271-303.
- 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.
- Rodriguez-Cousino, N., Nargang, F.E., Baardman, R., Neupert, W., Lill, R. and Court, D.A. (1998). An import signal in the cytosolic domain of the Neurospora mitochondrial outer membrane protein TOM22. *J Biol Chem* **273**, 11527-32.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., Allison, D.S. and Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J* **7**, 649-53.
- Rowley, N., Prip Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. and Neupert, W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell* **77**, 249-59.
- Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S. and Jensen R.E. (1994). SMS1, a high-copy suppressor of the yeast *mas6* mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* **5**, 529-538.
- Ryan, M.T., Müller, H. and Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J.Biol.Chem.* **274**, 20619-27.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*, 2nd Edition, C. Nolan, ed. (Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press).

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467.
- Schatz, G. (1997). Just follow the acid chain. *Nature* **388**, 121-122.
- Scherer P.E., Manning.-Krieg, U.C., Jenö, P., Schatz, G. and Horst, M. (1992). Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 11930-11934.
- Schleiff, E., Shore, G. and Goping, I. (1997). Interactions of the human mitochondrial protein import receptor, hTom20, with precursor proteins in vitro reveal pleiotropic specificities and different receptor domain requirements. *J Biol Chem.* **272**, 17784-17789.
- Schleiff, E., Silvius, J.R. and Shore, G.C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell. Biol.* **145**, 973-978.
- Schleiff, E. and Turnbull, J.L. (1998). Functional and structural properties of the mitochondrial outer membrane receptor Tom20. *Biochemistry* **37**, 13043-13051.
- Schleyer, M. and Neupert, W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* **43**, 339-50.
- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N. and Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J Biol Chem* **269**, 11893-11901.
- Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W. and Court, D.A. (1996). Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J Biol Chem* **271**, 17890-17895.
- Schlossmann, J. and Neupert, W. (1995). Assembly of the preprotein receptor MOM72/MAS70 into the protein import complex of the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **270**, 27116-27121.
- Schneider, H., Sollner, T., Dietmeier, K., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Trulzsch, B., Neupert, W. and Pfanner, N. (1991). Targeting of the master receptor MOM19 to mitochondria. *Science* **254**, 1659-62.
- Schneider, H.C., Westermann, B., Neupert, W., and Brunner, M. (1996). The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *EMBO J.* **15**, 5796-5803.
- 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.
- Schwarz, E., Seytter, T., Guiard, B. and Neupert, W. (1993). Targeting of cytochrome b2 into the mitochondrial intermembrane space: specific recognition of the sorting signal. *EMBO J.* **12**, 2295-2302.

Segui-Real, B., Kispal, G., Lill, R. and Neupert, W. (1993). Functional independence of the protein translocation machineries in mitochondrial outer and inner membranes: passage of preproteins through the intermembrane space. *EMBO J.* **12**, 2211-2218.

Sharrocks, A.D. (1994). A T7-expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene* **138**, 105-108.

Shore, G.C., McBride, H.M., Millar, D.G., Steenaart, N.A., and Nguyen, M. (1995). Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur.J. Biochem.* **227**, 9-18.

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.

Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**, 912-5.

Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. and Neupert, W. (1989). MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* **59**, 1061-70.

Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* **62**, 107-15.

Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W. and Pfanner, N. (1992). Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature* **355**, 84-87.

Stan T., Ahting U., Dembowski M., Kunkele K.P., Nussberger S., Neupert W. and Rapaport, D. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J.* **19**, 4895-4902.

Steenaaart, N.A., Silvius, J.R. and Shore, G.C. (1996). An amphiphilic lipid-binding domain influences the topology of a signal-anchor sequence in the mitochondrial outer membrane. *Biochemistry* **35**, 3764-3771.

Steger, H.F., Sollner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K.A., Pfaller, R., Trulzsch, K.S., Tropschug, M., Neupert, W. and Pfanner, N. (1990). Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J Cell Biol* **111**, 2353-63.

Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995). Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem* **270**, 22842-9.

Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A. and Mihara, K. (2000). Characterization of rat TOM40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 37930-37936.

