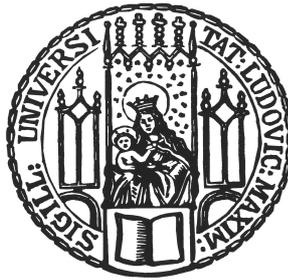


Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Untersuchungen zur Translokation  
und Insertion mitochondrialer Proteine  
über den Tim17-Tim23-Komplex

Stephan Meier

aus  
Lörrach

2005

### Erklärung

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

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 16.12.2004

Dissertation eingereicht am 17.12.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner

**Meiner Familie**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Proteinimport in Mitochondrien . . . . .	2
1.1.1 Der TOM-Komplex . . . . .	3
1.1.2 Der TOB-Komplex . . . . .	3
1.1.3 Der TIM23-Komplex . . . . .	4
1.1.4 Der TIM22-Komplex . . . . .	6
1.1.5 Die OXA1-Translokase . . . . .	6
1.2 Topogenese von Membranproteinen . . . . .	7
1.2.1 Bakterielle Proteintranslokasen der Innenmembran . . . . .	7
1.2.2 Biogenese von Innenmembranproteinen in Bakterien: Die Sec- Translokase . . . . .	8
1.2.3 Biogenese von Innenmembranproteinen in Mitochondrien: Die TIM23-Translokase . . . . .	8
1.2.3.1 Stop-Transfer-Sortierung von Innenmembranproteinen	9
1.2.3.2 Konservative Sortierung von Innenmembranproteinen	10
1.2.4 Computergestützte Vorhersagen . . . . .	11
1.3 Fragestellung und Zielsetzung . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden . . . . .	13
2.1.1 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> . . . . .	13
2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	14
2.1.3 Klonierung von DNS-Fragmenten . . . . .	14
2.1.3.1 Restriktionsverdau . . . . .	14
2.1.3.2 Ligation . . . . .	14
2.1.3.3 Zwischenklonierung . . . . .	15
2.1.3.4 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	15
2.1.3.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	15

2.1.4	Reinigung und Analyse von DNS . . . . .	16
2.1.4.1	Analytische und präparative Gelelektrophorese . . .	16
2.1.4.2	Konzentrationsbestimmung . . . . .	16
2.1.5	Verwendete Plasmide . . . . .	16
2.1.6	Klonierungsstrategien . . . . .	16
2.2	Genetische Methoden . . . . .	21
2.2.1	Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> . . . . .	21
2.2.2	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	22
2.2.3	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	22
2.2.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	24
2.2.5	Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	24
2.3	Proteinchemische Methoden . . . . .	24
2.3.1	Elektrophoretische Methoden . . . . .	24
2.3.1.1	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	24
2.3.1.2	Harnstoff-Gelelektrophorese . . . . .	25
2.3.1.3	Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen . . .	25
2.3.1.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	25
2.3.2	Autoradiographie und Densitometrie . . . . .	26
2.3.3	Synthese von <sup>35</sup> S-markierten Proteinen <i>in vitro</i> . . . . .	26
2.3.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . . .	27
2.3.5	Fällung von Proteinen durch TCA . . . . .	27
2.3.6	Überexpression und Reinigung von Proteinen . . . . .	27
2.3.7	Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen in <i>E. coli</i> .	27
2.3.8	Derivatisierung von Proteinen . . . . .	28
2.3.8.1	Derivatisierung mit AMS . . . . .	28
2.3.8.2	Chemische Quervernetzung von Proteinen . . . . .	28
2.3.9	Quervernetzung radioaktiv markierter Vorstufenproteine mit mitochondrialen Proteinen . . . . .	29
2.3.10	Gelfiltration . . . . .	29
2.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	29
2.4.1	Isolierung von Mitochondrien aus Hefe . . . . .	29
2.4.2	Erzeugung von Mitoplasten . . . . .	30
2.4.3	Import von Proteinen in Mitochondrien . . . . .	30
2.4.4	Bestimmung von Enzymaktivitäten . . . . .	31
2.4.4.1	Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität . . .	31
2.4.4.2	Bestimmung der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Ak- tivität . . . . .	32
2.4.4.3	Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität . .	32

---

2.4.4.4	Bestimmung der mitochondrialen ATP-Synthase-Aktivität . . . . .	32
2.4.5	Messung des Membranpotentials in Mitochondrien . . . . .	33
2.5	Immunologische Methoden . . . . .	34
2.5.1	Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen . . . . .	34
2.5.2	Verwendete Antikörper . . . . .	34
2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern . . . . .	35
2.5.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot) . . . . .	36
2.5.5	Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen . . . . .	36
2.5.6	Koimmunpräzipitation . . . . .	37
2.6	Computergestützte Methoden . . . . .	37
2.6.1	Hydrophobizität von Transmembrandomänen . . . . .	37
2.6.2	Generierung von Strukturmodellen . . . . .	37
2.7	Puffer und Medien . . . . .	38
2.8	Chemikalien und Verbrauchsmaterial . . . . .	39
2.9	Geräte . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Charakterisierung von Tim17 . . . . .	43
3.1.1	Tim17 weist ein konserviertes N-terminales Motiv auf . . . . .	45
3.1.2	Die Deletion des N-Terminus von Tim17 führt zu einem starken Wachstumsdefekt . . . . .	45
3.1.3	Die Deletion des Aminoterminus von Tim17 übt keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des TIM23-Komplexes aus . . . . .	46
3.1.4	Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien haben eine reduzierte Cytochrom c-Oxidase-Aktivität . . . . .	49
3.1.5	Die Deletion des N-Terminus von Tim17 führt zu einem starken Importdefekt für TIM23-spezifische Präproteine . . . . .	50
3.1.6	Die Expression von Tim17 $\Delta$ N führt zu einer Reduktion des Membranpotentials . . . . .	50
3.1.7	Der Importdefekt von Tim17 $\Delta$ N wird nicht durch ein reduziertes Membranpotential verursacht . . . . .	53
3.1.8	In Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien ist die Translokation von Präproteinen über den TIM23-Komplex stark inhibiert . . . . .	55
3.1.9	Zwei konservierte negative Ladungen im N-Terminus von Tim17 sind von besonderer Bedeutung . . . . .	57

3.1.10	Die Neutralisation der negativen Ladungen im N-Terminus von Tim17 führt zu einem Importdefekt und zu einer Reduktion des Membranpotentials . . . . .	59
3.2	Topogenese mitochondrialer Innenmembranproteine . . . . .	61
3.2.1	Prolinreste sind charakteristisch für transferierte Transmembrandomänen . . . . .	61
3.2.2	Prolinreste in Transmembrandomänen verändern das Sortierungsverhalten . . . . .	63
3.2.3	Der Austausch einer Transmembrandomäne kann zur Arretierung eines normalerweise konservativ sortierten Proteins führen . . . . .	67
3.2.4	Die intramitochondriale Sortierung wird von strukturellen Eigenschaften der hydrophoben Domänen bestimmt . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Charakterisierung von Tim17 . . . . .	73
4.1.1	Der N-Terminus von Tim17 ist entscheidend für die Proteintranslokation mitochondrialer Präproteine . . . . .	73
4.1.2	Zwei negativ geladene Aminosäurereste im N-Terminus von Tim17 sind von besonderer Bedeutung . . . . .	74
4.1.3	Das erniedrigte Membranpotential ist nicht die primäre Ursache für den Importdefekt der Tim17 $\Delta$ N-Mutante . . . . .	76
4.1.4	Die konservierten Cysteinreste des Tim17-Proteins sind nicht kritisch für seine Funktion . . . . .	76
4.1.5	Modell einer Präprotein-abhängigen Regulation der TIM23-Translokase . . . . .	77
4.2	Topogenese von Membranproteinen vermittelt durch den TIM23-Komplex . . . . .	79
4.2.1	Die Funktion von Prolinresten in Transmembrandomänen . . . . .	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>86</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>97</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>101</b>

# Verwendete Abkürzungen

5-FOA	5-Fluororotsäure ( <i>5-fluoro-orotic acid</i> )
A	Adenin
A	Ampère
AAC	<i>ATP/ADP carrier</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMS	4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumine</i> )
c	centi
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CP	Creatinphosphat
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DFDNB	1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DiSC <sub>3</sub> [5]	3,3'-Dipropylthiodicarbocyanin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSG	Disuccinimidylglutarat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E...	Extinktion bei ... nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

F	Faraday
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung $m/s^2$
g	Gramm
G	Guanin
GST	Glutathion-Transferase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschock-Protein
IgG	Immunoglobulin G
IMR	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
IMP	<i>Inner membrane peptidase</i>
k	kilo
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
KOH	Kalilauge
l	Liter
$\mu$	micro
<i>m</i>	Meter
m	milli
M	Mol pro Liter
MBS	m-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
MDH	Malat-Dehydrogenase
MPP	<i>Mitochondrial processing peptidase</i>
min	Minute(n)
n	nano
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NEM	N-Ethylmaleimid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure ( <i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> )
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermminus

---

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD...	Optische Dichte bei ... nm
o-Phe	o-Phenanthrolin
p	pico
PA	Protein A
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Svedberg-Einheit
SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben ( <i>Shrimp alkaline phosphatase</i> )
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Medium	Synthetisches Vollmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
STI	Trypsininhibitor aus Sojabohnen ( <i>Soybean trypsin inhibitor</i> )
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure ( <i>Trichloroacetic acid</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIM	<i>Translocase of the Inner Membrane</i>
TM	Transmembrandomäne
TOM	<i>Translocase of the Outer Membrane</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>Unit(s)</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
Ω	Ohm



# Kapitel 1

## Einleitung

Leben, wie wir es kennen, ist ohne die Funktion von Membranen nicht vorstellbar. Sie verleihen biologischen Systemen ihre Individualität und grenzen sie von der Umgebung ab. Alle Lebensformen bedienen sich hierzu der Zellwände und Zellmembranen, welche einen ungerichteten Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung verhindern. In eukaryotischen Zellen bilden zusätzlich interne Membranen Kompartimente aus, die sog. Organellen, wie beispielsweise den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat, die Mitochondrien, die Peroxisomen, die Lysosomen und die Chloroplasten. Innerhalb dieser definierten Kompartimente können durch unterschiedliche chemische Milieus unterschiedliche biochemische Reaktionen ablaufen. Gleichzeitig erfordern die Kompartimente im Zellinnern spezifische und regulierte Transportprozesse in und über die Membranen, die sie vom Cytoplasma abtrennen [100].

Aktuelle Untersuchungen zur Lokalisation des zellulären Proteoms zeigen, dass nur etwa die Hälfte der im Cytosol synthetisierten Proteine auch dort ihren endgültigen Wirkungsort findet. Proteine, die ihre Funktion in den Organellen, in der Zellmembran oder als sezernierte Proteine erfüllen, weisen spezifische Lokalisierungssignale auf und erreichen ihre Bestimmungsorte mithilfe entsprechender Erkennungs- und Translokationssysteme. Chaperone halten diese Proteine in einem translokationskompetenten Zustand und sorgen am Zielort für eine korrekte Faltung und Assemblierung.

Die Mitochondrien der Eukaryoten sind sowohl für den zellulären Energiehaushalt aus der oxidativen Phosphorylierung als auch für den Aminosäuremetabolismus, den zellulären Eisenstoffwechsel und für Teile des Lipidstoffwechsels verantwortlich [63, 101]. Des Weiteren übernehmen Mitochondrien eine zentrale Rolle im Kalziumhaushalt der Zelle sowie beim kontrollierten Zelltod, der Apoptose [94]. Mitochondrien sind von zwei Membranen umschlossen, wobei die stark gefaltete Innenmembran die Matrix umschließt und die Außenmembran den Intermembranraum vom Cyto-

sol abgrenzt [30]. In der Zelle bilden Mitochondrien ein verzweigtes Netzwerk aus, welches durch kontinuierliche Fusions- und Teilungsvorgänge aufrechterhalten wird [17, 105]. Die Teilung der Mitochondrien ist zwingend notwendig für die Vererbung der Mitochondrien an die Tochterzellen, da die Zelle Mitochondrien nicht *de novo* schaffen kann.

Phylogenetisch entwickelten sich die Mitochondrien aus freilebenden  $\alpha$ -Proteobakterien (Endosymbiontentheorie [22, 68]). Im Laufe der Evolution haben die wahrscheinlich zunächst endosymbiontisch lebenden Bakterien ihr Genom fast vollständig in den Nukleus transferiert (5 – 15% des zellulären Genoms [2, 12]), wobei der Gentransfer primär wohl durch die besseren Regulationsmöglichkeiten im Nukleus getrieben wurde [12, 40]. Nur wenige, zumeist sehr hydrophobe Proteine, sind auf dem Genom von Mitochondrien heutiger Organismen kodiert. Beim Menschen sind dies 13 Proteine, bei der Bäckerhefe gar nur 8 [9]. Mitochondrien selbst sind somit aus einem Mosaik aus kernkodierten und mitochondrial kodierten Proteinen aufgebaut.

Der Gentransfer von mitochondrial kodierten zu kernkodierten Proteinen erforderte die Entwicklung eines Proteinimport und -sortierungssystems für die nun im Cytosol synthetisierten mitochondrialen Proteine. Im Laufe der Evolution entstand ein aufwendiger Proteinsortierungsapparat bestehend aus mehreren Proteinkomplexen, den Translokasen. Der mitochondriale Proteinimport wird hauptsächlich an Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) als Modellorganismen untersucht. Etablierte genetische Methoden erlauben deren einfache Manipulation, und aufgrund der guten Kultivierbarkeit steht ausreichend Zellmaterial für biochemische Untersuchungen zur Verfügung. Die Entwicklung eines *in vitro*-Import-Systems isolierter Mitochondrien mit *in vitro* gewonnenen Vorläuferproteinen ermöglicht die Untersuchung der Mechanismen des Proteintransports [32, 96]. Da die einzelnen Komponenten der Translokasen zwischen Pilzen, Pflanzen und Tieren meist konserviert sind, sind die an diesen Modellorganismen gewonnenen Erkenntnisse in der Regel direkt auf höhere Organismen übertragbar.

## 1.1 Proteinimport in Mitochondrien

Die Mehrheit der kernkodierten mitochondrialen Proteine tragen N-terminale Transport-Signale, die sog. Präsequenzen [15, 92, 106]. Diese sind notwendig und hinreichend für den mitochondrialen Import der Proteine und werden nach erfolgtem Import von Proteasen der Matrix proteolytisch entfernt. Präsequenzen sind normalerweise zwischen 20–60 Aminosäurereste lang und weisen gemeinsame Sekundärstruktureigenschaften auf: Sie bilden amphipathische  $\alpha$ -Helices mit jeweils einer hydrophoben und einer positiv geladenen Seite [116]. Unprozessierte mitochondriale Pro-

teine werden als Vorstufenproteine oder Präproteine bezeichnet.

### 1.1.1 Der TOM-Komplex

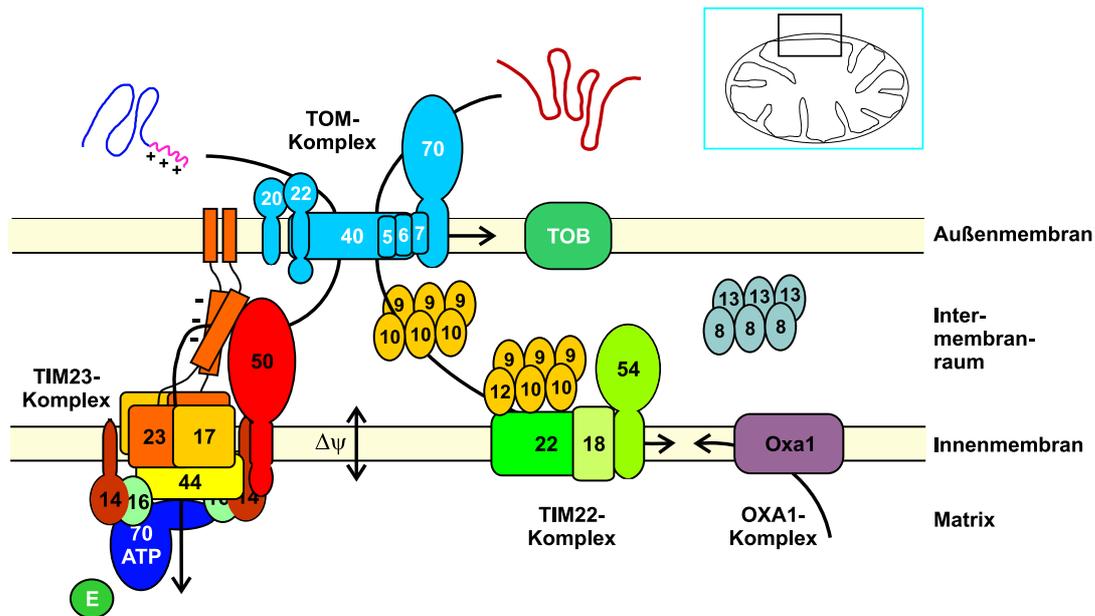
Der TOM-Komplex (*Translocase of the Outer Membrane*) ist zuständig für die Insertion von Proteinen in die Außenmembran, den Import von Proteinen in den Intermembranraum und für die Weiterleitung von Proteinen an die Translokasen der Innenmembran [44, 58, 87]. Der hochmolekulare TOM-Komplex ( $\sim 440$  kDa) besteht aus drei Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität (Tom20, Tom22, Tom70) [11, 24, 86], dem eigentlichen porenbildenden Kanal, welcher von mehreren Tom40-Untereinheiten gebildet wird, sowie kleinen Untereinheiten (Tom5, Tom6, Tom7) (siehe Abbildung 1.1) [1].

Der TOM-Komplex erfüllt eine zentrale Funktion bei der Erkennung und dem Import von mitochondrialen Vorstufenproteinen. Die Erkennung der im Cytosol synthetisierten mitochondrialen Proteine wird durch die Rezeptoren des TOM-Komplexes vermittelt. Sämtliche mitochondrialen Vorstufenproteine werden durch diese Translokase - zumindest teilweise - importiert. Des Weiteren wird über den TOM-Komplex ein Teil der Membranproteine der mitochondrialen Außenmembran inseriert. Das integrale  $\beta$ -Barrel-Membranprotein Tom40 ist in *S. cerevisiae* die einzige essentielle Komponente des TOM-Komplexes (siehe Kapitel 1.1.2).

Der TOM-Komplex ist hinreichend, um Präsequenzen von der Rezeptorseite (*cis*-Seite) auf die dem Intermembranraum zugewandte Seite (*trans*-Seite) zu transferieren. Nach der so genannten *acid chain*-Hypothese binden die positiv geladenen Präsequenzen negativ geladene Rezeptorkomponenten der Importmaschinerie, wobei die Affinität der Rezeptoren für die Präsequenzen von der *cis*- zur *trans*-Seite der mitochondrialen Außenmembran hin zunimmt [54, 99]. Auf der *trans*-Seite des TOM-Komplexes interagieren die Vorstufenproteine mit Komponenten des Intermembranraums und der mitochondrialen Innenmembran. Die Vorstufen löslicher Proteine des Intermembranraums erreichen dabei ihre finale Lokalisierung durch Komplexbildung, Assemblierung oder Proteinfaltung.

### 1.1.2 Der TOB-Komplex

Der essentielle TOB-Komplex (*Topogenesis of Mitochondrial Outer Membrane  $\beta$ -Barrel Proteins*) hat ein Molekulargewicht von  $\sim 250$  kDa und ist für die Insertion und Assemblierung von  $\beta$ -Barrel-Proteinen (z.B. Porin, Tom40, Mdm10) in die mitochondriale Außenmembran verantwortlich [84]. Die bisher identifizierten Komponenten Tob55, Mas37 und Tob38 [119] übernehmen die  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine vom TOM-Komplex, welcher für ihre initiale Erkennung und Translokation



**Abbildung 1.1 Die mitochondrialen Proteintranslokasen.** Der TOM-Komplex sorgt für die Erkennung mitochondrialer Vorstufenproteine, deren Translokation sowie für die Insertion von Proteinen mit einer Transmembrandomäne in die Außenmembran. Proteine mit N-terminaler Präsequenz werden über den TIM23-Komplex in die Matrix importiert oder in die Innenmembran inseriert. Der TIM22-Komplex vermittelt die Insertion von hydrophoben Innenmembranproteinen mit internen Importsignalen. Der OXA1-Komplex übernimmt den Export von mitochondrial und kernkodierten Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran. Die Zahlen der Tom- und Tim-Proteine entsprechen den relativen molekularen Massen der Proteine in kDa. Weitere Einzelheiten siehe Text.

verantwortlich ist. Die Insertion dieser Proteine in die Außenmembran und ihre Assemblierung in hochmolekulare Komplexe wird dabei durch den TOB-Komplex vermittelt. Neben Tom40 ist - nach heutigem Wissen - das kanalbildende Tob55 das zweite essentielle Protein der mitochondrialen Außenmembran. Über die Funktion von Mas37 und Tob38 ist bisher noch nichts bekannt. In Eukaryoten kommen  $\beta$ -Barrel-Membranproteine nur in der Außenmembran von Mitochondrien und Chloroplasten vor; in Prokaryoten nur in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien. Diese Strukturähnlichkeit von Außenmembranproteinen kann als ein weiteres Indiz für die Endosymbiontentheorie herangezogen werden.

### 1.1.3 Der TIM23-Komplex

Die mitochondriale Innenmembran ist eine der proteinreichsten Membranen der eukaryotischen Zelle. In der Innenmembran sind mindestens drei Translokasen für die korrekte Sortierung von Vorstufenproteinen verantwortlich [43, 122].

Eine der drei Translokasen, der TIM23-Komplex (*Translocase of the Inner Membrane*), besteht aus den drei integralen Membranproteinen Tim17 [8, 66], Tim23

[19, 110] und Tim50, sowie dem in der Matrix lokalisierten Importmotor, welcher aus Tim44, Tim14, Tim16 und mitochondrialem Hsp70 aufgebaut wird.