- Szabo, A., Stolz, L. and Granzow, R. (1995). Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Op. Struct. Biol.* **5**, 699-705.
- Theg, S.M. and Scott, S.V. (1993). Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol* **3**, 186-190.
- Tokatlidis, K. and Schatz, G. (1999). Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J. Biol. Chem* **274**, 35285-35288.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* **76**, 4350-4.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria [see comments]. *Science* **266**, 1250-3.
- 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.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **5**, 1335-1342.
- von Heijne, G., Stepphun, J. and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545.
- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. and Pfanner, N. (1999). Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta:* **1422**, 235-254.
- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. and Pfanner, N. (1999). Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 235-254.
- Westermann, B., Gaume, B., Herrmann, J.M., Neupert, W. and Schwarz, E. (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 7063-71.
- Westermann, B., Prip Buus, C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *Embo J* **14**, 3452-60.
- Whately, F.R. (1981). The establishment of mitochondria: Paracoccus and Rhodospseudomonas. *Ann. NY Acad.Sci.* **361**, 330-340.
- Yano, M., Hoogenraad, N., Terada, K. and Mori, M. (2000). Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7205-7213.

7. DANKSAGUNG

Während meiner Doktorandenzeit habe ich viele Leute kennen und schätzen gelernt, denen ich an dieser Stelle ein ganz herzliches „Danke!“ sagen möchte für ihre Hilfe und Unterstützung, auf die ich mich zu jeder Zeit verlassen konnte.

Zuallererst möchte ich natürlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert danken, der es mir überhaupt erst ermöglichte, diese Doktorarbeit durchzuführen. Insbesondere danke ich ihm für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, sein Interesse an meiner Arbeit - insbesondere an der Existenz eines bestimmten kleineren Biomoleküls - sowie sein unermüdliches Bestreben, alle Mitarbeiter des Instituts zu, Höchstleistungen zu motivieren.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger, der bereit war, meine Dissertation an der Fakultät für Biologie zu vertreten und mir die Gelegenheit gab, im Rahmen eines Gastvortrags am Botanischen Institut der LMU über meine Arbeit zu berichten.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Betreuern, Dr. Holger Prokisch und Dr. Doron Rapaport sowie bei Prof. Dr. Roland Lill bedanken, die mit vielen wertvollen Tips, guten Ideen sowie durch zahlreiche interessante Diskussionen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch danke ich den anderen Arbeitsgruppenleitern, Dr. Rosemary A. Stuart, Dr. Thomas Langer, Dr. Michael Brunner, Dr. Hannes Herrmann, Dr. Benedikt Westermann und Dr. Stephan Nußberger: ihr Interesse und die Bereitschaft, auch außerhalb der Laborseminare über meine Arbeit und die daraus resultierenden Probleme zu diskutieren haben mir oft weitergeholfen.

Viele Experimente dieser Arbeit waren nur durch die Kooperation mit Forschern außerhalb des Instituts möglich. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Prof. Dr. Frank Nargang für den „Service“ rund um *Neurospora crassa* sowie bei Achim Brinker und Dr. Mannajit Hartl für die Ermöglichung der BIACORE-Experimente am Max-Planck-Institut für Biochemie bedanken. Mein Dank gilt auch Dr. Klaus-Peter Künkele, u.a. für die Unterstützung bei den Arbeiten an der „Confocor“ bei Roche Diagnostics in Penzberg an so manchem Wochenende.

Weiter möchte ich ganz herzlich den TA´s danken, die mich zu verschiedenen Zeitpunkten tatkräftig bei meiner Arbeit unterstützt haben. Neben Petra Heckmayer, Ilona Dietze und Tina Weidgans gilt hier mein Dank vor allem Stefanie Neubauer, die mir zuliebe im Labor

sogar auf das Hören ihres bevorzugten Radiosenders verzichtete und mir somit nicht nur durch ihren großen Fleiß und ihre sehr gute Arbeit eine große Hilfe war. In diesem Zusammenhang geht ein herzliches „Dankeschön“ auch an Frau Braun, die nicht nur für optimale Wachstumsbedingungen unserer Kulturen, sondern auch für ein optimales Betriebsklima im Großen Labor Sorge trug.