TIM23 ist für den Matriximport und für die laterale Insertion von bitopen Membranproteinen mit N-terminalen Präsequenzen verantwortlich [6, 48]. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die C-terminale Domäne von Tim50 mit Präsequenzen an der *trans*-Seite des TOM-Komplexes interagiert [34, 72]. Von Tim50 werden die Präproteine an die N-terminale Domäne von Tim23 weitergeleitet, welches die Präsequenz über die Innenmembran transloziert. Als treibende Kraft für diese Translokation wird der elektrophoretische Effekt des Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) über die Innenmembran vermutet, der die positiv geladenen Präsequenzen auf die negativ geladene Innenseite der Innenmembran zieht. In Abwesenheit von Präproteinen liegen die N-Termini von Tim23 dimerisiert vor [3]. Über diese Dimerisierung könnte der translokationsinaktive TIM23-Kanal geschlossen werden. Über die Funktion von Tim17 ist wenig bekannt [51, 71, 76].

Die Translokation über die Innenmembran erfordert die Entfaltung der Präproteine und ihren gerichteten Transport in die Matrix [33]. In der Matrix ist Tim44 eng mit dem von Tim17 und Tim23 gebildeten Importkanal assoziiert [95]. Tim44 hat eine Bindestelle für das mitochondriale Matrixchaperon Hsp70 (mtHsp70), Ssc1. Dieses bindet in ATP-abhängigen Zyklen an die Translokationsintermediate im Importkanal und verhindert dadurch ein Zurückgleiten der Polypeptide. Durch die Brown'sche Molekularbewegung bewegen sich die Translokationsintermediate im Importkanal. Die Bindung von weiteren mtHsp70-Molekülen an die eintretenden Polypeptide führt zu deren vektoriellem Transport in die mitochondriale Matrix [75, 79, 82]. Es wurde vorgeschlagen, dass die zu importierenden Proteine zusätzlich durch eine ATP-abhängige Konformationsänderung des Hsp70-Proteins aktiv über die Translokationskomplexe in die Matrix gezogen werden [69].

Die beiden in einem stabilen Komplex vorliegenden Proteine Tim14 und Tim16 sind eng mit Ssc1 assoziiert und modulieren als J-Kochaperone (DnaJ-Homologe) die Aktivität des mitochondrialen Hsp70-Proteins. Das in der mitochondrialen Innenmembran verankerte Tim14 weist alle Merkmale eines J-Proteins auf und es stimuliert die ATPase-Aktivität von Ssc1 [73, 111]. Tim16 fehlt das für J-Proteine charakteristische HPD-Motiv und es hat wahrscheinlich eine zu Tim14 antagonistische Funktion [29, 56]. Als Nukleotidaustauschfaktor für die ATPase von Ssc1 fungiert das GrpE-Homologe Mge1 [70]. Nach ihrem Transport in die Matrix werden die Präsequenzen der Präproteine durch die mitochondriale Prozessierungsprotease (MPP) in die reife, endgültige Form überführt.

Die Translokations- und Insertionsschritte erfordern sowohl ein Membranpotential über die mitochondriale Innenmembran als auch entsprechende ATP-Konzen-

trationen in der mitochondrialen Matrix, wobei letztere für die zyklischen Reaktionsschritte der Hsp70-Chaperone benötigt werden [32, 90].

### 1.1.4 Der TIM22-Komplex

Viele polytope Proteine der mitochondrialen Innenmembran werden ohne N-terminale Präsequenzen synthetisiert. Diese hydrophoben Vorstufenproteine weisen wenig konservierte, interne Importsignale in ihrer Sequenz auf. Sie werden vom Rezeptorprotein Tom70 erkannt und durch den TOM-Komplex über die Außenmembran transportiert. An der *trans*-Seite des TOM-Komplexes werden die Vorstufenproteine von kleinen löslichen Intermembranraumproteinen gebunden. Diese in hexameren Komplexen vorliegenden Komponenten sind im Fall des ATP/ADP-Transporters der essentielle Tim9-Tim10 Komplex [25] und für Tim23 der homologe Tim8-Tim13 Komplex [65].

Diese Komplexe, die sog. „kleinen TIM-Proteine“, binden an hydrophobe Bereiche der polytopen Carrier-Vorstufenproteine und unterstützen deren Insertion durch eine eigene Innenmembran-Translokase, den TIM22-Komplex [112]. Die kleinen TIM-Proteine haben dabei wahrscheinlich Chaperon-artige Funktion und verhindern die Aggregation hydrophober Proteine im Intermembranraum. Darüber hinaus binden sie direkt an den TIM22-Komplex und übergeben die Vorstufenproteine über das peripher assoziierte Tim12 an den membranständigen TIM22-Insertionskomplex.

Der TIM22-Komplex besteht aus den drei Untereinheiten Tim22, Tim18 und Tim54, wobei Tim22 einen Kanal in der Innenmembran ausbildet [55]. Tim22 weist Homologie zu Tim17 und Tim23 auf und die Kanal-Aktivität von Tim22 wird ebenfalls über das Membranpotential reguliert. Dieses ist sowohl für die initiale Insertion von Vorstufenproteinen in die Tim22-Translokase als auch für deren laterale Insertion in die Phospholipid-Membran erforderlich. Über die Funktionen von Tim54 und Tim18 ist bisher nichts bekannt [53].

### 1.1.5 Die OXA1-Translokase

Als dritte Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran wurde der OXA1-Komplex (*Oxidase Assembly*) identifiziert [42, 45, 78]. Dieser homotetramere Komplex aus Oxa1-Untereinheiten vermittelt sowohl die Insertion von konservativ sortierten Vorstufenproteinen, die dann von der Matrixseite aus in die Innenmembran inseriert werden, als auch die kotranslationale Insertion von mitochondrial kodierten und an mitochondrialen Ribosomen translatierten Proteinen. Oxa1 gehört zu einer evolutiv konservierten Proteinfamilie, die die Insertion und Assemblierung von

Membranproteinen in diversen biologischen Systemen katalysiert. Dieser Familie gehören das YidC-Protein der bakteriellen Innenmembran und das Albino3-Protein der Thylakoidmembran an, was auf eine gemeinsame prokaryotische Herkunft hindeutet.

Oxa1 aus *S. cerevisiae* bildet fünf Transmembrandomänen in der Innenmembran aus, wobei der N-Terminus im Intermembranraum und der C-Terminus in der Matrix lokalisiert ist. Dieser C-Terminus bildet eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus, welche mit der 50S-Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen wechselwirkt [108]. Dabei werden die Ribosomen über den C-Terminus von Oxa1 gebunden, wodurch die Synthese mitochondrialer Proteine an deren Insertion und Assemblierung gekoppelt wird. Oxa1 vermittelt des Weiteren die posttranslationale Insertion von Membranproteinen, die über die TIM23-Translokase zunächst in die Matrix importiert werden und die ihren Wirkungsort in der mitochondrialen Innenmembran haben.

## 1.2 Topogenese von Membranproteinen

### 1.2.1 Bakterielle Proteintranslokasen der Innenmembran

In der bakteriellen Cytoplasmamembran sind drei unterschiedliche Translokationssysteme für die Insertion von Proteinen in und über die Innenmembran zuständig. Die erste Translokase, die Sec-Maschinerie (*secretion*), vermittelt zum einen die ko- und posttranslationale Sekretion von Proteinen über die Plasmamembran. Zum anderen ist sie auch an der Biogenese von kotranslational inserierten Membranproteinen der Plasmamembran beteiligt. Dabei stellt sie das bakterielle Äquivalent der Sec61-Translokase des eukaryotischen Endoplasmatischen Retikulums dar [18, 100]. Als zweiter Translokationskomplex vermittelt das Oxa1-Homolog YidC sowohl unabhängig als auch in Kooperation mit der Sec-Translokase die Insertion von Plasmamembranproteinen, während der Tat-Komplex als dritte Translokase den Export von gefalteten Proteindomänen in das Periplasma ermöglicht [16, 57, 83].

Die Insertion von polytopen Membranproteinen ist ein zweistufiger Prozess [13]. Zunächst dient jede einzelne hydrophobe Transmembrandomäne als Membransortierungssignal. Sind alle Transmembrandomänen inseriert, folgt in einem zweiten Schritt die Faltung in die korrekte Tertiärstruktur und eventuell eine weitere Assemblierung zur endgültigen Quartärstruktur der Proteine [26]. Die Bindung von Kofaktoren an die gefalteten Proteine kann als dritter Schritt in der Biogenese von Membranproteinen betrachtet werden.

### 1.2.2 Biogenese von Innenmembranproteinen in Bakterien: Die Sec-Translokase

Die Mehrheit der bakteriellen Proteine, welche über eine Translokation in eine Membran oder über eine Membran ihren Zielort erreichen, folgt dem generellen sekretorischen Weg (Sec-Sortierung). Zu der Gruppe der Sec-Proteine gehört der heterotriomere Membrankomplex SecYEG, welcher den proteinleitenden Kanal ausbildet. Der SecDFYajC-Subkomplex reguliert die Assoziation der cytosolischen ATPase SecA an die SecYEG-Translokase und steigert die Effizienz des Proteintransports. Sekretorische Proteine werden posttranslational und in Abhängigkeit von dem löslichen Chaperon SecB an die SecYEG-Translokase geleitet [16].

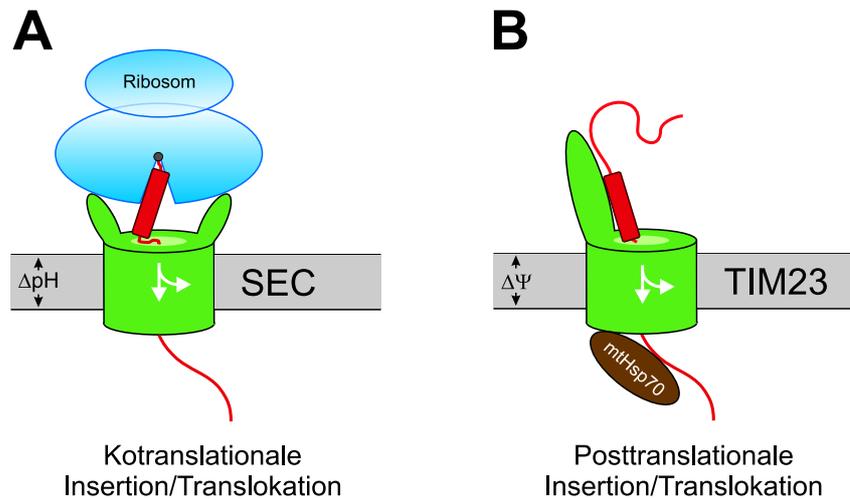
Die meisten Plasmamembranproteine werden noch während ihrer Synthese am Ribosom von dem bakteriellen Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) gebunden [13, 39]. Dieses Ribonukleoprotein wird von einer 4.5S RNA sowie der GTPase Ffh gebildet. Der Komplex aus naszierender Polypeptidkette, Ribosom und SRP bindet GTP-abhängig an den transient membrangebundenen SRP-Rezeptor FtsY. Nach GTP-Hydrolyse zerfällt der Komplex und das Vorstufenprotein wird zur Insertion an die SecYEG-Translokase transferiert. Durch Assoziation mit dem SRP wird eine Exposition der hydrophoben Substrate in das wässrige Cytoplasma vermieden.

Topogene Signale in Membranproteinen gewährleisten deren korrekte Orientierung in der Lipidschicht. Die Topologie der Membranproteine wird unter anderem durch geladene Aminosäurereste bestimmt, die den Transmembransegmenten benachbart sind. Die cytosolische Seite der Plasmamembran besitzt gegenüber der periplasmatischen Seite eine negative Überschussladung. Nach der *positive inside rule* orientieren sich die Transmembrandomänen in einer Weise in der Membran, dass die flankierende Region mit der größeren positiven Ladung im Cytoplasma verbleibt [117]. In Bakterien können kurze N-terminale Sequenzabschnitte in einer von der Sec-Translokase unabhängigen Art und Weise auch ohne *leader*-Sequenzen in die Plasmamembran inseriert werden.

Im Folgenden soll ein vereinfachtes Modell Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen der Sec-Translokase und der TIM23-Translokase veranschaulichen (siehe Abbildung 1.2).

### 1.2.3 Biogenese von Innenmembranproteinen in Mitochondrien: Die TIM23-Translokase

Die Proteine der mitochondrialen Innenmembran weisen eine große Vielfalt an topologischen Orientierungen auf. Die Aminoenden der Membranproteine können auf der Matrix- oder der Intermembranraumseite liegen, und die Innenmembranprote-



**Abbildung 1.2 Translokase-vermittelte Membraninsertion von Proteinen.**

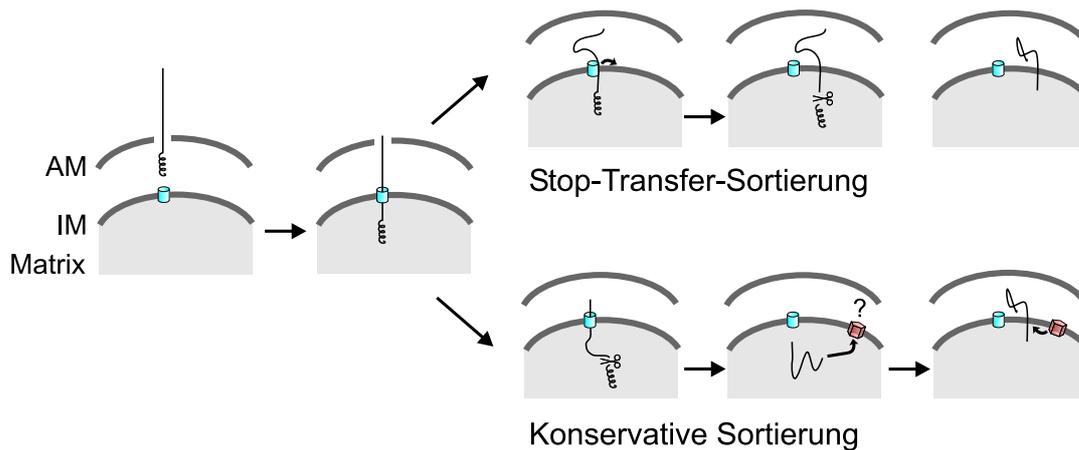
**A** Kotranslationale Insertion von Plasmamembranproteinen. Vorstufenproteine werden von Signalerkennungspartikeln GTP-abhängig an die Membran dirigiert. Anschließend bindet das translationsaktive Ribosom die SecYEG-Translokase, wobei wahrscheinlich ein gekoppelter Protein-führender Kanal entsteht. **B** Posttranslationale Insertion von mitochondrialen Innenmembranproteinen. Mitochondriale Membranproteine mit N-terminaler Präsequenz werden über den TIM23-Komplex importiert. Stop-Transfer-Signale führen zur lateralen Membraninsertion. Dabei liefert das über die Innenmembran anliegende Membranpotential  $\Delta\Psi$  gemeinsam mit mtHsp70/ATP die notwendige Energie für die Translokation. SEC: SecYEG-Translokase; TIM23: TIM23-Translokase.

ine können unterschiedlich viele Transmembrandomänen besitzen. Topogene Signale enthalten dabei die Information über die jeweilige Orientierung der Präproteine in der Innenmembran.

Mitochondrien fehlt ein der bakteriellen Sec-Translokase verwandter Translokationskomplex [38]. Die Proteine mit N-terminalen Präsequenzen können ihren finalen Wirkungsort über zwei unterschiedliche Sortierungswege erreichen, welche beide über die TIM23-Translokase vermittelt werden. Zum einen können Proteine beim Import in der TIM23-Translokase arretiert und lateral in die Membran inseriert werden (Stop-Transfer-Sortierung, siehe Abbildung 1.3, oben). Zum anderen können Proteine in einem Exportvorgang aus der Matrix inseriert werden (konservative Sortierung, siehe Abbildung 1.3, unten).

### 1.2.3.1 Stop-Transfer-Sortierung von Innenmembranproteinen

Bei der Stop-Transfer-Sortierung von kernkodierten Membranproteinen mit N-terminalen Präsequenzen wird der Proteinimport während der Translokation über den TIM23-Komplex arretiert und die Transmembrandomänen der Proteine lateral in die Innenmembran inseriert [5, 36, 37, 115]. Proteine dieser Gruppe weisen meist eine einfache  $N_{\text{innen}} - C_{\text{außen}}$ -Topologie und eine einzige Transmembrandomäne auf



**Abbildung 1.3 Insertionswege mitochondrialer Innenmembranproteine.** Bei der Stop-Transfer-Sortierung werden Präproteine auf der Ebene der mitochondrialen TIM23-Translokase arretiert und lateral in die Innenmembran inseriert. Bei der konservativen Sortierung werden die Proteine im ersten Schritt in die Matrix importiert und im nachfolgenden Schritt in die Innenmembran inseriert. AM: Außenmembran; IM: Innenmembran.

(bitope Proteine), und ihre Präsequenz wird von MPP prozessiert. Von den bisher untersuchten Proteinen dieser Gruppe (z.B. Dld1, Cox5a, Sco1, Rip1) scheinen die Hydrophobizität und Helizität der Transmembrandomäne sowie flankierende Ladungen als Signale für den Stop-Transfer-Mechanismus zu dienen. Im Fall von Dld1 ist eine stark geladene Sequenz für die Arretierung der hydrophoben Domäne in der Innenmembran notwendig [93]. Allerdings sind solche Bereiche geladener Aminosäurereste nicht generell in Stop-Transfer sortierten Proteinen vorhanden.

Es gibt auch Beispiele bitoper Membranproteine, bei denen der N-Terminus im Intermembranraum lokalisiert ist (Bcs1). Diese werden wahrscheinlich zunächst als „Loop“ durch die TIM23-Translokase importiert. Es werden jedoch auch polytope Proteine über diesen Weg sortiert, wobei dann die erste Transmembrandomäne während des Imports arretiert und in die Membran inseriert wird. Der Mechanismus, nach dem die C-terminal folgenden Transmembrandomänen in die Membran inseriert werden, ist bisher unbekannt. Weder die für den Stop-Transfer verantwortlichen Signale, welche von der TIM23-Translokase erkannt werden müssen, noch der Mechanismus der eigentlichen Membraninsertion dieser Präproteine, sind bislang verstanden.

### 1.2.3.2 Konservative Sortierung von Innenmembranproteinen

Bei der konservativen Sortierung werden kernkodierte Innenmembranproteine zunächst über den TIM23-Komplex vollständig in die Matrix importiert und anschließend in einem zweiten Schritt in die Innenmembran inseriert. Folglich werden die Intermembranraumdomänen dieser Proteine über die Innenmembran „exportiert“.

Die Membraninsertion ähnelt der prokaryotischen Insertion in die Innenmembran, und daher wird dieser Insertionsweg als „konservative Sortierung“ bezeichnet [41]. Wie in Bakterien verbleiben Proteinabschnitte mit positiv geladenen Aminosäureresten bevorzugt auf der *cis*-Seite der Membranen (*positive inside rule*), und die topogenen Signale dieser Proteine scheinen sich von denen in Prokaryoten abzuleiten.

Die Topogenese nach der konservativen Sortierung konnte u.a. bereits für die bitopen Membranproteine Cox2 (kernkodierteVersion), ATP9 (kernkodierteVersion) und für die polytopen Membranproteine Oxa1, Cox18 und Yta10 gezeigt werden [4, 31, 45]. Alle bekannten konservativ sortierten Proteine haben Homologe in Bakterien und es ist anzunehmen, dass sie im Laufe der Mitochondrienevolution von bakteriellen Vorläufern abgeleitet wurden. Die konservative Sortierung von Proteinen erlaubte es, die vorhandenen Insertionsmaschinen und die topogenen Sortierungssignale der Proteine zu verwenden.

Zusammenfassend hat die TIM23-Translokase bei der Biogenese von Membranproteinen die Aufgabe, zwei Arten von hydrophoben Bereichen zu unterscheiden. Eine Gruppe wird während der Translokation arretiert und lateral in die Innenmembran inseriert, wogegen die zweite Gruppe weiter in die mitochondriale Matrix importiert wird.

#### 1.2.4 Computergestützte Vorhersagen

Während die Vorhersage der Proteinlokalisierung und die Detektion von Transmembrandomänen mittlerweile gut etabliert ist [52], ist die Vorhersage des Sortierverhaltens bisher nicht möglich [118]. Es gelingt lediglich die Topologie von Proteinen anhand ihrer C-terminalen Transmembranregionen mit annehmbarer Zuverlässigkeit vorherzusagen. Es fehlen somit noch elementare strukturelle und funktionelle Erkenntnisse, welche die unterschiedlichen Transmembrandomänen beinhalten und für ihr unterschiedliches Sortierverhalten verantwortlich sind.

Dabei scheinen biophysikalische Eigenschaften wie Hydrophobizität und Helizität der Transmembrandomänen von größter Bedeutung zu sein. Der Einfluss der Primärsequenz auf das Sortierverhalten von hydrophoben Bereichen ist bislang noch nicht verstanden. Des Weiteren haben flankierende Regionen der Transmembrandomänen einen Einfluss auf ihre Topogenese. Die Identifizierung entsprechender topogener Signale sollte in zukünftigen Algorithmen zur Sortierungs- und Topologievorhersage von Membranproteinen berücksichtigt werden.

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Während bereits eine Vielzahl von Komponenten der TIM23-Translokase identifiziert wurde, ist über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften erst wenig bekannt. Tim23 weist zwei Domänen auf - einen löslichen N-terminalen Bereich, der mit mitochondrialen Präsequenzen interagiert und eine C-terminale hydrophobe Domäne. Tim17 besteht fast ausschließlich aus hydrophoben Bereichen und ist der C-terminalen Hälfte von Tim23 ähnlich. Der hohe Grad an Sequenzkonservierung von Tim17-Proteinen weist auf eine wichtige Rolle dieses Proteins hin. Die Funktion von Tim17 ist bislang jedoch nicht verstanden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch gezielte Mutagenese und Deletion entsprechender Domänen die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des konservierten Membranproteins Tim17 zu untersuchen.

Des Weiteren sollten die Sortierungssignale identifiziert werden, welche Innenmembranproteine auf ihren jeweiligen Sortierungsweg leiten. Durch die Charakterisierung verschiedener Modellproteine sind die Sequenzen einiger transferierter und arretierter Membranproteine bekannt. Anhand dieser sollten typische Eigenschaften der beiden Gruppen erschlossen werden, die dann durch gezielte Mutagenese auf ihre topogenen Eigenschaften hin untersucht werden können.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

Die prozentualen Konzentrationsangaben sind für gelöste Feststoffe in Gewichts- und für gelöste Flüssigkeiten in Volumenprozent angegeben.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse [7] mit anschließender Ethanolfällung. Für die Präparation größerer Mengen wurde die DNS über eine Anionenaustauschersäule gereinigt.

##### *Präparation im kleinen Maßstab*

Für die Isolierung kleiner Mengen DNS wurden *E. coli*-Zellen in 2 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1 ml der Kultur wurden für 20 s bei 7500 g (RT) präzipitiert und in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde durch Zugabe von 100 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) für 5 min bei 65°C alkalisch lysiert. Die Probe wurde dann mit 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat pH 4,5) neutralisiert und für 5 min auf Eis gekühlt. Ausgefällte Proteine und chromosomale DNS wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 35000 g (+4°C) abgetrennt. Zum Fällen der Plasmid-DNS wurde der Überstand mit 1 ml Ethanol versetzt und für 15 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert. Die Probe wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes für 5 min bei RT getrocknet. Die so erhaltene DNS wurde dann in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### *Präparation im großen Maßstab*

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS wurde das Kit Jetstar (Midi-Säulen) verwendet. Ausgehend von 50 ml einer Übernachtkultur in LB<sup>Amp</sup> wurde die DNS nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet.

## **2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* wurden als DNS-Fragmente mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert [97, 98]. Neben dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer enthielt ein typischer Reaktionsansatz von 50  $\mu$ l: 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate, 1–100 ng Matrizen-DNS, 20 pmol von jedem Primer, 2,5 U *Pfu*-DNS-Polymerase oder 1 U *Taq*-DNS-Polymerase. Die entsprechende DNS-Polymerase wurde dem Reaktionsansatz zugegeben, sobald der PCR-Block eine Temperatur von 94°C erreicht hatte (*hot start*). Die PCR-Reaktionsfolge wurde 35x wiederholt und setzte sich wie folgt zusammen: Schmelzen der DNS bei 94°C für 30–60 s, Anlagerung der Oligonukleotide bei 40–65°C für 30–60 s und Synthese der DNS bei 72°C für 30–90 s (1 min/kb). Meist wurden die ersten 5 Zyklen bei einer um 5°C niedrigeren Anlagerungstemperatur durchgeführt. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 10-minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNS-Synthese vervollständigt. Die erfolgreiche Amplifikation der DNS-Fragmente wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert.

## **2.1.3 Klonierung von DNS-Fragmenten**

### **2.1.3.1 Restriktionsverdau**

DNS wurde durch Endonukleasen in den vom Hersteller mitgelieferten und empfohlenen Puffern geschnitten. Für 1  $\mu$ g DNS wurden ca. 2 U Enzym eingesetzt und es wurde 45–90 min oder über Nacht bei 37°C verdaut. Die Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten (Vektoren) wurde direkt im Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden der Reaktion ca. 0,2 U SAP pro  $\mu$ g DNS zugegeben.

### **2.1.3.2 Ligation**

Zur Ligation eines DNS-Fragments mit einem linearisierten Vektor wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 benutzt. Die Ligationen wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Endvolumen von 10  $\mu$ l durchgeführt. Dazu wurden 50–200 ng DNS des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNS-Fragment gemischt und mit 400 U T4-Ligase für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Eine Steigerung der Ligationseffizienz konnte durch die Verwendung eines

in etwa linearen Temperaturgradienten erreicht werden. Dazu wurden die Reaktionsgefäße des Ligationsansatzes in einem Schwimmer mit etwa 500 ml anfänglich handwarmem Wasser im Kühlschrank für mehrere Stunden inkubiert, wobei das Temperaturoptimum der Ligase durchlaufen wird.

### 2.1.3.3 Zwischenklonierung

Um den vollständigen Verdau eines DNS-Fragments zu gewährleisten, wurde das durch PCR amplifizierte Fragment in den Vektor pCR-TOPO oder pGEM-T zwischenkloniert. Die Ligation des Fragments in den Vektor erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* des Stamms DH5 $\alpha$  transformiert und antibiotikaresistente Transformanten selektiert. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNS präpariert, aus der das DNS-Fragment mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten wurde.

### 2.1.3.4 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Um elektrokompente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 g (+4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen sukzessive in 400, 200 und 4 ml kaltem 10%igem Glycerol (mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe in 400  $\mu$ l 10%iger Glycerollösung resuspendiert und in 45  $\mu$ l-Portionen bei -80°C weggefroren.

### 2.1.3.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde durch Elektroporation durchgeführt [20]. Dazu wurde 1  $\mu$ l Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann im Elektroporationsgerät einem Stromstoß (2,5 kV, 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml warmen SOC-Medium gemischt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor sie dann auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert wurden.

## 2.1.4 Reinigung und Analyse von DNS

### 2.1.4.1 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Analyse von DNS wurden horizontale Agarosegele mit einem Bettvolumen von 30–100 ml und einem Taschenvolumen von 20–120  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Je nach Größe der DNS-Fragmente wurde eine 0,8–2,5%ige Agaroselösung in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,5) zum Gießen der Gele verwendet. Die Agaroselösung wurde vorher auf eine Ethidiumbromidkonzentration von ca. 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingestellt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Auftragspuffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und aufgetragen. Falls die Proben störende Mengen an RNS enthielten, wurde ein 5x Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml RNase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 10 V/cm durchgeführt. Die Analyse erfolgte auf einem Transilluminator unter UV-Licht.

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mit dem QIAquick-Kit nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

### 2.1.4.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNS-Proben wurde durch Messung der Extinktion gegen  $\text{H}_2\text{O}$  bei 260 und 280 nm ( $E_{260}$  und  $E_{280}$ ) bestimmt. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  doppelsträngiger bzw. 33  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  einzelsträngiger DNS. Der Quotient aus  $E_{260}$  und  $E_{280}$  dient als Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## 2.1.5 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das entsprechende DNS-Fragment in den Vektor pGEM-3 oder pGEM-4 (Promega, Madison, USA) kloniert. In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Kurzbeschreibungen aufgeführt. Zur Expression von N-terminalen GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde pETGEXCT verwendet [104]. Die Klonierungsstrategien sind im Unterkapitel 2.1.6 beschrieben.

## 2.1.6 Klonierungsstrategien

**Klonierung von pETGEXCT-TIM17** Die gesamte ORF von *TIM17* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden SM14 (5') und SM15 (3') aus genomischer

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>
pSu9(1-69)DHFR [90]	Fusion aus der Präsequenz von Untereinheit 9 der F <sub>0</sub> -ATPase aus <i>N. crassa</i> (AS 1–69) und DHFR in pGEM-4
pCyt <sub>b</sub> <sub>2</sub> (1–167)Δ19 DHFR	Fusion aus <i>CYB2</i> (AS 1–167)Δ19 und DHFR in pGEM-4
pCyt <sub>b</sub> <sub>2</sub> (1–167)Δ19 K5 DHFR [102]	Fusion aus <i>CYB2</i> (AS 1–167)Δ19 mit zusätzlichen 5 Lysinresten und DHFR in pGEM-4
pCOX5a-DHFR	Fusion aus <i>COX5a</i> und DHFR in pGEM-4
pCOX5aΔTM-DHFR	Fusion aus <i>COX5a</i> mit disruptierter Transmembrandomäne (TM) und DHFR in pGEM-4
pCOX5a	<i>COX5A</i> in pGEM-4
pCOX5aΔTM	<i>COX5A</i> mit disruptierter Transmembrandomäne (TM) in pGEM-4
pCOX5a <sup>L104P</sup>	<i>COX5A</i> mit Punktmutation L104P in pGEM-4
pCOX5a(DLD1)	<i>COX5A</i> mit Tausch der TM zu der von Dld1 in pGEM-4
pCOX5a(OXA1)	<i>COX5A</i> mit Tausch der TM zu der 1. TM von Oxa1 in pGEM-4
pCOX5a(OXA1 <sup>P106L</sup> )	<i>COX5A</i> mit Tausch der TM zu der 1. TM von Oxa1 und Punktmutation P106L in pGEM-4
pOXA1 [45]	<i>OXA1</i> in pGEM-3
pOXA1(DLD1)	<i>OXA1</i> mit Tausch der 2. TM-Domäne zur TM-Domäne von Dld1 in pGEM-3
pOXA1(COX5a)	<i>OXA1</i> mit Tausch der 2. TM-Domäne zur TM-Domäne von Cox5a in pGEM-3
pOXA1(COX5a <sup>L206P</sup> )	<i>OXA1</i> mit Tausch der 2. TM-Domäne zur TM-Domäne von Cox5a und Punktmutation L206P in pGEM-3
pOXA1(COX5a <sup>L206P L211P</sup> )	<i>OXA1</i> mit Tausch der 2. TM-Domäne zur TM-Domäne von Cox5a und Punktmutationen L206P sowie L211P in pGEM-3

**Tabelle 2.1** Verwendete Plasmide zur *in vitro*-Transkription und -Translation

DNS amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI bzw. *Bgl*III in den Vektor pETGEXCT kloniert.

**SM14** 5'-GGG GGA TCC ATG TCA GCC GAT CAT TCG

**SM15** 5'-GGG AGA TCT CTA AGC TTG CAG AGG TTG

**Klonierung von pVT100U-TIM17 und Deletionsmutanten** Um Tim17 bzw. entsprechende trunkierte Formen von Tim17 *in vivo* zu exprimieren, wurden entsprechende kodierende Sequenzen in pVT100U kloniert. Es wurden folgende Varianten von Tim17 hergestellt: Tim17 $\Delta$ N (Deletion der AS 1-11), Tim17 $\Delta$ C (Deletion der AS 135-157) als auch Tim17 $\Delta$ N $\Delta$ C (AS 12-134). Mittels PCR mit den entsprechenden Primern (siehe Tabelle) wurden entsprechende Regionen aus genomischer DNS amplifiziert und über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *Pst*I bzw. *Bam*HI in den Vektor pVT100U kloniert.

<i>Primerkombination</i>	<i>kodiertes Protein</i>
SM28 (5') / SM29 (3')	Tim17 FL (wt)
SM30 (5') / SM29 (3')	Tim17 $\Delta$ N (AS 12-157)
SM28 (5') / SM31 (3')	Tim17 $\Delta$ C (AS 1-134)
SM30 (5') / SM31 (3')	Tim17 $\Delta$ N $\Delta$ C (AS 12-134)

**SM28** 5'-GGG CTG CAG ATG TCA GCC GAT CAT TCG AGA G

**SM29** 5'-GGG GGA TCC CTA AGC TTG CAG AGG TTG AGA G

**SM30** 5'-GGG CTG CAG ATG ATA GTA ATA CTA AAT GAT TTC

**SM31** 5'-GGG GGA TCC CTA TCT TTG AAA CAT TAG TCC CAC

**Alanin-Punktmutagenese des N-Terminus von Tim17** Der N-Terminus von Tim17 wurde einer gezielten Alanin-Punktmutagenese unterzogen. Dazu wurden über Primer die Aminosäurereste 1–11 spezifisch in Alanin-Reste mutiert. Die Konstrukte wurden unter dem endogenen Promotor und Terminator von *TIM17* kloniert. Die entsprechenden Mutationen wurde über eine die Aminosäuresequenz nicht verändernde Schnittstelle eines Restriktionsenzym eingeführt und die jeweiligen Fragmente in die Restriktionsschnittstellen *Sal*I/*Xba*I in pRS315 kloniert [107]. Für die Klonierung der Tim17<sup>D4R D8K K80D R83D</sup>-Mutante (DD→RK/KR→DD) wurde ein pRS315 Plamid, welches *TIM17* enthielt, zunächst mit *Nco*I verdaut und ein entsprechend verdautes PCR-Produkt aus der Primerkombination SM42/SM117 in

diesen Vektor ligiert. Über ortsspezifische Mutagenese mit der Primerkombination SM118/SM119 wurde schließlich Tim17<sup>D4R D8K K80D R83D</sup> erhalten (DD→RK / KR→DD).

<i>Primerkombination</i>	<i>tim17 N-Terminus</i>
SM42 (5')/SM96 (3') und SM86 (5')/SM43 (3')	M <u>AAAAA</u> RDPCP...
SM42 (5')/SM111 (3') und SM112 (5')/SM43 (3')	MSADHS <u>A</u> DPCP...
SM42 (5')/SM97 (3') und SM88 (5')/SM43 (3')	MSADHS <u>AA</u> P <u>A</u> PCP...
SM42 (5')/SM96 (3') und SM99 (5')/SM43 (3')	M <u>AAAAAAA</u> A <u>A</u> PCP...
SM42 (5')/SM98 (3') und SM92 (5')/SM43 (3')	MSADHSR <u>DAAA</u> ...
SM42 (5')/SM96 (3') und SM100 (5')/SM43 (3')	M <u>AAAAAAAAA</u> C <u>A</u> ...
SM113 (5')/SM109 (3') und SM110 (5')/SM43 (3')	MS <u>A</u> A <u>H</u> SR <u>A</u> PCP...
SM118 (5')/SM119 (3')	MS <u>A</u> R <u>H</u> SR <u>K</u> PCP...
SM42 (5')/SM117 (3')	...DCAVD <sup>80</sup> AVD <sup>83</sup> KRED...

**SM42** 5'-GGG GTC GAC CCA CTG TCA GTG GCG

**SM43** 5'-GGG TCT AGA GAG AGA AAT GGT TGG

**SM86** 5'-GGG AGC GTT ATG GCT GCA GCC GCG GCT AGA GAT CCA TGT CC

**SM88** 5'-CAG CCG ATC ATT CTG CAG CCC CAT GTC CTA TAG

**SM92** 5'-CGA TCA TTC GAG AGA TGC TGC AGC CAT AGT CAT ACT AAA TG

**SM96** 5'-AGC CGC GGC TGC AGC CAT AAC GCT CCC GTG TAC

**SM97** 5'-ACA TGG GGC TGC AGA ATG ATC GGC TGA CAT AAC GC

**SM98** 5'-GTA TGA CTA TGG CTG CAG CAT CTC TCG AAT GAT CGG CTG

**SM99** 5'-GCG TTA TGG CTG CAG CCG CGG CTG CCG CAC CAT GTC CTA TAG TCA TAC

**SM100** 5'-GCG TTA TGG CTG CAG CCG CGG CTG CCG CAG CGT GTG CTA TAG TCA

TAC TAA ATG ATT TCG G

**SM109** 5'-GGA GCT CTC GAG TGA GCG GCT GAC ATA ACG CTC CC

**SM110** 5'-CGC TCA CTC GAG AGC TCC ATG TCC TAT AGT CAT AC

**SM111** 5'-GGA CAT GGA TCC GCC GAA TGA TCG GCT GAC ATA ACG C

**SM112** 5'-CGG CGG ATC CAT GTC CTA TAG TCA TAC TAA ATG

**SM113** 5'-GGG GGG CCC CCA CTG TCA GTG GCG

**SM117** 5'-GGG CCA TGG ATC CTC CCT CTT ATC TAC AGC ATC CAC AGC GCA ATC

AAA AGT CG

**SM118** 5'-GCG TTA TGT CAG CCC GTC ATT CGA GAA AAC CAT GTC CTA TAG TC

**SM119** 5'-GAC TAT AGG ACA TGG TTT TCT CGA ATG ACG GGC TGA CAT AAC GC

**Klonierung der pGEM4-*cox5a* Konstrukte** Um das Sortierungsverhalten des bitopen Innenmembranproteins Cox5a zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen und Chimären in pGEM4 kloniert.

<i>Primerkombination</i>	<i>cox5a-Konstrukt</i>
SM56 (5')/SM57 (3')	<i>COX5a</i>
SM56 (5')/SM65 (3') und SM66 (5')/SM57 (3')	<i>COX5aΔTM</i>
SM77 (5')/SM78 (3')	<i>COX5a<sup>L104P</sup></i>
SM56 (5')/SM101 (3') und SM102 (5')/SM57 (3')	<i>COX5a(DLD1)</i>
SM56 (5' /SM75 (3') und SM76 (5')/SM57 (3')	<i>COX5a(OXA1)</i>
SM79 (5')/SM80 (3')	<i>COX5a(OXA1<sup>P106L</sup>)</i>

Die Deletion und Insertion von Transmembrandomänen wurden über entsprechende Primer und einer 2-Schritt Klonierung durchgeführt. Punktmutationen wurden mit dem Stratagene QuickChange-Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

**SM56** 5'-GGG AAT TCA CAA TGT TAC GTA ACA CTT TTA C

**SM57** 5'-GGG TCG ACA TTG TAT TGG GCG GAT G

**SM65** 5'-GCG GCG TCT AGA ACC TTT GGC AAT AAA ACT GG

**SM66** 5'-GCG GCG TCT AGA GAC GCA AAG ACC ATG AAT AAG G

**SM75** 5'-CTA GAG TTT ACT CTG GGT TGC CTT GGT GGG GAA CTA TCG CGG

CCA CCA CCA TCC TCA TTG TTC GAA TGG CGG GTG GCC AAG

**SM76** 5'-CTA GCT TGG CCA CCC GCC ATT CGA ACA ATG AGG ATG GTG GTG

GCC GCG ATA GTT CCC CAC CAA GGC AAC CCA GAG TAA ACT

**SM77** 5'-GCT GCA GGC CTA CCA TTT TCA GTG GG

**SM78** 5'-CCC ACT GAA AAT GGT AGG CCT GCA GC

**SM79** 5'-GTT TAC TCT GGG TTG CTT TGG TGG GGA ACT ATC

**SM80** 5'-GAT AGT TCC CCA CCA AAG CAA CCC AGA GTA AAC

**SM101** 5'-GCT GAG CTC GCG ATG ACA GAG TAT TTG GCA ATA AAA CTG GAA TC

**SM102** 5'-CGC GAG CTC AGC TAC TCT ATT CGG TTA TTT GTT CGC TAG GAT

GGC GGG TGG CCA AGA CG

Die aus der Klonierung erhaltenen Plasmide wurden zur *in vitro*-Transkription/Translation von *cox5a* eingesetzt.

**Klonierung der pGEM3-*oxa1* Konstrukte** Als Ausgangsplasmid wurde ein pGEM3-Plasmid verwendet, in welchem *OXA1* mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I unter Kontrolle des SP6-Promotors kloniert wurde [45].

Primerkombination	<i>oxa1</i> -Konstrukt
SP6 (5')/SM103 (3') und SM104 (5')/T7 (3')	<i>OXA1(DLD1)</i>
SP6 (5' /SM105 (3') und SM106 (5')/T7 (3')	<i>OXA1(COX5a)</i>
SM77 (5')/SM78 (3')	<i>OXA1(COX5a<sup>L206P</sup>)</i>
SM121 (5')/SM122 (3')	<i>OXA1(COX5a<sup>L206P L211P</sup>)</i>

Es wurde die gleiche Klonierstrategie wie für die pGEM4-*cox5a* Plasmide angewandt.

**SM103** 5'-GCT GAG CTC GCG ATG ACA GAG TAT CTG TTC TTA ATG CCG TGC GAG G

**SM104** 5'-CGC GAG CTC AGC TAC TCT ATT CGG TTA TTT GTT CGC TAA CGC ATT G

**SM105** 5'-CGC GAG CTC AGC TAC TCT ATT CGG TTA TTT GTT CGC TAA CGC ATT G

**SM106** 5'-GTT GCT GCA GGC CTA CTA TTT TCA GTG GGA CTT TTT GCT GTC

GTC AAC GCA TTG AGA CAC ATG GCT AAC

**SM121** 5'-CAG TGG GAC CTT TTG CTG TCG TCA GGA TGG

**SM122** 5'-CCA TCC TGA CGA CAG CAA AAG GTC CCA CTG

Die aus der Klonierung erhaltenen Plasmide wurden zur *in vitro*-Transkription der *Oxa1*-Konstrukte eingesetzt.

**Plasmide zur *in vivo*-Expression von *Oxa1*-Mutanten** Zur Expression von *Oxa1*-Mutanten in *S. cerevisiae* unter endogenem *OXA1*-Promotor und Terminator wurde in einer PCR-Reaktion *OXA1* mit sowohl 5' als auch 3' flankierenden 300 Basenpaaren amplifiziert. Mithilfe eingeführter Restriktionsschnittstellen wurde so *OXA1* unter Kontrolle des endogenen Promotors und Terminators in pRS314 kloniert [107]. Über interne Restriktionsschnittstellen in der *OXA1*-Sequenz wurden die verschiedenen *oxa1*-Mutanten, welche bereits in pGEM3-Plasmiden kloniert vorlagen (siehe Tabelle 2.1), in das pRS314-*OXA1*-Plasmid eingeführt (siehe Tabelle 2.2).

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Dieser Stamm ist für alle Vektoren auf der Basis von pUC oder pBR322 geeignet. Außerdem enthält er einen  $\Phi$ *dlac2* $\Delta$ M15-Marker, der für Vektoren auf Basis von pUC eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht.

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>
pRS314-OXA1	<i>OXA1</i> unter endogenem Promotor und Terminator in pRS314
pRS314-OXA1(COX5a)	wie pRS314-OXA1 mit Austausch der 2. TM-Domäne von <i>OXA1</i> zur TM-Domäne von Cox5a
pRS314-OXA1(COX5a <sup>L206P</sup> )	wie pRS314-OXA1(COX5a) mit Punktmutation L206P
pRS314-OXA1(COX5a <sup>L206P L211P</sup> )	wie pRS314-OXA1(COX5a) mit den Punktmutationen L206P sowie L211P

**Tabelle 2.2** Verwendete Plasmide zur Expression von mutierten Oxa1-Proteinen in *S. cerevisiae*

Für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* wurde der pETGEXCT-Vektor im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet [104]. Dieser Stamm besitzt eine chromosomale Kopie des IPTG-induzierbaren T7-RNS-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist deshalb zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors geeignet. Diesen Zellen fehlen außerdem die Proteasen *Lon* und *OmpT*, um die überexprimierten Proteine zu stabilisieren.

### 2.2.2 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

In Tabelle 2.3 sind alle in der Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* mit Referenz und Genotypen aufgelistet.