Nicht vergessen möchte ich all die Leute, ohne die ein großes Institut nicht funktionieren würde: die Mitarbeiter der Werkstatt, die kleine Reparaturen immer schnell und unkonventionell erledigten und mir so eine große Hilfe in meiner Nebentätigkeit als Geräteverantwortlichem waren, die Mitarbeiterinnen des Hasenstalls, die Spülfrauen (und hier ganz besonders Frau Köber!), Herrn Beer, dem ich so manches Paket aufgebürdet habe und nicht zuletzt die beiden Sekretärinnen, Frau Döge und Frau Farsen, die für mich immer zuverlässige Ansprechpartner in allen Verwaltungsangelegenheiten waren.

Natürlich möchte ich mich auch bei all den anderen Kollegen bedanken, mit denen ich nicht nur gut zusammen arbeiten und fachliche Diskussionen führen konnte, sondern auch einen großen Teil meiner Freizeit verbrachte.

So zum Beispiel bei vielen „Ehemaligen“ wie Deborah A.Court, Terra und Troy Harkness, Romano Baardman und Robert Perryman (die vielen gemeinsamen „Schönes Wochenende“-Reisen sind mir bis heute in guter Erinnerung geblieben), aber auch bei Heike Arlt, Ingrid Wagner, Klaus Leonhard (sein persönlicher Kneipenführer enthielt gute Ausgehtips nicht nur für mich!), Kai Hell und Harald Steiner, die sehr dazu beigetragen haben, daß ich mich von Beginn an im Institut wohl fühlte.

Daneben möchte ich mich ebenfalls bei vielen anderen Kollegen bedanken, die ich im Laufe der Zeit sehr schätzen gelernt habe und sicher sehr vermissen werde: bei Frank Baumann für die Freundschaft, Hilfsbereitschaft und umfassende Unterstützung bei der Lösung vieler Probleme, bei Uwe Ahting, der mich immer zuverlässig mit Opernkarten versorgte, aber auch bei Marlies Messerschmitt, Ute Staudinger, Florian Fuchs, Marc Preuss, Kai Dimmer, Michael Käser, Carola Klanner, Petra Robisch, Simone Schmitt, Michael Becker und, und, und...

Zum Schluß möchte ich auch ganz herzlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Onkel Joachim danken für die Unterstützung, die sie mir über all die Jahre hinweg gegeben haben.

8. LEBENS LAUF

Markus Dembowski

- 30.04.1968 geboren in Berlin
- 1974 - 1984 Besuch der Allgemeinbildenden Oberschule in Berlin-Treptow
- 1984 - 1986 Besuch der Erweiterten Oberschule in Berlin-Treptow, Abschluß mit Abitur
- 1986 - 1989 Wehrdienst in Delitzsch/Sachsen und Storkow/Mark
- 1989 - 1990 Besuch des Instituts zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
-
- Sept. 1990 - Juli 1995 Studium der Biochemie an der Biologischen Fakultät, Fachbereich Biochemie, der Moskauer Staatlichen Universität „Lomonossow“, Russland, Abschluss als Diplom-Biochemiker
- Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen des Mechanismus der Interaktion von Phosphonatanaloga des Pyruvats mit der Pyruvatdehydrogenase“
- Nov. 1995 – heute Promotion am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit entstanden folgende Publikationen:

- Rapaport D., Kuenkele K.P., Dembowski M., Ahting U., Nargang F.E., Neupert W., Lill R. (1998) „Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins.“, Mol. Cell Biol. 18, 5256-5262
- Kuenkele K.P., Heins S., Dembowski M., Nargang F.E., Benz R., Thieffry M., Walz J., Lill R., Nussberger S., Neupert W. (1998) „The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.“, Cell **93**, 1009-1019
- van Dyck L., Dembowski M., Neupert W., Langer T.(1998) „Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of Saccharomyces cerevisiae.“, FEBS Lett. **438**, 250-254
- Scharfe C., Zaccaria P., Hoertnagel K., Jaksch M., Klopstock T., Dembowski M., Lill R., Prokisch H., Gerbitz K.D., Neupert W., Mewes H.W., Meitinger T. (2000) „MITOP, the mitochondrial proteome database: 2000 update.“, Nucleic Acids Res. 28, 155-8
- Stan T., Ahting U., Dembowski M., Künkele K.P., Nussberger S., Neupert W. and Rapaport D. (2000) „Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria“ EMBO J. **19**, 4895-4902
- Dembowski M., Künkele 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**, 17679-17685