### 2.2.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefen erfolgte unter Schütteln bei 30°C in YP-Medium (supplementiert mit 2% einer Kohlenstoffquelle [Glukose, Galaktose, Glycerin]), auf Selektiv-Medium oder auf Laktat-Medium. Hefen aus einer Glycerol-Stammkultur wurden auf einer YPD-Platte bzw. einer Selektiv-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach 2–3 Tagen wurden von dieser Platte 20 ml Medium<sup>1</sup> angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde durch Passagieren mindestens für 2 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,2 bis 1,8 geerntet.

Um Glycerol-Stammkulturen herzustellen, wurden mit einer Impföse Hefezellen von einer Agarplatte in 1 ml 15%iges Glycerol überführt und bei -80°C aufbewahrt.

<sup>1</sup>Für das Animpfen von Hefekulturen wurde auch YPD-Medium verwendet, um ein schnelles Anwachsen der Zellen zu erreichen (sofern keine Selektion erforderlich). Die Kultur wurde dann auf Laktat- oder YPGal-Medium passagiert.

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
BY4743 ( <i>wt</i> )	Mat a/ $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1/his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0/LYS2; MET15/met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0/ura3 $\Delta$ 0
BY4743 ( $\Delta$ <i>tim17</i> )	Mat a/ $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1/his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0/LYS2; MET15/met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0/ura3 $\Delta$ 0; TIM17::kanMX4/TIM17
BY4741 (FL Tim17)	Mat a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; MET15; ura3 $\Delta$ 0; TIM17::kanMX4; pVT100U TIM17
BY4741 ( $\Delta$ N Tim17)	Mat a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; MET15; ura3 $\Delta$ 0; TIM17::kanMX4; pVT100U TIM17 $\Delta$ N
BY4741 ( $\Delta$ C Tim17)	Mat a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; MET15; ura3 $\Delta$ 0; TIM17::kanMX4; pVT100U TIM17 $\Delta$ C
W303-A	Mat a; ade2-1; his3-1,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1
W303-A( $\Delta$ <i>oxa1</i> )	Mat a; ade2-1; his3-1,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; oxa1::URA3
YPH499 [107]	Mat a; ura3-52; lys2-801 <sup>amber</sup> ade2 - 101 <sup>ochre</sup> trp1- $\Delta$ 63; his3- $\Delta$ 200; leu2- $\Delta$ 1
YPH500 [107]	Mat $\alpha$ ; ura3-52; lys2-801 <sup>amber</sup> ade2 - 101 <sup>ochre</sup> trp1- $\Delta$ 63; his3- $\Delta$ 200; leu2- $\Delta$ 1
YPH501 [107]	Mat a/ $\alpha$ ; ura3-52/ura3-52; lys2-801 <sup>amber</sup> lys2-801 <sup>amber</sup> ade2 - 101 <sup>ochre</sup> ade2-101 <sup>ochre</sup> trp1- $\Delta$ 63/trp1- $\Delta$ 63; his3- $\Delta$ 200/his3- $\Delta$ 200

Tabelle 2.3 Verwendete Hefestämme

## 2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert und die Kultur am nächsten Morgen auf eine  $OD_{578}$  von ungefähr 0,1 verdünnt (20 ml Kulturvolumen). Die Zellen wurden bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,5 inkubiert und in einem sterilen 50 ml-Greiner-Röhrchen bei 1000 g sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml 100 mM Lithiumacetat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 400  $\mu$ l 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50  $\mu$ l aliquotiert. DNS (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelagert. Ein 50  $\mu$ l-Aliquot kompetenter Zellen wurde 1 min bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Folgende Lösungen wurden in dieser Reihenfolge auf das Zellsediment gegeben: 240  $\mu$ l PEG 3350 (50%), 36  $\mu$ l 1 M Lithiumacetat, 25  $\mu$ l einzelsträngige Lachsspermien-DNS (2 mg/ml), 50  $\mu$ l steriles Wasser, in dem 0,1–10  $\mu$ g der zu transformierenden DNS gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Darauf folgte eine 20minütige Inkubation bei 42°C. Dann wurden die Hefezellen 15 s bei 6000 bis 8000 rpm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf den entsprechenden SC-Platten.

## 2.2.5 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae*

Die zu testenden Hefestämme wurden in 20 ml des entsprechenden Mediums über Nacht angezogen und am Morgen auf eine  $OD_{578}$  von 0,1 verdünnt. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert. Nachdem die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren, wurde jeder Stamm auf eine  $OD_{578}$  von 0,5 bzw. 0,1 eingestellt und ausgehend von dieser Stammkultur eine serielle Verdünnungsreihe ( $5 \times 1:10$ ) in Wasser hergestellt. Pro Verdünnung wurden jeweils 3  $\mu$ l auf eine YPD- und YPG-Platte aufgetragen und bei der zu untersuchenden Temperatur inkubiert.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Elektrophoretische Methoden

#### 2.3.1.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine mit einem Molekulargewicht über 15 kDa wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt [60]. Je nach Proteinmenge und Anforderung

an die Auflösung wurden dazu Gelsysteme mit Laufstrecken zwischen 7 und 13 cm und Schichtdicken zwischen 0,75 und 1,0 mm verwendet. Die Volumina der Gelta-schen lagen zwischen 20 und 50  $\mu$ l. Die Gelmischung enthielt folgende Endkonzentrationen für das Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,03% oder 0,1% Bisacrylamid, 0,1% SDS, 60 mM Tris/HCl pH 6,8 und für das Trenngel: 16% Acrylamid, 0,1% oder 0,3% Bisacrylamid, 400 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED (0,1% Endkonzentration) und APS (0,05% Endkonzentration) gestartet. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25–35 mA mit 380 mM Glycin, 0,1% SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,3 als Laufpuffer durchgeführt. Zu jedem Lauf wurden Proteinstandardlösungen aufgetragen.

### 2.3.1.2 Harnstoff-Gelelektrophorese

Um eine bessere Auflösung von kleinen Proteinen (unter 15 kDa) zu erreichen, wurden Proteine durch Harnstoff-Gelelektrophorese getrennt. Dabei wurden die gleichen Gelsysteme wie unter 2.3.1.1 verwendet. Die Gelmischung enthielt folgende Endkonzentrationen für das Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,06% Bisacrylamid, 33% Harnstoff, 0,1% SDS, 120 mM Tris/HCl pH 6,8 und für das Trenngel: 18% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid, 33% Harnstoff, 0,1% SDS, 700 mM Tris/HCl pH 8,8. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED (0,05% Endkonzentration) und APS (0,05% bzw. 0,1% Endkonzentration) gestartet. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 200 mM Glycin und 0,1% SDS verwendet. Die Elektrophorese wurde sonst wie unter 2.3.1.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.3.1.3 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel 30–90 min in Färbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie-Blau) geschwenkt, anschließend mit H<sub>2</sub>O gespült und in 30% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt.

Das Gel wurde entweder zwischen zwei befeuchtete Zellophanfolien gespannt und bei RT getrocknet, oder auf ein befeuchtetes Whatman-Papier gelegt und im Gel-trockner getrocknet.

### 2.3.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Halbtrocken-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert [59, 109]. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je zwei Whatman-Papiere in eine Blot-

kammer geklemmt wurde. Gel, Nitrozellulose-Membran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt (0,02% SDS, 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol). Der Transfer der Proteine erfolgte für 75 oder 90 min zwischen zwei 15 x 15 cm großen Graphitelektroden bei 200 mA. Die Proteine wurden dann durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S in 3% TCA) und anschließendes Entfärben in H<sub>2</sub>O visualisiert.

### 2.3.2 Autoradiographie und Densitometrie

Um radioaktiv markierte Proteine zu visualisieren und zu quantifizieren, wurde ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel oder die Nitrozellulose-Membran aufgelegt und exponiert. Die nach der Entwicklung des Films sichtbaren Banden wurden mit einem Flachbettscanner digitalisiert und densitometrisch mit dem Programm ImageMaster bestimmt.

### 2.3.3 Synthese von <sup>35</sup>S-markierten Proteinen *in vitro*

Um <sup>35</sup>S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM-3 oder pGEM-4 klonierte Gene mithilfe der SP6-RNS-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin translatiert [85]. Der Transkriptionsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 4,5 mM Magnesiumacetat, 1,5 mM Spermidin, 75 µg/ml BSA, 7,5 mM DTT, 375 µM ATP, CTP und UTP, 75 µM GTP, 40 µM m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, ca. 1,5 U/µl RNasin, 0,4 U/µl SP6-RNS-Polymerase, 30 mM Hepes/KOH pH 7,4. In einem 50 µl -Ansatz wurden 5 µl Plasmidlösung eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol, wurde die RNS für 15 min bei -20°C belassen und anschließend für 30 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des Überstands bei RT getrocknet. Die mRNS wurde dann in 30 µl H<sub>2</sub>O mit ca. 0,75 U/µl RNasin aufgenommen.

Die Translation in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysat mit der oben gewonnen mRNS nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde auch simultane *in vitro*-Transkription/Translation in TNT-Lysat nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100000 g (+4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford [10] mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers<sup>2</sup>.

### 2.3.5 Fällung von Proteinen durch TCA

Um Proteine denaturierend zu fällen, wurde die Proteinlösung auf 12% TCA eingestellt. Die Probe wurde für 30 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 1 ml Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Aceton verworfen und das Präzipitat für 10 min bei RT getrocknet. Die Proteine wurden durch Zugabe von Laemmli-Puffer und kurzes Aufkochen gelöst.

### 2.3.6 Überexpression und Reinigung von Proteinen

Um Proteine im mg-Maßstab zu isolieren, wurden sie als GST-Fusionsproteine bzw. mit C-terminalen Hexahistidinresten rekombinant in *E. coli* exprimiert und mithilfe von GSH-Sepharose bzw. Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Dazu wurde LB<sup>Amp</sup>-Medium 1:200 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis auf eine OD<sub>578</sub> von 0,8 angezogen. Um die Überexpression zu induzieren, wurde die Kultur auf 0,5 mM IPTG eingestellt und für weitere 3 h inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 g (+4°C) geerntet. Lösliche Proteine wurden nach Standardprotokollen der Hersteller der Affinitätsmaterialien aufgereinigt.

### 2.3.7 Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen in *E. coli*

Nicht lösliche Proteine, die in *E. coli*-Zellen überproduziert werden, reichern sich in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) an. Diese lassen sich nach Zellaufschluss durch differentielle Zentrifugation aufreinigen. Eine Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes (BL21) in Selektivmedium wurde auf OD<sub>578</sub> 0,1 in 500 ml LB<sup>Amp</sup> verdünnt. Bei Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 15 min bei 5000 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 25% Sucrose in einer Konzentration von 0,5 g/ml resuspendiert und gegebenenfalls bei -70°C gelagert. Nach Zugabe von 25 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF

---

<sup>2</sup>Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit IgG erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei IgG-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml gemessen.

und 1% Triton X-100 wurden die Zellen auf Eis durch Ultraschallbehandlung lysiert (Position 7, 40%ige Leistung, 3 x 10 Pulse, Microspitze mit 3 mm Durchmesser). Zellbruchstücke und Einschlusskörperchen wurden 30 min bei 20000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 20 ml Puffer 2 (1% Triton X-100, 50 mM DTT, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF) resuspendiert und wiederum beschallt und zentrifugiert (s. o.). Dieses Pellet wurde in 20 ml Puffer 3 (0,1% Triton X-100, 50 mM DTT, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF) gelöst, erneut beschallt und wiederum abzentrifugiert (s. o.). Dieses Sediment wurde dann in 20 ml Puffer 4 (50 mM DTT, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF) resuspendiert, nochmals beschallt, abzentrifugiert (s. o.) und dieses Pellet schließlich in 0,1% SDS gelöst. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt wie in 2.3.4 beschrieben und die Reinheit durch SDS-PAGE abgeschätzt.

## 2.3.8 Derivatisierung von Proteinen

### 2.3.8.1 Derivatisierung mit AMS

Um das Gesamtprotein von Hefezellen mit AMS zu derivatisieren, wurden wie unter 2.4.1 beschrieben Sphäroplasten isoliert. Die Sphäroplasten wurden in 1 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 resuspendiert, in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bei -80°C gelagert. Zur Modifizierung wurden die Sphäroplasten auf Eis aufgetaut und 100 µg wurden dann in 70 µl Derivatisierungspuffer (30 mM AMS, 0,1% Triton X-100, 60 mM Hepes/KOH pH 7.4) gegeben. Die Proben wurden für 2 min im Ultraschallbad behandelt und für 2 h in Dunkelheit bei RT belassen. Die Proteine wurden dann TCA-gefällt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Um die Reaktion unter Ausschluss von O<sub>2</sub> durchzuführen, wurde der Derivatisierungspuffer für 10 min mithilfe einer Vakuumpumpe entgast und dann 2 min mit N<sub>2</sub> durchspült. Dieser Vorgang wurde 3x durchgeführt, bevor die Sphäroplasten zugegeben wurde. Die Derivatisierung erfolgte wie oben beschrieben, jedoch unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### 2.3.8.2 Chemische Quervernetzung von Proteinen

Chemische Quervernetzungsreagenzien können benachbarte Proteine kovalent verknüpfen, so dass sie zur Charakterisierung von Protein-Protein Wechselwirkungen eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die membranpermeablen Quervernetzungsreagenzien DFDNB (1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol), DSG (Disuccinimidylglutarat) und MBS (m-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat) verwendet. Die homobifunktionellen Quervernetzer DFDNB und DSG verknüpfen Proteine kovalent über freie Aminogruppen der Lysin-Seitenketten, während der heterofunktio-

nelle Quervernetzer MBS Proteine über eine freie Aminogruppe eines Lysin-Restes mit der Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes verknüpfen kann.

### 2.3.9 Quervernetzung radioaktiv markierter Vorstufenproteine mit mitochondrialen Proteinen

Radioaktiv markiertes Vorstufenprotein wurde für 1–15 min bei 4–25°C in isolierte Mitochondrien importiert. Nach Inkubation des Ansatzes auf Eis wurden 200  $\mu\text{M}$  Quervernetzer (20 mM Stammlösung in DMSO) zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Glycin pH 8,0 gestoppt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und mit 500  $\mu\text{l}$  SHKCl-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie entweder direkt in Laemmli-Puffer lysiert oder für eine Immunfällung eingesetzt (siehe unter 2.5.5) [46].

### 2.3.10 Gelfiltration

Mittels Gelfiltration können native Proteinkomplexe und Proteine aufgrund ihrer Molekulargröße aufgetrennt und analysiert werden. Dazu wurden 500  $\mu\text{g}$  Mitochondrien reisoliert, in Lysepuffer (50 mM NaCl, 30 mM HEPES pH 7,4, 1% Digitonin) resuspendiert und für 30 min in einem Überkopfschüttler lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Superose6 Gelfiltrationssäule geladen. Der Säulenlauf wurde mit einer Flussrate von 0,2–0,4 ml/min durchgeführt. Die gesammelten 0,5 ml Fraktionen wurden mittels TCA-Fällung präzipitiert und durch SDS-Gelelektrophorese, Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen und Immunodekoration analysiert. Die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule erfolgte durch entsprechende Markerproteine bekannter Größe.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode [32]. Durch Zentrifugation für 5 min bei 2800 g (RT) wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurden sie in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, in 2 ml pro g Feuchtgewicht 100 mM Tris, 10 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei 30°C in einem Erlenmeyerkolben im Schüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 2000 g, +4°C), die Zellen in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g Feuchtgewicht in 6,7 ml 1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase und 20 mM

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Zum Verdau der Zellwand wurde die Suspension 40–55 min bei 30°C in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 1100 g (+4°C) geerntet und pro g Feuchtgewicht in 6,7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen wurden durch 10 Stöße aufgebrochen. Der Zellaufschluss wurde mit weiteren 6,7 ml Homogenisierungspuffer pro g Feuchtgewicht versetzt und dann für 5 min bei 2000 g (+4°C) zentrifugiert, um noch intakte Zellen, Zellkerne und Membranen abzutrennen. Dieser Schritt wurde wiederholt; anschließend wurde die Suspension für 12 min bei 17000 g (+4°C) zentrifugiert, um die Mitochondrien abzutrennen. Das Präzipitat wurde in 10 ml SEH (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4) resuspendiert und für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation des Überstands für 12 min bei 17000 g (+4°C) präzipitiert und in 0,5–1,5 ml SEH aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Schließlich wurde die Organellenfraktion mit SEH-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 Erzeugung von Mitoplasten

Mitochondrien, deren äußere Membran selektiv geöffnet wurde, werden als Mitoplasten bezeichnet. Um Mitoplasten zu erzeugen, wurde die Außenmembran von Mitochondrien selektiv durch hypotones Schwellen geöffnet, wobei die Innenmembran intakt blieb. Dazu wurden Mitochondrien in SEH-Puffer in der Regel 1:10 bis 1:20 in 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 in Anwesenheit von 2 mM ATP verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation reisoliert (15000 g, 10 min, 4°C) und analog wie Mitochondrien eingesetzt. Anhand von entsprechenden Markerproteinen kann die Effizienz der Mitoplastierung in einem Western Blot kontrolliert werden.

### 2.4.3 Import von Proteinen in Mitochondrien

Importexperimente von Proteinen in Mitochondrien wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 3% BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM Manganchlorid, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4. Alle Importreaktionen wurden in Anwesenheit von 2 mM ATP und 2 mM NADH durchgeführt. Für eine typische Importreaktion wurden 25–75 µg Mitochondrien mit 0,5–1,5 µl Retikulozytenlysate bei 25°C für 10–30 min inkubiert.

Die Reaktion wurde durch 1:10-Verdünnung in kalten SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) mit 1  $\mu$ M Valinomycin gestoppt. Zum Öffnen der äußeren Mitochondrienmembran durch hypotones Schwellen wurde der Reaktionsansatz in 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 1:10 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um zugängliche Proteine zu verdauen, wurden die Proteasen PK oder Trypsin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (meist 50–100  $\mu$ g/ml). Der Verdau wurde 20–30 min durchgeführt und mit Zugabe von 2 mM PMSF bzw. dem 10-fachen Überschuss an STI gestoppt. Die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 25000 g (+4°C) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mitochondrien in SH/KCl (0,6 M Sorbitol, 80 mM Kaliumchlorid, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) resuspendiert und erneut präzipitiert. Die Mitochondrien wurden dann in Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für den Import von rekombinant gewonnenem pSu9(1-69)-DHFR in isolierte Mitochondrien wurde ein ATP-regenerierendes System angewandt. Dazu wurde der Importansatz auf 2,5 mM Malat, 2,5 mM Succinat, 5 mM CP und 35 U/ml CK eingestellt und vor der Importreaktion 5 min bei 25°C inkubiert. Um Mitochondrien in ATP zu depletieren, wurden die Mitochondrien vor Zugabe der Proteine für 10 min bei 25°C mit 25 U/ml Apyrase inkubiert, anschließend 5 min auf Eis gestellt und für die Importreaktion eingesetzt.

#### 2.4.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung mitochondrialer Enzymaktivitäten wurden Ansätze gewählt, in denen der Substratumsatz photometrisch bestimmt werden konnte. Die Mitochondrien wurden in 0,5% Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert und für 5 min bei +4°C geschüttelt. Von diesem Lysat wurde in den Messungen ein solches Volumen eingesetzt, um Extinktionsänderungen von 0,015–0,060 pro min zu erhalten. Anhand dieser Extinktionsänderungen wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Enzymaktivitäten berechnet.

##### 2.4.4.1 Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität

MDH katalysiert die Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Bei der Umsetzung fungiert  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor, wodurch NADH entsteht. Das NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden [27]. Die Messung wurde bei 30°C in einem Volumen von 1000  $\mu$ l und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 85 mM Malat, 2,44 mM  $\text{NAD}^+$ , Glycin/NaOH pH 10,0. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4.2 Bestimmung der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität

Cytochrom c Reduktase katalysiert die Reduktion von Cytochrom c mit NADH als Elektronendonator. Die Reduktion von Cytochrom c kann über ein Differenzspektrum photometrisch bei 550 nm beobachtet werden. Die Messung wurde bei 25°C in einem Volumen von 1000  $\mu\text{l}$  und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 0,08% Cytochrom c, 0,1 mM NADH, 0,1 mM KCN, 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. In einem Zweistrahlphotometer wurde eine Küvette als Referenz eingesetzt und die zweite Küvette mit 20–50  $\mu\text{g}$  Mitochondrienextrakt versetzt. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und daraus die spezifische Aktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom c bei 550 nm beträgt  $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4.3 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

Cytochrom c-Oxidase katalysiert die Oxidation von Cytochrom c mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Bei der Messung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität wurde die Oxidation von Cytochrom c bei 550 nm in einem Differenzspektrum verfolgt. Eine 1%ige Cytochrom c-Lösung (in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) wurde mit Natriumdithionit vollständig reduziert (Farbumschlag von orange-rot nach pink). 920  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) und 80  $\mu\text{l}$  der reduzierten Cytochrom c-Lösung wurde in einer 1 ml Küvette gemischt und mit 1  $\mu\text{l}$  Mitochondriensuspension versetzt. Aufgrund des osmotischen Schocks platzten die Mitochondrien auf, wodurch die Enzymkomplexe in der inneren Membran zugänglich werden. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und die spezifische Aktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom c bei 550 nm beträgt  $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4.4 Bestimmung der mitochondrialen ATP-Synthase-Aktivität

Die mitochondriale ATP-Synthase ( $F_1F_0$ -ATPase) katalysiert die Phosphorylierung von ADP zu ATP, wobei der Protonengradient über die Innenmembran die elektrochemische Energie liefert. Experimentell wird die Rückreaktion, somit die Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$ , beobachtet. Phosphat kann durch die Bildung eines Komplexes mit Ammoniumheptamolybdat nachgewiesen werden, welches in der Lage ist, Malachitgrün zu oxidieren [61, 62]. Dies wird photometrisch bei 640 nm verfolgt. Um die Integrität des  $F_1F_0$ -ATPase-Komplexes zu testen und um die Aktivität anderer unspezifischer ATPasen zu berücksichtigen, wird die Messung in An- und Abwesenheit von Oligomycin durchgeführt.

Es wurden 10, 50 und 100  $\mu\text{g}$  Mitochondrien sedimentiert und in 475  $\mu\text{l}$  0,2 M KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris/HCl pH 8,2 resuspendiert. Es wurden entweder

6  $\mu\text{l}$  Oligomycin-Stammlösung (1 mg/ml Oligomycin in Ethanol) oder 6  $\mu\text{l}$  Ethanol zugesetzt und für 3 min bei 30°C inkubiert. Die Hydrolyse-reaktion wurde durch Zugabe von 6,5  $\mu\text{l}$  200 mM ATP<sup>3</sup> (pH 7,4) gestartet. Für 2 min wurden alle 10 s 50  $\mu\text{l}$  Probe entnommen, sofort mit 800  $\mu\text{l}$  Färbereagenz (siehe unten) versetzt und nach 2 min 100  $\mu\text{l}$  Zitronensäure-Stammlösung zugegeben. Die Ansätze wurden bei RT für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 640 nm gegen einen Leerwert bestehend aus 800  $\mu\text{l}$  Farbreagenz mit 100  $\mu\text{l}$  einer 34%igen Zitronensäurestammlösung gemessen. Die Phosphatkonzentration wurde anhand einer Eichkurve<sup>4</sup> von 0–15  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat pH 7,4 bestimmt und die ATPase-Aktivität ermittelt. Die Differenz aus der Gesamt-ATPase-Aktivität und der nicht mit Oligomycin hemmbaren ATPase-Aktivität ergab die oligomycinsensitive ATPase-Aktivität.

### Farbreagenz

Farbreagenz A	340 mg Malachitgrün in 75 ml H <sub>2</sub> O
Farbreagenz B	10,5 g Ammoniumheptamolybdat in 250 ml 4 M HCl

Beide Farbreagenzlösungen (A & B) wurden gemischt, auf 1 l aufgefüllt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde filtriert und direkt vor der Messung wurden 50 ml Farbreagenz mit 250  $\mu\text{l}$  20% Triton X-100 versetzt.

### 2.4.5 Messung des Membranpotentials in Mitochondrien

Zur Messung des Membranpotentials isolierter Mitochondrien wurde der Fluoreszenzfarbstoff 3,3-Dipropylthiodicarbocyanin (DiSC<sub>3</sub>[5]) verwendet. Der kationische Farbstoff wird membranpotentialabhängig in Mitochondrien aufgenommen, was eine Abnahme des vom Farbstoff emittierten Fluoreszenzsignals zur Folge hat. Die Höhe der Abnahme des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Höhe des Membranpotentials. Dies erlaubt den Vergleich der relativen Membranpotentiale unterschiedlicher Mitochondrienpräparationen. In einem Fluoreszenzspektrophotometer wurden in einer Küvette zu 3 ml Meßpuffer (0,6 M Sorbitol, 0,1% BSA, 0,5 mM EDTA, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2) 0,7  $\mu\text{M}$  DiSC<sub>3</sub>[5] (10  $\mu\text{l}$  einer 200  $\mu\text{M}$  Lösung in DMSO) zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  isolierte Mitochondrien (3  $\mu\text{l}$  einer 10 mg/ml Suspension) hinzugegeben und sofort gemischt. Die Fluoreszenzabnahme wurde bis zu einem stabilen Signal verfolgt (1 bis 5 min) und anschließend das Mem-

<sup>3</sup>Aufgrund der Spontanhydrolyse von ATP sollte frisches ATP von hoher Reinheit verwendet werden.

<sup>4</sup>Es wurde hierfür eine Eichkurve aus 0, 1,5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 9  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphat erstellt.

<i>Antikörper</i>	<i>Beschreibung</i>
$\alpha$ His <sub>6</sub>	gegen Hexahistidinrest
$\alpha$ Tim17	gegen GST-Tim17
$\alpha$ Tim17C – term	gegen den C-Terminus von Tim17 (AS 147-158)
$\alpha$ Tim23	gegen den N-Terminus von Tim23 (AS 1–15)
$\alpha$ Cytb <sub>2</sub>	gegen rekombinantes Cytb <sub>2</sub>
$\alpha$ Mge1	gegen rekombinantes Mge1

**Tabelle 2.4** Verwendete Antikörper

branpotential durch Zugabe von 3  $\mu$ l Valinomycin (10 mM) und 3  $\mu$ l Kaliumcyanid (1 M) zerstört.

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen mit rekombinant gewonnenen Proteinen immunisiert. Aus dem Kaninchenblut wurde das Serum gewonnen. Für die Erstinjektion wurden 200  $\mu$ g Protein in einem Volumen von 250  $\mu$ l 1:1 mit TiterMax versetzt und 3 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Emulsion wurde in 3 Portionen subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen folgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax unvollständiges Freundsches Adjuvans verwendet wurde. 10–12 Tage nach jeder Injektion, außer der Erstinjektion, wurde dem Kaninchen 10–30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT ( $\sim$ 60 min) wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation gewonnen (5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 20000 g). Anschließend wurde der Überstand zur Inaktivierung des Komplementsystems für 20 min auf 56°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

### 2.5.2 Verwendete Antikörper

Alle gegen Proteine von *S. cerevisiae* verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der His<sub>6</sub>-Antikörper wurde kommerziell bezogen (Qiagen, Hilden bzw. Amersham Biosciences Europe, Freiburg). In Tabelle 2.4 sind die wichtigsten der in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgeführt. Die polyklonalen Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

### 2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus Serum aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden 0,24 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 10 min bei RT über Kopf geschüttelt und 3x in je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. 1,5 mg des gereinigten Proteins in einem Volumen von 3 ml wurden bei folgenden Endkonzentrationen mit dem aktivierten Säulenmaterial versetzt: 0,25% SDS, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3. Die Suspension wurde für 1,5 h bei RT über Kopf geschüttelt und das Säulenmaterial wurde 3x mit je 3 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert, für 2 h bei RT belassen und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde mit je 5 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumacetat pH 4,0 und 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen (mit einer Laufgeschwindigkeit von 3 ml/min). Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt, bevor die Säule dann mit 5 ml 10 mM Natriumazid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und gelagert wurde (bei +4°C).

Um die Antikörper an die Sepharose zu binden, wurde die Säule mit je 10 ml der folgenden Puffer gewaschen: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat pH 11,5; 10 mM Tris/HCl pH 7,5. Zu 4 ml Serum wurden 16 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gegeben und die Lösung wurde auf folgende Konzentrationen eingestellt: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM o-Phe, 1 µg/ml Leupeptin. Das Serum wurde 3x mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben und zunächst mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, dann mit 20 ml 500 mM Natriumchlorid und schließlich mit 20 ml 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen.

Die Elution wurde in 1 ml-Schritten mit folgenden Puffern durchgeführt: 10 ml Citrat pH 4,0; 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8 (wurde verworfen); 10 ml Natriumphosphat pH 11,5 (wurde verworfen); 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 (wurde verworfen). Die Fraktionen wurden mit 1 M Tris bzw. 1 M Glycin pH 2,2 neutralisiert, bei -20°C weggefroren und gelagert. Die Anwesenheit von Antikörpern in den einzelnen Fraktionen wurde durch Gelelektrophorese und anschließende Coomassieblau-Färbung kontrolliert.

### 2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (3% Milchpulver oder BSA in TBS (siehe Kapitel 2.7)) geschwenkt. Anschließend folgte die Immundekoration mit Antiserum oder gereinigtem Antikörper (in 3% Milchpulver oder BSA in TBS) für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht. Antiseren wurden in Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 und affinitätsgereinigte Antikörper in Verdünnungen von 1:150 bis 1:500 eingesetzt. Die erste Dekoration wurde bei RT oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Nitrozellulose gewaschen (1x 10 min in TBS mit 0,05% Triton X-100, 2x 10 min in TBS) und für 30–60 min mit einem Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen (bzw. Maus bei monoklonalen Antikörpern) und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:10000 in 3% Milchpulver oder BSA in TBS). Die Membran wurde erneut gewaschen (1x 10 min in TBS mit 0,05% Triton X-100, 2x 10 min in TBS) und für 1 min mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) durchtränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulose zwischen zwei transparente Folien gelegt und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

### 2.5.5 Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen

Um Interaktionen mitochondrialer Proteine mit kovalent gebundenen Partnerproteinen nachzuweisen, wurden typischerweise 50–200  $\mu$ g Mitochondrien in 20  $\mu$ l SDS-Puffer (1% SDS, 100 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM PMSF) resuspendiert und für 15 min bei 4°C geschüttelt. Das solubilisierete Material wurde 20-fach mit Lysepuffer (0,1% Triton X-100, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 20 mM Tris/HCl pH 7,4) verdünnt und kurz geschüttelt. Dieses Lysat wurde für 30 min bei 47000 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand wurde für die Immunpräzipitations-Experimente eingesetzt.

Für die Immunfällung wurden 40  $\mu$ l 50%ige PA-Sepharose (in 10 mM Tris/ HCl pH 7,4 gewaschen) in 100  $\mu$ l Lysepuffer gegeben und mit 5–10  $\mu$ l Serum oder 20–40  $\mu$ l gereinigtem Antikörper versetzt. Die Suspension wurde für 1 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die PA-Sepharose wurde dann in Lysepuffer gewaschen.

Das oben gewonnene Lysat wurde mit der antikörperbeladenen PA-Sepharose versetzt und 1–2 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die PA-Sepharose wurde 2x in Lysepuffer und ein weiteres Mal in Lysepuffer ohne Detergens gewaschen, bevor die Proteine durch Zugabe von 30  $\mu$ l Laemmli-Puffer abgelöst wurden.

### 2.5.6 Koimmunpräzipitation

Die Lyse der Mitochondrien und die Immunfällung erfolgte unter milden Konditionen in Lysepuffer (50 mM NaCl, 30 mM HEPES pH 7,4, 1% Digitonin), wobei die Detergentskonzentration in den späteren Waschschritten auf 0,05% reduziert wurde. Zur Solubilisierung wurden die Mitochondrien [2 mg/ml] für 30 min im Überkopfschüttler bei 4°C in Lysepuffer (mit 2 mM PMSF) inkubiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (100000 g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand auf die an die PA-Sepharose gekoppelten Antikörper gegeben. Die Koimmunpräzipitation wurde anschließend analog der Immunpräzipitation durchgeführt.

## 2.6 Computergestützte Methoden

### 2.6.1 Hydrophobizität von Transmembrandomänen

Für die Berechnung der minimalen und maximalen Hydrophobizität sowie der Helizität von Transmembrandomänen wurden die ProtScale Tools (ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics) verwendet. Die vorhergesagten Transmembrandomänen sowie die 5 flankierenden Aminosäuren wurden in einem 17 Aminosäuren umfassenden Fenster für die Berechnungen eingesetzt.

### 2.6.2 Generierung von Strukturmodellen

Mit den Programmpaketen MAIN und MOLSCRIPT wurden mögliche Modelle der N-terminalen Regionen von Tim17 generiert. Die Struktur wurde anhand der möglichen Topologie des N-Terminus von Tim17 aufgebaut, um eine potentielle intermolekulare Interaktion zu verdeutlichen. Transmembrandomänen sowie der N-Terminus von Tim17 wurden als  $\alpha$ -Helices angedeutet.

## 2.7 Puffer und Medien

Laktat-Medium:	3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Galaktose, 1 g/l Kaliumphosphat 1 g/l Ammoniumchlorid, 0,5 g/l Kalziumchlorid 0,5 g Natriumchlorid, 0,6 g/l Magnesiumsulfat, 0,3 ml/l Eisen(III)chlorid (1%), 2% Laktat, pH 5,5 mit KOH
Laemmlli-Puffer:	2% SDS, 5% $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid
LB <sup>Amp</sup> -Medium:	LB-Medium mit 100 $\mu$ g/ml Amp
LB-Platten:	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar
LB <sup>Amp</sup> -Platten:	LB-Platten mit 100 $\mu$ g/ml Amp
PBS:	16 mM Natriumhydrogenphosphat, 4 mM Kalium- dihydrogenphosphat, 115 mM Natriumchlorid
SEH:	0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 80 mM Hepes/KOH pH 7,4
Selektiv-Medium:	0,17% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% Glukose oder 2% Galaktose supplementiert mit entspr. Auxotrophiemarkern
Selektiv-Platten:	Selektiv-Medium mit 2% Agar (SC-Platten)
SOB-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l Natriumchlorid, 0,19 g/l Kaliumchlorid
SOC-Medium:	SOB-Medium supplementiert mit 20 mM Glukose, 10 mM Magnesiumchlorid
TBS-Puffer:	150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
YP-Medium:	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl
YP-Platten:	2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl
YPD-Medium:	YP-Medium mit 2% Glukose
YPD-Platten:	2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Glukose 2% Agar, pH 5,5 mit HCl
YPG-Medium:	YP-Medium mit 3% Glyzerin
YPG-Platten:	2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 3% Glyzerin 2% Agar, pH 5,5 mit HCl
YPGal-Medium:	YP-Medium mit 2% Galaktose
YPGal-Platten:	2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Galaktose 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

## 2.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

<b>Agfa-Gevaert,</b> Agfa, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
<b>Amersham Biosciences,</b> Freiburg:	m7G(5')ppp(5')G, PA-Sepharose, CNBr-aktivierte Sepharose
<b>Behring-Werke,</b> Marburg:	Freunds inkomplettes Adjuvans
<b>Bio-Rad,</b> Hercules, USA:	Bio-Rad-Proteinassay, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
<b>Calbiochem,</b> Merck, Darmstadt:	Digitonin
<b>CyrRX,</b> Norcross, USA:	TiterMax
<b>Difco,</b> Detroit, USA:	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base
<b>Finnzyme,</b> Espoo, Finnland:	<i>Taq</i> -DNS-Polymerase mit Puffer (DyNAzyme II, aus <i>Thermus brockianus</i> , rekombinant)
<b>Genomed,</b> Bad Oeynhausen:	Jetstar-Kit
<b>GIBCO-BRL,</b> Karlsruhe:	Agarose
<b>ICN,</b> Costa Mesa, USA:	<sup>35</sup> S-Methionin
<b>Invitrogen,</b> Karlsruhe:	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , pCR-TOPO
<b>Kodak,</b> Rochester, USA:	Biomax MR-1 Filme
<b>Metabion,</b> München:	Oligonukleotide
<b>Molecular Probes,</b> Eugene, USA:	AMS, DiSC <sub>3</sub> [5]
<b>New England Bio-</b> <b>labs,</b> Beverly, USA:	Restriktionsenzyme mit Puffer, T4-Ligase
<b>Novagen,</b> Madison, USA:	<i>E. coli</i> BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS
<b>Pierce,</b> Rochester, USA:	Quervernetzungsreagenzien
<b>Promega,</b> Heidelberg:	<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase (aus <i>Pyrococcus furiosus</i> ), SP6-RNS-Polymerase, SP6- und T7-Primer, RNasin ( <i>Ribonuclease Inhibitor</i> ) pGEM-Vektoren, Retikulozytenlysats
<b>Qiagen,</b> Hilden:	Kit QIAquick, Ni-NTA-Agarose

<b>Roche Diagnostics,</b> Mannheim:	SAP, CK, PK, dNTPs
<b>Schleicher &amp; Schuell,</b> Dassel:	Nitrozellulose-Membranen, Filterpapier
<b>Seikagaku Kogyo,</b> Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
<b>Serva,</b> Heidelberg:	Bisacrylamid, SDS, Bromphenolblau, Lysozym
<b>Sigma,</b> München:	Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), STI, BSA (fettsäurefrei), Leupeptin, PMSF
<b>Sigma-ARK,</b> Darmstadt:	Oligonukleotide
<b>Stratagene,</b> La Jolla, USA:	QuickChange-Kit

Feinchemikalien wurden je nach Verwendungszweck in den Qualitäten „reinst“, „zur Analyse“ oder „für biochemische Zwecke“ nach der Spezifikation von Merck, Darmstadt bezogen.

## 2.9 Geräte

<b>Amersham Biosciences,</b> Freiburg:	Spannungsversorgung, Flachbettscanner ImageScanner, Quantifizierungsprogramm ImageMaster, Chromatographiesysteme und Säulen
<b>Beckman Coulter,</b> Krefeld:	Kühlzentrifugen (Avanti), Ultrazentrifugen (Optima)
<b>Bio-Rad,</b> Hercules, USA:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
<b>Appligene,</b> Heidelberg:	Agarosegel Imaging-System
<b>Elma,</b> Singen:	Ultraschallbad Transsonic 310
<b>Eppendorf,</b> Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen Gradienten-PCR-Maschine Mastercycler Gradient
<b>Institutswerkstatt,</b> München:	Semidry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopf-Schüttler
<b>Kontron Instruments,</b> Watford, Großbritannien:	Spektrophotometer Uvikon 930
<b>Memmert,</b> Hannover:	Inkubatoren, Wärmeschränke
<b>MWG Biotech,</b> Ebersberg:	PCR-Maschine Primus
<b>Sigma Laborzentrifugen,</b> Osterode:	Tisch-Kühlzentrifugen

**Spex Industries,**

Edison, USA:                      Spektrofluorometer Spex FluoroMax

**Vacuumbrand, Wertheim:** Vakuumpumpe PC 2001 Vario



# Kapitel 3

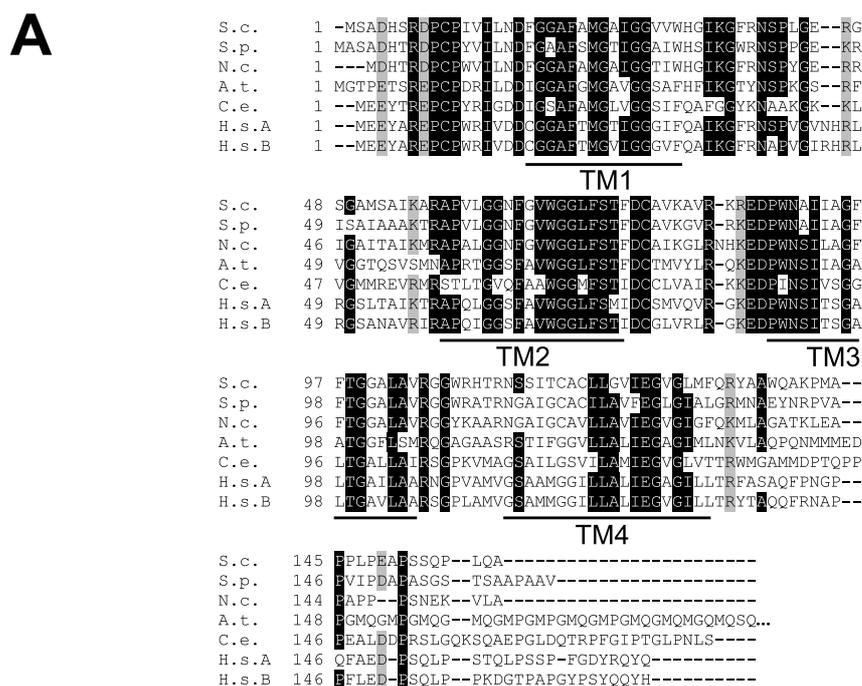
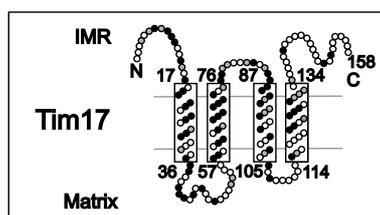
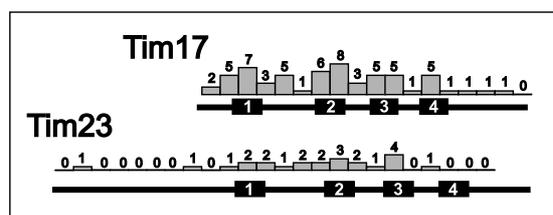
## Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von Tim17

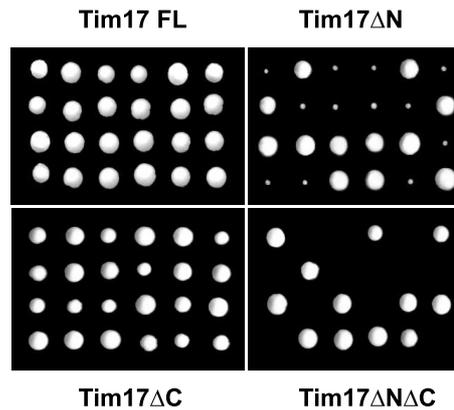
Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über die Struktur und Funktion von Tim17 nur sehr wenig bekannt. Das essentielle Tim17 gehört zu einer Familie von phylogenetisch verwandten Translokationskomponenten der mitochondrialen Innenmembran (TIMs) mit jeweils vier Transmembrandomänen, der Tim17, Tim23 und Tim22 angehören. Tim17-Homologe von Tieren, Pilzen und Pflanzen zeigen sehr hohe Sequenzidentität. Dagegen weist Tim23 einen geringeren Grad der Konservierung auf, wobei sich die N-terminale Rezeptordomäne zwischen verschiedenen Organismen besonders stark unterscheidet.

In Komplementationstudien konnte gezeigt werden, dass das Tim23-Protein von *N. crassa* einen *S. cerevisiae tim23*-Deletionsstamm komplementiert, wogegen *N. crassa* Tim17 eine *S. cerevisiae tim17*-Deletion nicht komplementieren kann (Dejana Mokranjac, persönliche Mitteilung). Demnach stellt die Assemblierung oder die Funktion von Tim17 höhere strukturelle Ansprüche an die Komplexpartner als Tim23. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine zentrale Funktion von Tim17 in der TIM23-Translokase hin, was den Ausgangspunkt für diese Arbeit darstellt.

Beinahe die Hälfte aller Aminosäuren zwischen dem humanen Tim17 und dem Tim17 in *S. cerevisiae* sind identisch (Abbildung 3.1). Diese hohe Sequenzidentität und speziell lokale Bereiche hoher Konservierung wurden als Grundlage für eine Deletionsanalyse entsprechender N- und C-terminaler Regionen herangezogen. Beide Termini sind im Intermembranraum lokalisiert, wobei der N-Terminus eine besonders hohe Konservierung aufweist.

**B****C**

**Abbildung 3.1 Tim17 ist ein stark konserviertes Membranprotein. A** Aminosäuresequenzvergleich von Tim17 Proteinen aus *S. cerevisiae* (S.c.) [23, 66], *Schizosaccharomyces pombe* (S.p.), *N. crassa* (N.c.), *Arabidopsis thaliana* (A.t.) [77], *Caenorhabditis elegans* (C.e.) und den beiden humanen Tim17-Homologen Tim17A und Tim17B (H.s.A und H.s.B). Von der Tim17-Sequenz von *Arabidopsis* sind nur die Aminosäurereste 1–185 aufgeführt. Die Ziffern weisen die entsprechenden Nummern der Aminosäurereste der jeweiligen Sequenz zu, und die Linien unterhalb der Sequenzen repräsentieren die vier vorhergesagten Transmembrandomänen (TM1–TM4). Identische oder ähnliche Aminosäuren sind durch schwarze bzw. graue Hinterlegung hervorgehoben. **B** Modellhafte Topologie von *S. cerevisiae* Tim17. Identische oder ähnliche Aminosäuren, die zwischen Mensch, *Arabidopsis* und Hefe konserviert sind, werden durch schwarze bzw. graue Kreise symbolisiert. IMR: Intermembranraum **C** Es wurden die homologen Sequenzen von Tim17 und Tim23 von *S. cerevisiae*, *Arabidopsis* und *Homo sapiens* einem Aminosäuresequenzvergleich unterzogen. Dieser Sequenzvergleich wurde in Blöcke von jeweils zehn Aminosäureresten unterteilt und die absolute Anzahl der konservierten Reste in allen drei Organismen pro Block berechnet. Darunter sind die je vier Transmembrandomänen der beiden Proteine symbolisiert. Der Vergleich von Tim17 mit Tim23 zeigt den hohen Grad an Konservierung großer Teile von Tim17.



**Abbildung 3.2 Tetradenanalyse von Tim17-Deletionsmutanten.** In dem diploiden Hefestamm BY4743 wurde zunächst eine genomische Kopie von TIM17 disruptiert und dieser Stamm mit Plasmiden transformiert, von denen unterschiedliche Tim17-Mutanten exprimiert wurden. Nach Sporulation wurden die Stämme einer Tetradenanalyse unterzogen. **Tim17FL**: Tim17 Aminosäurereste 1-158, **Tim17ΔN**: Tim17 Aminosäurereste 12-158, **Tim17ΔC**: Tim17 Aminosäurereste 1-134, **Tim17ΔNΔC**: Tim17 Aminosäurereste 12-134.

### 3.1.1 Tim17 weist ein konserviertes N-terminales Motiv auf

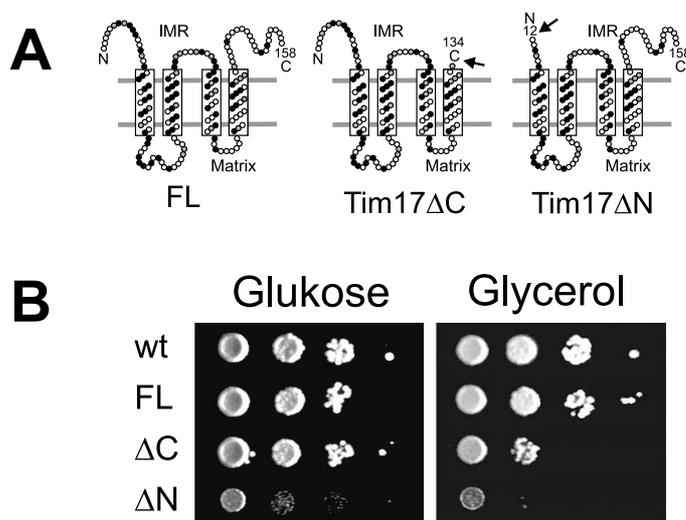
Um die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der löslichen Intermembranraumdomänen zu untersuchen, wurden entsprechende Regionen entweder einzeln oder gemeinsam deletiert. Dazu wurden trunkierte Formen von *tim17* in den Vektor pVT100U kloniert und in einen diploiden Hefestamm (BY4743) transformiert, in welchem eine genomische *TIM17*-Kopie durch eine Kanamycin-Resistenzkassette disruptiert war. Anschließend wurden die Stämme nach Sporulation einer Tetradenanalyse unterzogen (Abbildung 3.2) und ihr Genotyp über eine Uracil-Auxotrophie verifiziert. Über Replikaplattierung auf 5-FOA-haltige Selektivplatten wurden haploide Hefestämme gewonnen, welche eine genomische *tim17*-Disruption aufwiesen und die unterschiedlichen Varianten der Tim17-Mutanten von pVT100U Plasmiden exprimierten.

Wie bereits nach der Tetradenanalyse sichtbar war, hat die Tim17ΔN-Mutante einen starken Wachstumsdefekt. Die Deletion von beiden im Intermembranraum lokalisierten Termini von Tim17 (Tim17ΔNΔC) war letal.

### 3.1.2 Die Deletion des N-Terminus von Tim17 führt zu einem starken Wachstumsdefekt

Die haploiden Stämme, welche ausschließlich die unterschiedlichen Tim17-Mutanten exprimierten, wurden auf ihren Wachstumsphänotyp hin untersucht (siehe Abbildung 3.3B). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte der Tim17ΔC-Stamm auf YPD keinen und auf YPG Medium nur einen milden Wachstumsdefekt. Demnach ist der nicht

konservierte C-Terminus von Tim17 offensichtlich nicht für die Funktionsfähigkeit von Tim17 erforderlich und für das normale Zellwachstum nahezu verzichtbar. Dagegen führte die Deletion der N-terminalen 11 Aminosäurereste sowohl auf Medien mit fermentierbaren als auch auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu einem starken Wachstumsdefekt. Demzufolge scheint der N-Terminus wichtig für die Funktionsfähigkeit von Tim17 zu sein.

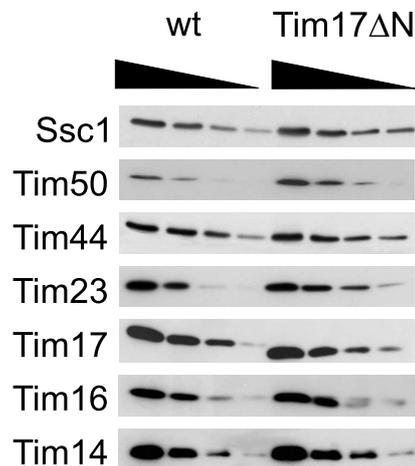


**Abbildung 3.3 Die 11 N-terminalen Aminosäuren von Tim17 sind wichtig für das Zellwachstum.** **A** Die Topologie von Tim17 und die der beiden Tim17-Deletionsmutanten ist wie in Abbildung 3.1B dargestellt. **B** Es wurden Wildtyp-Zellen (wt) oder  $\Delta$ tim17-Stämme, welche Tim17 (FL), Tim17 $\Delta$ C ( $\Delta$ C) oder Tim17 $\Delta$ N ( $\Delta$ N) exprimieren auf YP-Medium mit 2% Glukose oder 3% Glycerol in logarithmischer Wachstumsphase kultiviert. In serieller 10-facher Verdünnung wurden die entsprechenden Kulturen auf YP-Platten mit 2% Glukose oder 3% Glycerol aufgetragen und bei 30°C für zwei Tage (YPD-Platten) bzw. drei Tage (YPG-Platten) inkubiert.

### 3.1.3 Die Deletion des Aminoterminus von Tim17 übt keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des TIM23-Komplexes aus

Was ist die Ursache für den Wachstumsphänotyp von Tim17 $\Delta$ N? Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst die Integrität des TIM23-Komplexes mit seinen bekannten Untereinheiten untersucht. Zur Verifizierung der Stabilität der jeweiligen Untereinheiten der TIM23-Translokase wurden die Proteine der verschiedenen Mitochondrienpräparationen in serieller Verdünnung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde über Western Blot-Analyse überprüft, ob alle Untereinheiten in vergleichbaren Mengen vorlagen oder ob eventuell eine oder mehrere Untereinheiten aufgrund eines Import- oder Assemblierungsdefekts abgebaut wurden. In der

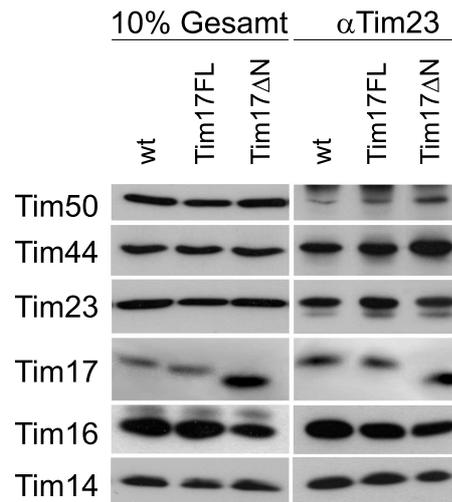
Tim17 $\Delta$ N-Mutante lagen alle bekannten Untereinheiten in einer Konzentration vor, die mit der des Wildtyps vergleichbar war (Abbildung 3.4). Als Folge der Überexpression von Tim17 $\Delta$ N konnten auch leicht erhöhte Mengen an Tim23 sowie Tim50 nachgewiesen werden, was durch eine Stabilisierung dieser Untereinheiten durch die erhöhten Mengen von Tim17 $\Delta$ N erklärt werden kann.



**Abbildung 3.4 In Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien liegen die TIM23-Untereinheiten in normalen Konzentrationen vor.** Es wurden Mitochondrien von Wildtyp-Zellen (wt) und von der Tim17 $\Delta$ N Mutante lysiert und serielle Verdünnungen (25, 12, 6 und 3  $\mu$ g Protein) durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die aufgeführten Proteine in einem Western Blot nachgewiesen.

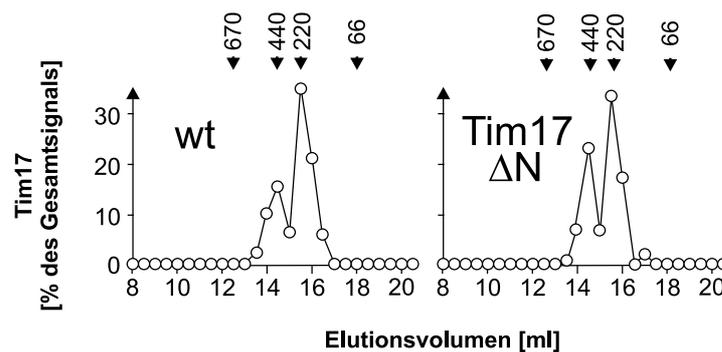
Liegen die Untereinheiten der TIM23-Translokase in korrekt assemblierten Komplexen vor? Um dies zu untersuchen wurden Mitochondrien unter milden Bedingungen lysiert (Lyse in Digitonin unter niedrigionischen Bedingungen) und der TIM23-Komplex über eine Koimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen Tim23 isoliert. Entsprechende Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Untereinheiten von TIM23 in Western Blots nachgewiesen (Abbildung 3.5). Dabei konnten in Tim17FL- und in Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien alle bekannten Untereinheiten des Tim23-Komplexes koisoliert werden. Die untersuchten Untereinheiten von TIM23 lagen demnach sowohl im Wildtyp als auch in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante assembliert vor.

Um das Molekulargewicht des TIM23-Komplexes in Wildtyp- und Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien zu bestimmen, wurden unter milden Bedingungen lysierte Mitochondrien einer Gelfiltration unterzogen. Entsprechende Fraktionen wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung von Tim17 in Western Blots ermittelt. Mithilfe der Densitometrie wurden die so erhaltenen Chromatogramme quantifiziert. In beiden Stämmen zeigte der TIM23-Komplex dabei ein identisches Migrationsverhalten: Eine Hauptfraktion zeigte eine Masse von etwa 280 kDa und eine kleinere Fraktion



**Abbildung 3.5 Der TIM23-Komplex liegt in Tim17ΔN-Mitochondrien assembliert vor.** Wildtyp-, Tim17FL- und Tim17ΔN-Mitochondrien (150 μg) wurden in Digitonin-Puffer lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden entweder direkt (Gesamt) oder nach einer Koimmunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen Tim23 (α Tim23) elektrophoretisch aufgetrennt. Über einen Western Blot wurden die verschiedenen Untereinheiten des TIM23-Komplexes nachgewiesen.

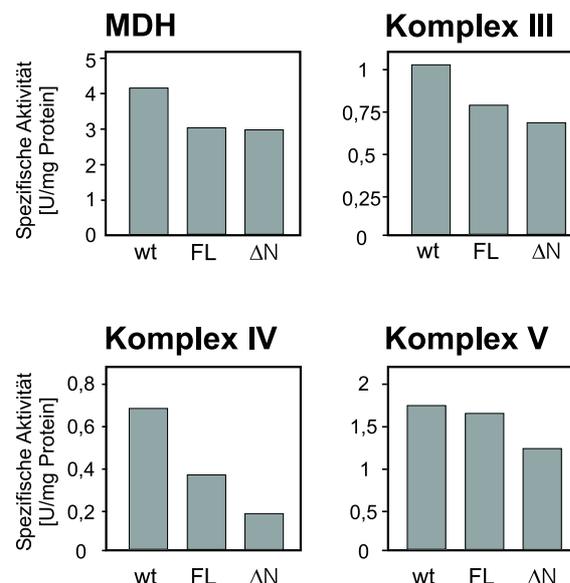
migrierte jeweils bei einem etwas höheren Molekulargewicht (Abbildung 3.6). Die hier gezeigten Daten belegen, dass die Deletion des N-Terminus von Tim17 keine strukturellen Veränderungen im TIM23-Komplex verursachte.



**Abbildung 3.6 Der TIM23-Komplex liegt in Tim17ΔN Mitochondrien in gleicher Größe vor.** Wildtyp- und Tim17ΔN-Mitochondrien (400 μg) wurden in einem Digitonin-puffer lysiert und die erhaltenen Proteinlysate über eine Gelfiltration aufgetrennt. Anschließend wurde Tim17 über Western Blots nachgewiesen. Die erhaltenen Signale wurde densitometrisch quantifiziert.

### 3.1.4 Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien haben eine reduzierte Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

Die Untersuchung von *steady state*-Mengen unterschiedlicher mitochondrialer Proteine über Western Blot-Analysen ergab zum Teil deutlich reduzierte Mengen von Proteinen, die mithilfe von typischen mitochondrialen Präsequenzen importiert werden. Dies wies auf einen Defekt der Proteintranslokation durch die TIM23-Translokase hin. Proteine, die unabhängig vom TIM23-Komplex importiert werden, waren dagegen nicht reduziert oder gar relativ angereichert. Unter den deutlich reduzierten Proteinen in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante befand sich die Untereinheit 5a der Cytochrom c-Oxidase. Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Deletion des N-Terminus von Tim17 auf die einzelnen Atmungskettenkomplexe hat, wurden die Enzymaktivitäten der Cytochrom c-Reduktase (Komplex III), der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) und der ATP-Synthase (Komplex V) bestimmt. Als Kontrolle wurde die Aktivität des Matrixenzym Malat-Dehydrogenase (MDH) bestimmt. Wie in Abbildung 3.7 gezeigt, waren in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante die spezifischen Enzymaktivitäten generell leicht reduziert. Dies resultiert wahrscheinlich aus einem generellen Importdefekt der Mutante, was geringere Enzymkonzentrationen zur Folge hat. Signifikant ist vor allem die Reduktion der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität der Tim17 $\Delta$ N-Mutante im Vergleich mit Mitochondrien des Wildtyps. Eventuell stellt eine Untereinheit dieses Enzymkomplexes besonders hohe Anforderungen an die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der TIM23-Translokase.



**Abbildung 3.7 Mitochondriale Enzymaktivitäten von Wildtyp-, Tim17FL- und Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien.** Es wurden die Enzymaktivitäten der Malat-Dehydrogenase (MDH) sowie die der Atmungskettenkomplexe III, IV und V bestimmt (siehe 2.4.4). Dabei wurde jeweils die spezifische Aktivität ermittelt und die absoluten Werte aufgetragen.

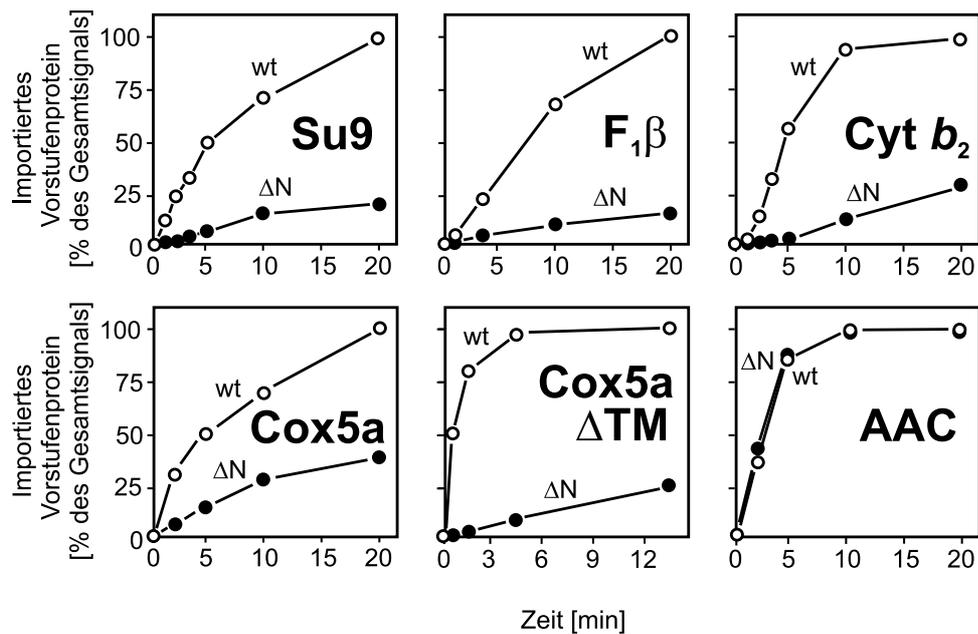
### 3.1.5 Die Deletion des N-Terminus von Tim17 führt zu einem starken Importdefekt für TIM23-spezifische Präproteine

Welche Folgen hat die Deletion des N-Terminus von Tim17 auf die Funktion der TIM23-Translokase? Da es sich bei Tim17 um eine essentielle Komponente eines Proteintranslokationskomplexes handelt, lag es nahe, die Tim17 $\Delta$ N-Mutante auf einen Proteinimportdefekt hin zu untersuchen. Verschiedene  $^{35}\text{S}$ -markierte Präproteine wurden in isolierte Mitochondrien importiert und ihre Importeffizienz quantifiziert. Für die Quantifizierung wurden zwei unterschiedliche Klassen von Proteinen gewählt: Zum einen Proteine, welche über einen Translokationsstopp in TIM23 in die mitochondriale Innenmembran inseriert werden und zum anderen Proteine, die durch TIM23 vollständig in die Matrix transloziert werden (siehe Abbildung 3.8).

Es wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Tim23 und Tim17 unterschiedliche Spezifitäten bezüglich der Präproteine aufweisen [91]. In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass rekombinantes rückgefaltetes Tim23 ausreicht, um von Präsequenzen regulierte Kanäle zu bilden [110]. Aufgrund der Homologie zu Tim23 und der strukturellen Vorhersagen könnte Tim17 eventuell auch in der Lage sein, Kanäle auszubilden. Hier stellt sich die Frage, was deren Funktion sein könnte, wenn Tim23 alleine den Proteintranslokationskanal ausbildet [91]. Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich ist, hat die Tim17 $\Delta$ N-Mutante sowohl für Proteine der mitochondrialen Matrix als auch für lateral in die Innenmembran sortierte Innenmembranproteine einen starken Importdefekt. Als Kontrollprotein wurde der ATP/ADP-Transporter importiert, welcher über die TIM22 Translokase importiert und inseriert wird. Dieses von TIM23 unabhängige Vorstufenprotein zeigte in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante im Vergleich mit Wildtyp-Mitochondrien kein verändertes Importverhalten.

### 3.1.6 Die Expression von Tim17 $\Delta$ N führt zu einer Reduktion des Membranpotentials

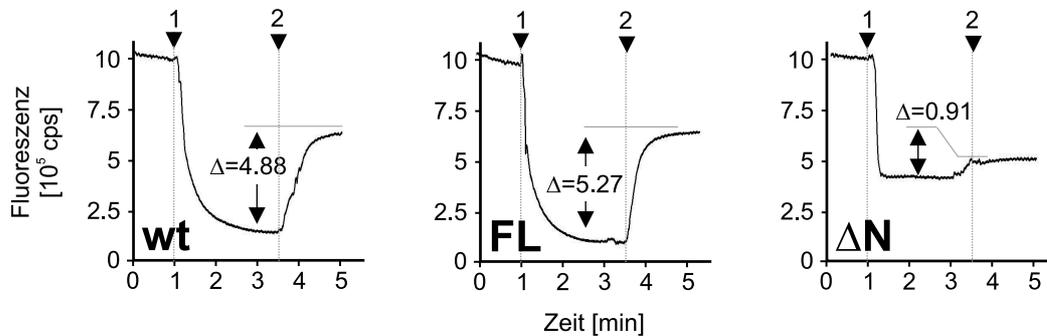
Was ist die Ursache für den Importdefekt der Tim17 $\Delta$ N-Mutante? Das über die mitochondriale Innenmembran anliegende Membranpotential ist für den Import von Präproteinen in die Innenmembran und in die Matrix essentiell. Ein erniedrigtes Membranpotential führt zu reduzierten Proteinimportraten [89]. Das Membranpotential kann über einen fluorometrischen Ansatz bestimmt werden, in welchem ein kationischer Fluoreszenzfarbstoff von Mitochondrien teilweise membranpotentialabhängig aufgenommen wird. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal geschwächt. Zerstört man anschließend das Membranpotential, führt dies zur Freisetzung des aufgenommenen Farbstoffs. Diese Signalzunahme korreliert mit dem relativen Mem-



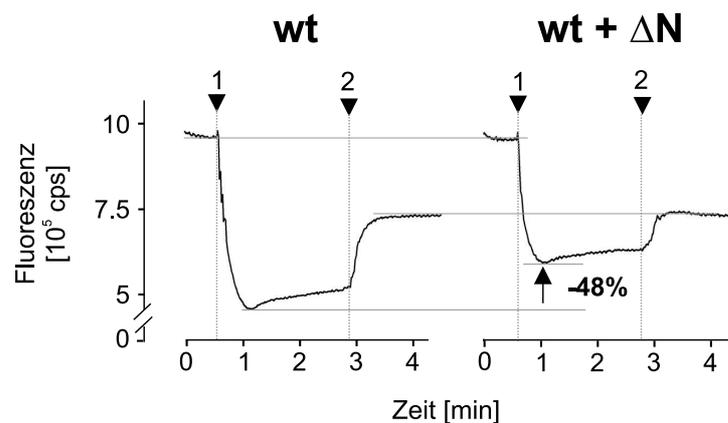
**Abbildung 3.8 Importdefekt der Tim17ΔN-Mutante für Präproteine, die über TIM23 importiert werden.** Es wurden folgende <sup>35</sup>S-markierte Präproteine *in vitro* synthetisiert: Su9(1-69)DHFR (Su9); Untereinheit β der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> – ATPase (F<sub>1</sub>β); Untereinheit 5a der Cytochromoxidase (Cox5a); Untereinheit 5a der Cytochromoxidase mit deletierter Transmembrandomäne (Cox5aΔTM); Cytochrom b<sub>2</sub> (Cyt b<sub>2</sub>) und ATP/ADP Transporter (AAC). Diese Präproteine wurden zu den aufgeführten Zeitpunkten mit Wildtyp-Mitochondrien oder mit Mitochondrien der Tim17ΔN-Mutante inkubiert. Alle Importreaktionen wurden bei 25°C durchgeführt mit Ausnahme der von Cox5a (bei 4°C) und der von Cox5aΔTM (bei 15°C) aufgrund ihrer schnellen Kinetik. Die Menge an importiertem Protein wurde nach Proteinase K-Behandlung (30 min bei 0°C), Autoradiographie und Quantifizierung der erhaltenen Signale via Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die maximale Importeffizienz für das jeweilige Präprotein auf 100% gesetzt.

branpotential. In Wildtyp-Mitochondrien (wt) und Mitochondrien, welche die Wildtyp-Form von *TIM17* auf einem Expressionsplasmid tragen (FL), konnte ein vergleichbares Membranpotential gemessen werden. Dagegen haben die Tim17ΔN-Mitochondrien (ΔN) ein deutlich erniedrigtes Membranpotential (ca. 20% von Wildtyp-Mitochondrien). Die reduzierten Proteinimportraten könnten sowohl die Ursache als auch die Folge des reduzierten Proteinimports darstellen (siehe Abbildung 3.9).

Diese Beobachtung weist auf einen unkontrollierten Protonenfluss über die Innenmembran der Tim17ΔN-Mutante hin. Erfolgt dabei die Protonendiffusion direkt durch den mutierten TIM23-Komplex, sollte die Expression der Tim17ΔN-Variante in Wildtyp-Zellen zu einem dominant negativen Effekt führen. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt ist dies tatsächlich der Fall: Die Expression von Tim17ΔN führt in Wildtyp-Mitochondrien zu einem erniedrigten Membranpotential (-48%). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Tim17ΔN-Mutation zu einem gestörten Regulationsverhalten (dem Öffnen und Schließen des Kanals) des TIM23-Kanals führt.



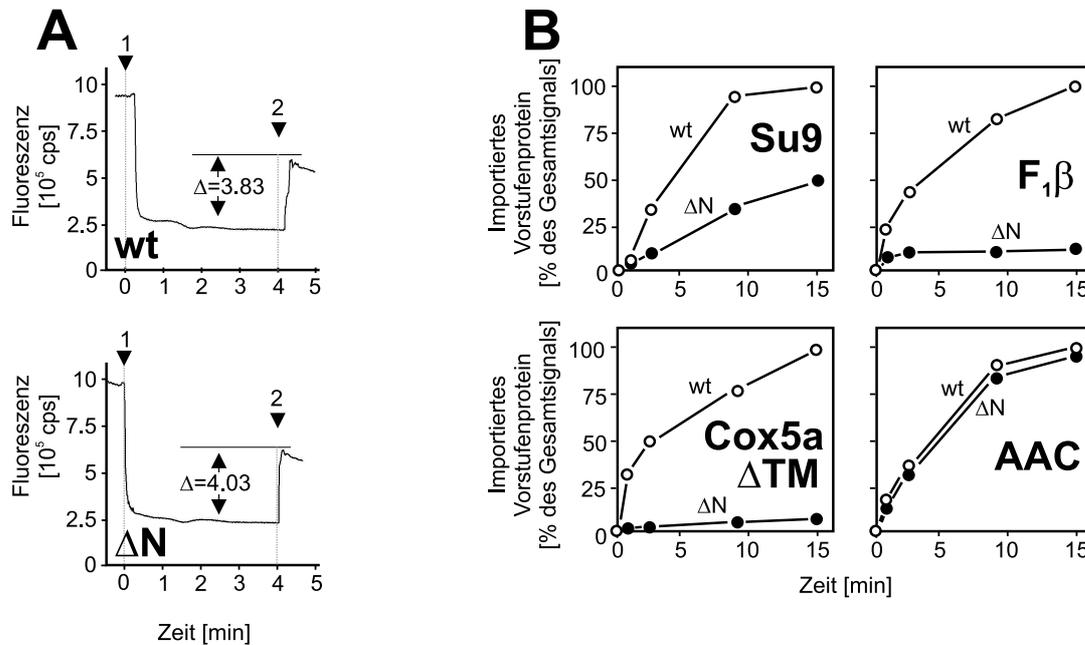
**Abbildung 3.9 Untersuchung des Membranpotentials.** Es wurde das relative Membranpotential von Mitochondrien von Wildtyp-Zellen (wt), Tim17FL (FL) und der Tim17 $\Delta N$ -Mutante ( $\Delta N$ ) bestimmt (wie in Material und Methoden beschrieben). Die Zugabe von Mitochondrien (Pfeil 1) sowie die Zugabe von Valinomycin und KCN (Pfeil 2) ist jeweils eingezeichnet. Die Membranpotential-abhängige Aufnahme des Farbstoffes DiSC<sub>3</sub>[5] führt zu einer Fluoreszenzabnahme. Die Zerstörung des Membranpotentials durch die Zugabe von Valinomycin führt zu einer teilweisen Freisetzung des Farbstoffes. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals korreliert mit dem Membranpotential. Die aus den Messungen resultierenden Differenzen der Fluoreszenzsignale sind für die jeweilige Mitochondrienart angegeben.



**Abbildung 3.10 Die Expression von Tim17 $\Delta N$  in Wildtyp-Zellen führt zu einem dominant negativen Effekt auf das mitochondriale Membranpotential.** Es wurden Mitochondrien eines Wildtyp-Stammes ohne (links) oder mit Tim17 $\Delta N$ -Expressionsplasmid (rechts) isoliert. Die Mitochondrien wurden mit 2 mM NADH energetisiert und das Membranpotential wie in Abbildung 3.9 bestimmt.

### 3.1.7 Der Importdefekt von Tim17 $\Delta$ N wird nicht durch ein reduziertes Membranpotential verursacht

Um die Proteinimportraten der verschiedenen Mitochondrienarten unabhängig von ihrem endogenen Membranpotential zu bestimmen, wurde ein künstliches Membranpotential über die Innenmembran aufgebaut. Dies wird mit der Hilfe des Kaliumionophor Valinomycin realisiert, welches selektiv Kaliumionen gegen andere monovalente Kationen über Lipidmembranen tauscht. Somit können Mitochondrien durch entsprechende Pufferbedingungen zunächst mit Kaliumionen „beladen“ werden. Anschließend werden diese Mitochondrien reisoliert und in natriumhaltigen Puffern in Gegenwart von Valinomycin resuspendiert, wodurch ein künstliches Membranpotential aufgebaut wird [35, 88]. Sowohl in Wildtyp-Mitochondrien als auch in Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien konnte so ein vergleichbares künstliches Membranpotential generiert werden (siehe Abbildung 3.11A). Wenn unter diesen Bedingungen mitochondriale Präproteine zu den Mitochondrien zugegeben wurden, zeigten die Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien weiterhin stark reduzierte Proteinimportraten (siehe Abbildung 3.11B). Dies konnte für drei unterschiedliche Präproteine gezeigt werden. Als Kontrollprotein diente der ATP/ADP-Transporter (AAC), welcher über die TIM22-Translokase importiert und inseriert wird. Demzufolge wird die reduzierte Importeffizienz der Tim17 $\Delta$ N-Mutante nicht indirekt über das reduzierten Membranpotential verursacht, sondern primär durch einen Translokationsdefekt.

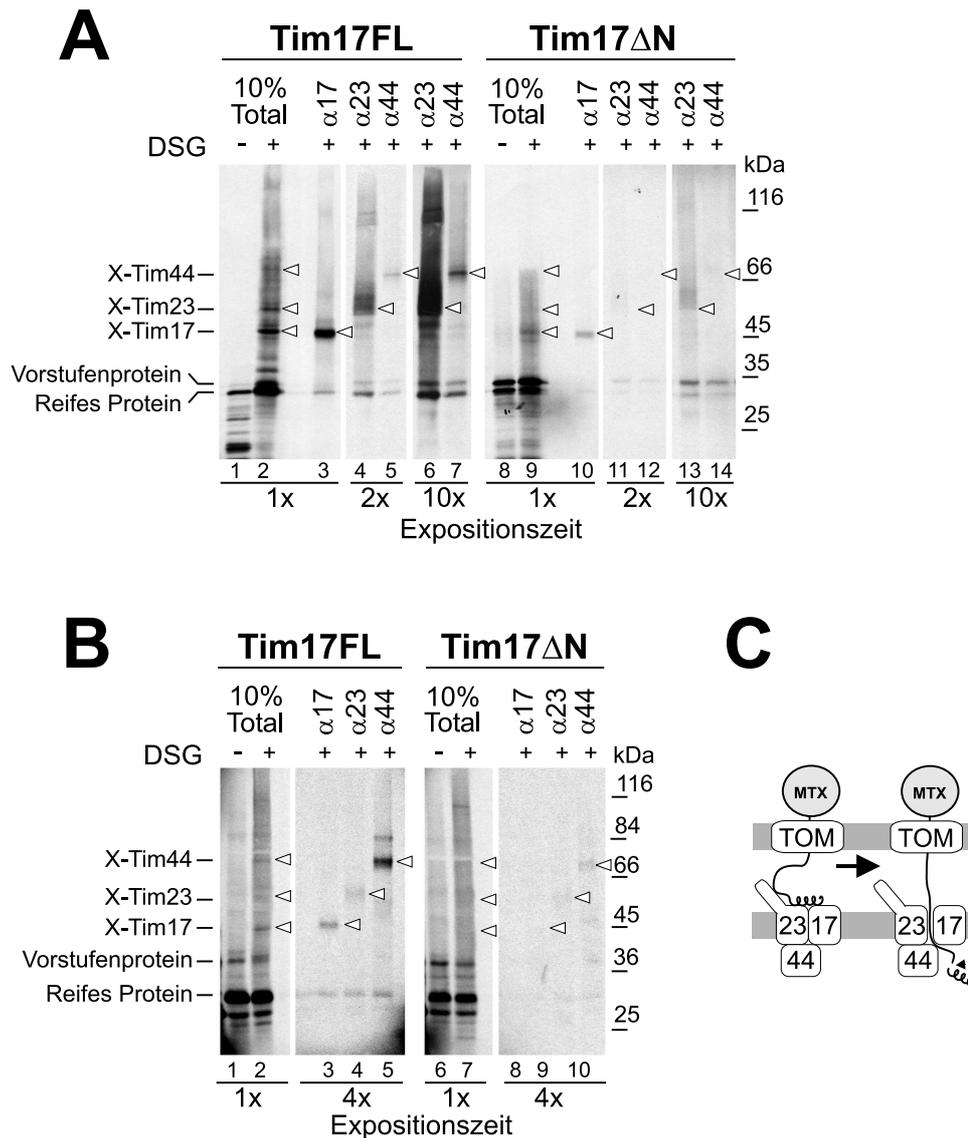


**Abbildung 3.11 Das reduzierte Membranpotential von Tim17 $\Delta N$  ist nicht für den Importdefekt verantwortlich.** **A** Durch ein Kalium-Diffusionspotential kann in Wildtyp- und in Tim17 $\Delta N$ -Mitochondrien ein vergleichbares künstliches Membranpotential aufgebaut werden. Dazu wurden die Mitochondrien für 10 min in 600 mM Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 20 mM KCl, 1  $\mu$ M Valinomycin und 30  $\mu$ M Oligomycin und 2 mM ATP inkubiert. Die Mitochondrien wurden resoliert und in einem Puffer mit 600 mM Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 20 mM NaCl, 1  $\mu$ M Valinomycin und 60  $\mu$ M Oligomycin resuspendiert. Durch die von Valinomycin vermittelte Diffusion von Kaliumionen von der Matrix in das Medium wurde ein künstliches Membranpotential über die Innenmembran aufgebaut. Das Membranpotential wurde wie in Abbildung 3.9 bestimmt. **B** In Wildtyp- und in Tim17 $\Delta N$ -Mitochondrien wurde ein künstliches Membranpotential aufgebaut und die Importkinetiken von Su9(1-69)DHFR (Su9), Untereinheit  $\beta$  der  $F_1F_0$  – ATPase ( $F_1\beta$ ), der Untereinheit 5a der Cytochromoxidase mit deletierter Transmembrandomäne (Cox5a $\Delta TM$ ) sowie die des ATP/ADP-Transporters (AAC) wie in Abbildung 3.8 beschrieben bestimmt.

### 3.1.8 In Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien ist die Translokation von Präproteinen über den TIM23-Komplex stark inhibiert

Um zu untersuchen, auf welcher Ebene der Importreaktion der Transport von Präproteinen in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante inhibiert wird, wurden definierte Translokationsintermediate in der TIM23-Translokase chemisch quervernetzt. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus dem in die Matrix sortierten Protein Cox5a $\Delta$ TM und der Dihydrofolatreduktase aus Maus konstruiert. Durch Zugabe des Fولاتanalogen Methotrexat wurde die DHFR-Domäne stabil gefaltet und das Fusionsprotein mit Tim17FL oder Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien inkubiert. Die gefaltete DHFR-Domäne verhinderte eine vollständige Translokation in die mitochondriale Matrix und dadurch akkumulierte das Präprotein als Translokationsintermediat. Die Präsequenz des Präproteins kann im Intermembranraum oder in der Matrix lokalisiert sein (Abbildung 3.12C).

Um die molekularen Kontakte der Translokationsintermediate mit Komponenten der TIM23-Translokase zu bestimmen, wurden die Importreaktionen mit dem chemischen Quervernetzer Disuccinimidylglutarat (DSG) versetzt. Die Proben wurden entweder direkt oder nach einer Immunpräzipitation mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Tim17, Tim23 und Tim44 (Abbildung 3.12A) elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Da das Cox5a $\Delta$ TM-DHFR-Präprotein nur wenige Lysinreste auf der *trans*-Seite der Innenmembran präsentiert, welche eine Quervernetzung mit Komponenten der mitochondrialen Matrix ermöglichen, erfolgte mit diesem Substrat keine effiziente Quervernetzung zu Tim44 (Abbildung 3.12A, Spur 5 und 7). Aus diesem Grund wurde das Experiment mit einem weiteren Protein wiederholt: Dieses Fusionsprotein aus einer in die Matrix sortierten Form von Cyt $b_2$  und DHFR enthält fünf zusätzliche Lysinreste, welche in einem arretierten Translokationsintermediat in der Matrix lokalisiert sind [102]. Dies erlaubt eine effiziente Quervernetzung zu Matrixkomponenten mit Tim44 (Abbildung 3.12B, Spur 5). Auch unter diesen Bedingungen konnten in den Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien kaum Quervernetzungsaddukte zu Tim44 nachgewiesen werden (Abbildung 3.12B, Spur 10).



**Abbildung 3.12 Die Deletion des N-Terminus von Tim17 inhibiert die Translokation von Präproteinen über den TIM23-Komplex. A** In Tim17FL und in Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien wurden Translokationsintermediate des Fusionsproteins Cox5a $\Delta$ TM-DHFR hergestellt, wobei die DHFR-Domäne durch Zugabe von Methotrexat stabil gefaltet war. Dies verhinderte den vollständigen Import des Präproteins. Nach 5 min bei 25°C wurden 200  $\mu$ M des chemischen Quervernetzers DSG zugegeben. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde die Reaktion mit 100 mM Glycin gestoppt. Die Mitochondrien wurden gewaschen und lysiert. Die Spuren 1 und 8 zeigen Kontrollreaktionen ohne DSG, die Spuren 'Total' repräsentieren die Reaktionen, welche für die Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Die Immunpräzipitationen wurden mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Tim17 ( $\alpha$ 17), Tim23 ( $\alpha$ 23) und Tim44 ( $\alpha$ 44) durchgeführt. Die Proben wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und unterschiedlich lang auf Röntgenfilmen exponiert (Angaben unterhalb der Gele). **B** Es wurden die Interaktionspartner der TIM23-Translokase zu den Translokationsintermediaten von Cyb<sub>2</sub>(1 – 167 $\Delta$ 19)K<sub>5</sub>DHFR wie in A beschrieben untersucht. **C** Mögliche Topologien eines arretierten Translokationsintermediats, bei dem die C-terminale DHFR-Domäne der Fusionsproteine durch die Zugabe von Methotrexat (MTX) stabil gefaltet vorliegt.

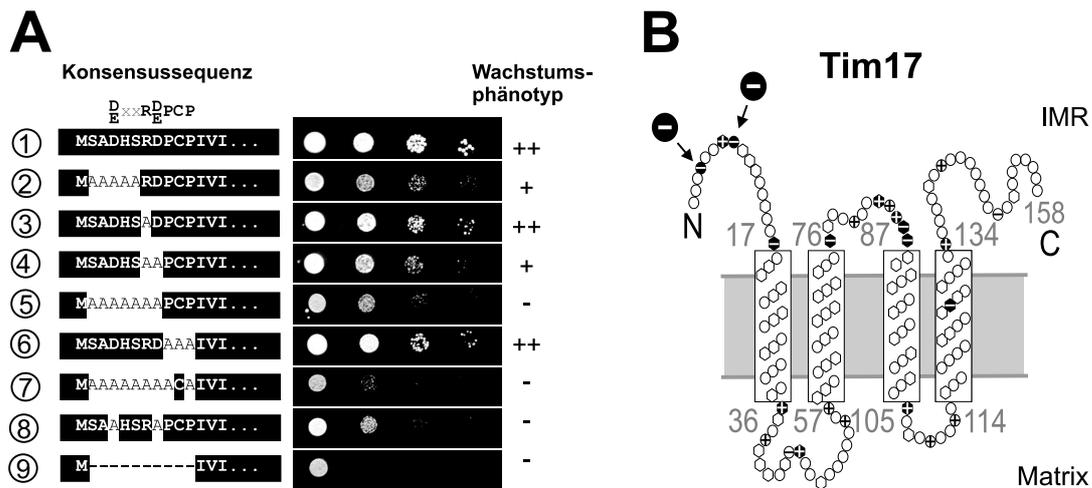
Die Immunpräzipitationen der quervernetzten Translokationsintermediate zeigten deutlich, dass die Präproteine in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante eine andere molekulare Umgebung haben als im Wildtyp bzw. in Tim17FL-Mitochondrien. In den Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien konnten spezifische Kontakte der Präproteine zu Tim17 und Tim23 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Tim17FL-Mitochondrien waren diese Kontakte jedoch deutlich reduziert und zu dem in der Matrix lokalisierten Tim44 waren in Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien keine Kontakte mehr nachweisbar. Entsprechende Addukte sind in Tim17FL-Mitochondrien bereits deutlich nach Zugabe des Quervernetzers DSG zu sehen (Total) und konnten durch Immunpräzipitationen bestätigt werden.

Folglich inhibierte die Deletion des N-Terminus von Tim17 die Translokation von Präproteinen durch den proteinleitenden Kanal des TIM23-Komplexes. Darauf deuteten sowohl die Akkumulation von Präprotein-Formen als auch die stark reduzierten Quervernetzungseffizienzen zu Untereinheiten der TIM23-Translokase in der Tim17 $\Delta$ N-Mutante hin.

### 3.1.9 Zwei konservierte negative Ladungen im N-Terminus von Tim17 sind von besonderer Bedeutung

Um die für die Funktionalität des TIM23-Translokons entscheidenden Aminosäuren im N-Terminus von Tim17 zu bestimmen, wurden einzelne oder mehrere Positionen dieser Domäne durch Alaninreste ersetzt. Diese mutierten Tim17-Formen wurden von Plasmiden (pRS315) unter endogenem *TIM17*-Promotor in Hefestämmen mit disruptiertem genomischem *TIM17* exprimiert (Abbildung 3.13A). Dabei stellte sich heraus, dass zwei konservierte Aspartatreste in Position 4 und 8 von Tim17 von besonderer Bedeutung waren. Der Wachstumsphänotyp dieser Mutante (Tim17<sup>D4AD8A</sup>, DD $\rightarrow$ AA) entsprach am ehesten dem Wachstumsphänotyp der Tim17 $\Delta$ N-Mutante.

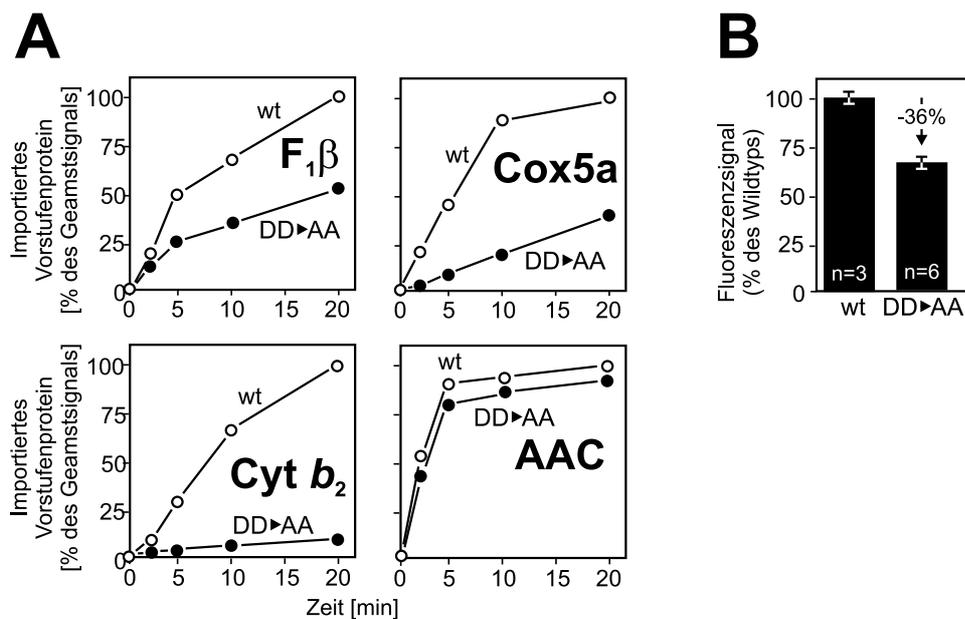
Die stark konservierten Ladungen im N-Terminus von Tim17 und ihre funktionelle Relevanz deuten auf die Wichtigkeit ionischer Wechselwirkungen im TIM23-Komplex hin. Zum einen sind Wechselwirkungen der negativ geladenen Aspartatreste im N-Terminus von Tim17 mit den positiv geladenen Präsequenzen denkbar (Abbildung 3.13B), zum anderen könnten inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen im Komplex eine zentrale Rolle bei der Regulation der Translokase spielen.



**Abbildung 3.13** Konservierte negative Ladungen im N-Terminus von Tim17 sind von großer Wichtigkeit für das Wachstum. **A** Es wurden verschiedene Tim17-Mutanten generiert, welche unter dem endogenen Promotor von *TIM17* exprimiert wurden. Die erste Reihe zeigt den Wildtyp, die Reihen 2–8 zeigen verschiedene Punktmutanten (die entsprechenden Sequenzen sind in der linken Spalte aufgeführt), in denen spezifische Aminosäurereste zu Alaninresten mutiert wurden. Zum Vergleich ist in Reihe 9 der Wachstumsphänotyp der Tim17 $\Delta$ N-Mutante dargestellt. Die entsprechenden Vorkulturen wurden in logarithmischer Wachstumsphase auf YPD-Medium kultiviert, seriell verdünnt und auf YPD-Platten bei 30°C für 2 Tage inkubiert. Über der Abbildung der Aminosäuresequenzen ist die konservierte Konsensussequenz des N-Terminus von Tim17 eingezeichnet. **B** Die Positionen der beiden konservierten negativen Ladungen sind in einem Topologiemodell eingezeichnet. Konservierte Reste werden durch Hexagone symbolisiert, die Symbole konservierter Ladungen sind dunkel hinterlegt. IMR: Intermembranraum

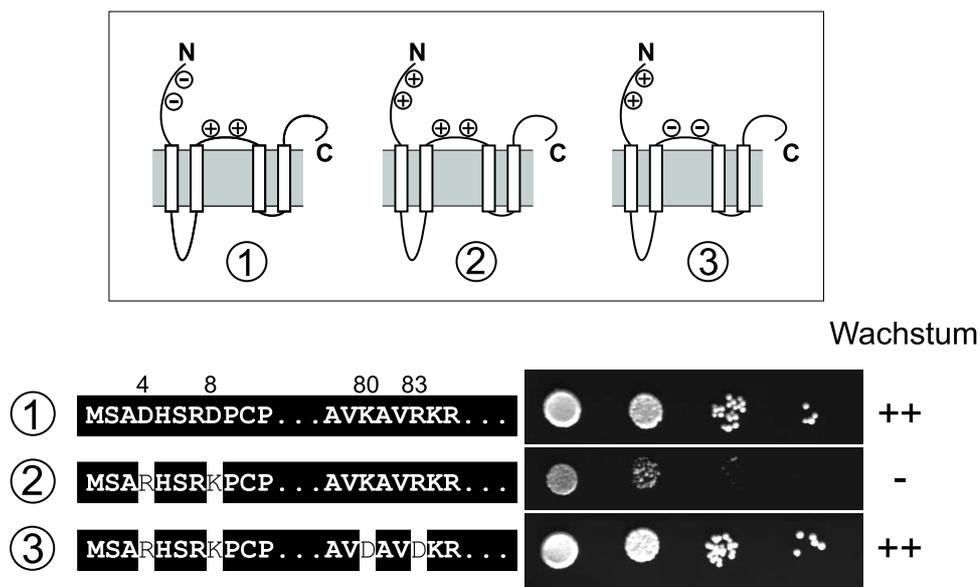
### 3.1.10 Die Neutralisation der negativen Ladungen im N-Terminus von Tim17 führt zu einem Importdefekt und zu einer Reduktion des Membranpotentials

Wodurch wird der Wachstumsphänotyp der Tim17-Ladungsmutante (DD→AA) verursacht? Es wurde untersucht, ob die Neutralisation der beiden konservierten Ladungen im N-Terminus von Tim17 zu ähnlichen funktionalen Defekten wie in der Tim17ΔN-Mutante führen würde. Dazu wurden Importkinetiken von verschiedenen Präproteinen ermittelt und das mitochondriale Membranpotential bestimmt (Abbildung 3.14). Dabei zeigte die Tim17 DD→AA-Mutante einen ausgeprägten Importdefekt für Präproteine, welche über den TIM23-Komplex importiert werden. Des Weiteren wiesen die Mitochondrien dieses Stammes eine signifikante Reduktion des Membranpotentials auf (-36%). Dies führt zu dem Schluss, dass der größte Teil der funktionellen Defekte der Tim17ΔN-Mutante durch den Verlust der beiden konservierten Aspartatreste im N-Terminus von Tim17 verursacht wurde.



**Abbildung 3.14 Importdefekt und Reduktion des Membranpotentials der N-terminalen Tim17-Ladungsmutante.** **A** Es wurden die Importkinetiken von Präproteinen in Wildtyp-Mitochondrien und von Mitochondrien eines Stammes untersucht, in dem die Aspartatreste an Position 4 und 8 zu Alaninresten mutiert wurden (DD→AA) (siehe Abbildung 3.8). **B** Das mitochondriale Membranpotential wurde wie in Abbildung 3.9 bestimmt. Das relative mitochondriale Membranpotential der wildtypischen Mitochondrien wurde auf 100% gesetzt und mit den Messergebnissen der DD→AA-Mutante verglichen.

Der Wachstumsdefekt der DD→AA-Mutante und die starke Konservierung der beiden Aspartatreste an Position 4 und 8 in Tim17 deuten auf mögliche ionische Wechselwirkung des N-Terminus mit positiv geladenen Proteindomänen hin. Tim17



**Abbildung 3.15** Der Austausch weiterer geladener Aminosäuren supprimiert Ladungsmutationen im N-Terminus von Tim17. Die konservierten geladenen Aminosäurereste wurden wie in der Abbildung dargestellt mutagenisiert. Die oben aufgeführten Modelle verdeutlichen die mögliche Topologie des (1) Wildtyps, (2) die der Tim17<sup>D4R D8K</sup>-Mutante (DD→RK) und (3) die der Tim17<sup>D4R D8K K80D R83D</sup>-Mutante (DD→RK/KR→DD). Die Wachstumsphänotypen wurden wie in Abbildung 3.13A beschrieben untersucht.

präsentiert noch weitere konservierte Ladungen im Intermembranraum: Der Loop zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (siehe Abbildung 3.13B) enthält zwei konservierte positiv geladene Aminosäurereste an Position 80 und 83. Um eine mögliche Interaktion des N-Terminus mit diesen Ladungen zu verifizieren (siehe Modell in Abbildung 3.15 (1) oben), wurden die ursprünglich negativ geladenen Aminosäurereste des N-Terminus in positiv geladene Reste mutiert (Tim17<sup>D4R D8K</sup>-Mutante, (DD→RK)). Das in Abbildung 3.15 (2) oben gezeigte Modell veranschaulicht die mögliche wechselseitige Abstoßung der nun identisch geladenen Proteindomänen. Die DD→RK-Mutante zeigte ebenfalls einen starken Wachstumsdefekt. Dieser Wachstumsdefekt konnte durch die zusätzliche Mutation der positiv geladene Reste an Position 80 und 83 in negativ geladene Aspartatreste vollständig aufgehoben werden (Tim17<sup>D4R D8K K80D R83D</sup>-Mutante, (DD→RK / KR→DD)). Somit sind wahrscheinlich intermolekulare ionische Wechselwirkungen in Tim17 von entscheidender Bedeutung für die Funktion der TIM23-Translokase.

## 3.2 Topogenese mitochondrialer Innenmembranproteine

Die im Cytosol synthetisierten Präproteine mit N-terminaler Präsequenz werden durch den TOM-Komplex über die mitochondriale Außenmembran transportiert und im Intermembranraum an den TIM23-Komplex weitergeleitet. Der Import über die Innenmembran in die Matrix ist ATP- und Membranpotential-abhängig. In der Matrix werden die Präsequenzen der Proteine proteolytisch entfernt.

Innenmembranproteine können ihre Topologie auf zwei unterschiedlichen Sortierungswegen erreichen: Über die Stop-Transfer-Sortierung und über die konservative Sortierung. Somit hat die TIM23-Translokase die Aufgabe, zwei Arten von hydrophoben Bereichen zu unterscheiden und diese Signale entsprechend umzusetzen.

In einer vorangegangenen Studie konnte der wichtige Beitrag eines Motivs aus geladenen Aminosäureresten gezeigt werden, welches einer hydrophoben Domäne C-terminal folgt und die Arretierung des Präproteins fördert [93]. Dies konnte zwar für die untersuchte *D*-Laktatdehydrogenase (Dld1) nachgewiesen werden, allerdings sind solche Bereiche geladener Aminosäurereste nicht generell in Stop-Transfer sortierten Proteinen vorhanden.

### 3.2.1 Prolinreste sind charakteristisch für transferierte Transmembrandomänen

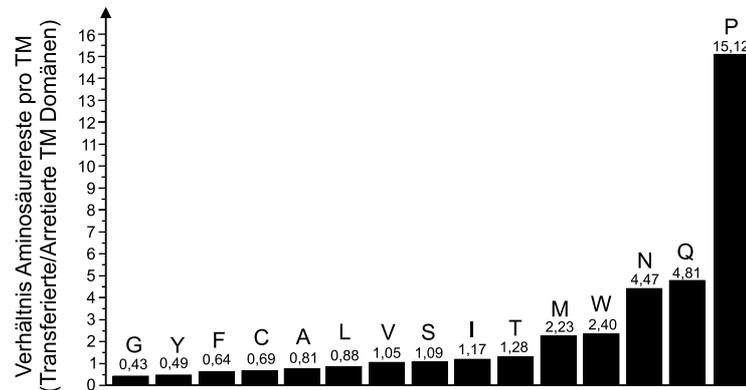
Die Topologie verschiedener Proteine der mitochondrialen Innenmembran in *S. cerevisiae* wurde bestimmt und ihr Sortierungsweg experimentell aufgeklärt. In Abbildung 3.16 sind die Transmembrandomänen dieser Proteine aufgelistet, geordnet nach ihrem Sortierungsweg: Arretierte Sequenzen sind links gezeigt, transferierte rechts. Die berechneten Hydrophobizitätswerte zeigen eine große Varianz innerhalb der beiden Klassen, wobei die Stop-Transfer sortierten Proteinsequenzen (mittlere Hydrophobizität 0,83 – 1,78) tendenziell etwas hydrophober sind als konservativ sortierte Proteinsequenzen (mittlere Hydrophobizität 0,62 – 1,52). Nicht alle Sequenzen folgen diesem Trend: Die Hydrophobizität der Transmembrandomänen von Dld1 und Sco1 ist beispielsweise niedriger als die vieler konservativ sortierter Proteine, so dass noch weitere Parameter relevant sein müssen. Auffällig ist eine deutliche Anreicherung von Prolinresten in transferierten Sequenzen (Abbildung 3.16). Prolinreste sind in fast allen konservativ sortierten Transmembrandomänen zu finden, in Stop-Transfer sortierten Segmenten aber praktisch nie; die einzige Ausnahme stellt Yme2 dar, welches eine besonders hohe Hydrophobizität zeigt.

Arretierte TM Domänen			Transferierte TM Domänen		
N	TM Domäne	C	N	TM Domäne	C
Cbp4	-VYAIGGAIIGSGP <sup>P</sup> LLF-	0,9/1,6	Cox18(TM1)	-ASH <sup>P</sup> T <sup>P</sup> WIVLV <sup>P</sup> LT <sup>P</sup> TMTL-	0,7/1,3
Cox5a	-GVAAGLLFSVGLFAVV-	1,7/2,0	Cox18(TM2)	-NALI <sup>P</sup> EMVQI <sup>P</sup> LWVTVSMGI-	0,8/1,6
Cox5b	-GVFLGLGISFGLFGLV-	1,5/1,8	Cox18(TM3)	-LSS <sup>P</sup> ELVAM <sup>P</sup> LLA <sup>P</sup> LLVGT <sup>P</sup> LAVLNV-	1,0/2,3
Cyt1	-LVTAGVAAAGITALLLYA-	0,8/1,7	Cox18(TM4)	-LGCVVMLAMSSQ <sup>P</sup> PLLSLY-	0,9/1,7
Dld1	-YSVIASSATLFGYLFA-	0,5/1,1	Cox18(TM5)	-ISSQLFSLVVQNIILNWI-	0,8/1,2
Hem14	-VAVVGGVSGLCFTYFLS-	0,6/1,7	Mba1	-NIPNVFA <sup>P</sup> PIVANALI-	0,3/1,2
Oms1	-YMIGAYVIFLIYGLFFT-	1,0/1,9	Mrs2(TM1)	-VTIYTLGFTVASV <sup>P</sup> PAFYGMNL-	1,2/1,6
Sco1	-AIALFLAVGGALSYPFN-	1,3/1,7	Mrs2(TM2)	-WGP <sup>P</sup> TSVAVFSIVSALYIT-	0,5/1,7
Sco2	-ATIALLLSGGTYAYLS-	0,5/1,3	Oxa1(TM1)	-AVHVYSGI <sup>P</sup> EWGTIAATLLI-	0,1/1,0
She9	-TSTWGTFILMGMNIFLFIVLQLLL-	0,0/2,5	Oxa1(TM2)	-WLA <sup>P</sup> EMLQI <sup>P</sup> HALGFFNAL-	0,5/1,4
Tim50	-FYIFSLSALTGTAIYMA-	-0,2/1,4	Oxa1(TM3)	- <sup>P</sup> FLGLQVITA <sup>P</sup> AVFISFT-	0,2/1,5
Yme1	-WLLVFGILTYSFS-	0,9/1,5	Oxa1(TM4)	-LFTI <sup>P</sup> PI <sup>P</sup> ISI <sup>P</sup> ATMNLSSAV-	0,9/1,5
Yme2	-I <sup>P</sup> AL <sup>P</sup> LVLFALLSIFAVLVF-	1,3/2,9	Oxa1(TM5)	-VLYFAENGAFSVLQTMIL-	1,4/1,6
	Mittelwert: 0,83/1,78		Rip1	-SYAYFMVGAMGLSSAGA-	0,2/1,2
			Tcm62	-VGINAVLSAVI <sup>P</sup> PS-	0,7/1,6
			Yta10(TM1)	-FANTMFLTIGFTIIF <sup>P</sup> TL <sup>P</sup> IP-	0,2/1,8
			Yta10(TM2)	-SS <sup>P</sup> FTFL <sup>P</sup> IP <sup>P</sup> IP <sup>P</sup> TIILLGGLYPIT-	0,2/1,7
				Mittelwert: 0,62/1,52	

**Abbildung 3.16 Transmembrandomänen von Stop-Transfer sortierten und konservativ sortierten Proteinen zeigen einen unterschiedlicher Gehalt an Prolinresten.** Proteine der mitochondrialen Innenmembran mit bekannter Topologie sind aufgelistet und aufgrund ihres Sortierverhaltens in zwei Klassen eingeteilt. Bitope Proteine, für welche eine Stop-Transfer-Sortierung nachgewiesen bzw. nahegelegt wurde, sind in der linken Tabelle aufgeführt. In der rechten Tabelle sind Proteine aufgeführt, für die eine konservative Sortierung experimentell belegt wurde. Die entsprechend vorhergesagten Transmembrandomänen der Proteine sind aufgelistet und Prolinreste sind schwarz hinterlegt. Die minimale und maximale Hydrophobizität wurde für die vorhergesagten Transmembrandomänen berechnet und ist jeweils rechts von den Sequenzen aufgeführt (Methode siehe 2.6.1).

Weisen die transferierten und die arretierten Transmembrandomänen eine unterschiedliche Verteilung an Aminosäureresten auf? Für die in Abbildung 3.16 vorgestellten Proteine mit experimentell verifiziertem Sortierverhalten wurden die relativen Häufigkeiten der einzelnen Aminosäurereste bestimmt. Für jede Gruppe wurde für jeden vertretenen Aminosäurerest der Quotient aus der Anzahl der einzelnen Aminosäurereste und der Anzahl aller Reste gebildet. Das Verhältnis dieser Werte für die transferierten und den arretierten Transmembrandomänen ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die meisten Aminosäurereste sind dabei ähnlich verteilt. Auffallender Weise sind Prolinreste in transferierten Transmembrandomänen extrem angereichert: Sie treten über 15-fach häufiger in transferierten Transmembrandomänen auf als in arretierten Transmembrandomänen. Andererseits waren Glycinreste in transferierten Transmembrandomänen aber deutlich seltener vertreten (um Faktor 2,33). Obwohl Glycinreste - wie Prolinreste - eine helixdestabilisierende Funktion ausüben

können, stellen sie auch wichtige Motive für die Interaktion von zwei benachbarten Transmembrandomänen dar.

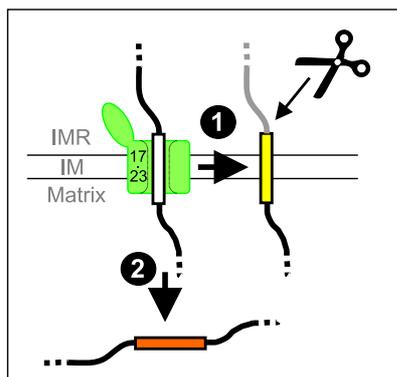


**Abbildung 3.17 Prolinreste sind in transferierten Transmembrandomänen stark angereichert.** Die Transmembrandomänen der in Abbildung 3.16 aufgeführten Proteine wurden auf ihren Gehalt an Aminosäureresten hin untersucht. Dazu wurden die transferierten Transmembrandomänen mit den arretierten Transmembrandomänen verglichen und für jeden Aminosäurerest der Quotient aus den beiden Gruppen berechnet.

### 3.2.2 Prolinreste in Transmembrandomänen verändern das Sortierungsverhalten

Das intramitochondriale Sortierverhalten von Innenmembranproteinen wurde anhand von *in vitro*-Importexperimenten mit radioaktiv markierten Reporterproteinen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Sortierungsverhalten gezielt manipuliert, so dass für ein ursprünglich Stop-Transfer sortiertes Protein eine konservative Sortierung bewirkt werden konnte und umgekehrt. Um die intramitochondriale Sortierung über den TIM23-Komplex zu untersuchen, wurde Cox5a als Reporterprotein eingesetzt [36]. Dieses bitope Membranprotein wird vom TIM23-Komplex über eine Stop-Transfer-Sortierung in die Innenmembran inseriert (siehe Abbildung 3.18).

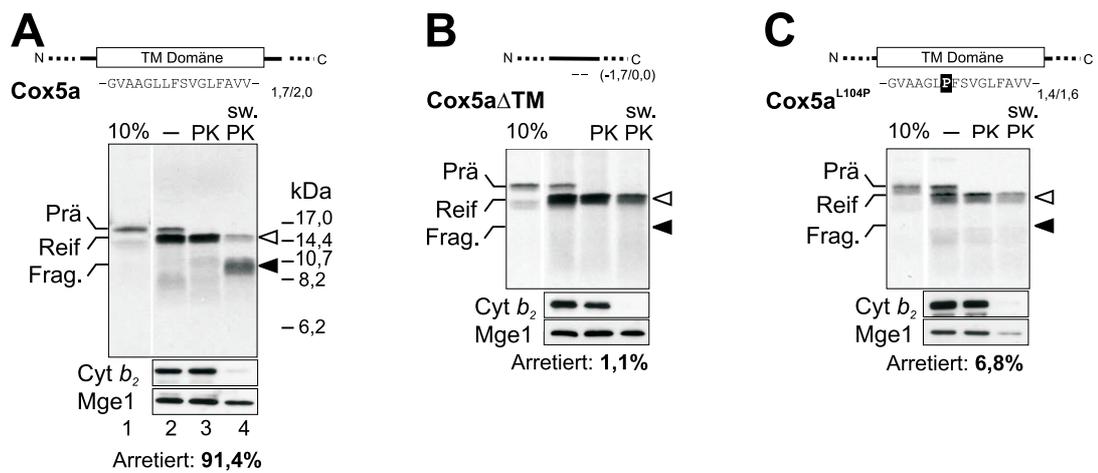
Das Cox5a-Präprotein besteht aus 153 Aminosäureresten (theoretisches Molekulargewicht 17,1 kDa) und zeigt eine apparente Masse von etwa 16,5 kDa. Dieses Präprotein wird von MPP maturiert, wobei die ersten 20 Aminosäurereste als Präsequenz proteolytisch abgespalten werden. Das reife Protein kann durch Öffnen der Außenmembran und durch die Zugabe von Proteasen in ein N-terminales Fragment von etwa 10,5 kDa überführt werden. Dieses Fragment umfasst den prozessierten N-Terminus in der Matrix sowie die in die Innenmembran inserierte Transmembrandomäne (ungefähr die Aminosäurereste 21–118). Es resultiert ausschließlich von der in die Innenmembran inserierten Spezies. Die Quantifizierung (einschließlich Korrektur für den unterschiedlichen Methioningehalt) der erhaltenen Proteinspezies ergab, dass über 90% der Cox5a-Präproteine während des Imports arretiert und in



**Abbildung 3.18 Die intramitochondriale Sortierung von Cox5a.** Das Sortierungsverhalten von Wildtyp (1) und mutierten Formen (2) von Cox5a ist schematisch dargestellt. Die Entscheidung für den entsprechenden Sortierungsweg wird auf Ebene des TIM23-Komplexes getroffen. Von dem in die Innenmembran inserierten Cox5a-Protein kann ein spezifisches N-terminales proteolytisches Fragment von etwa 10,5 kDa generiert werden.

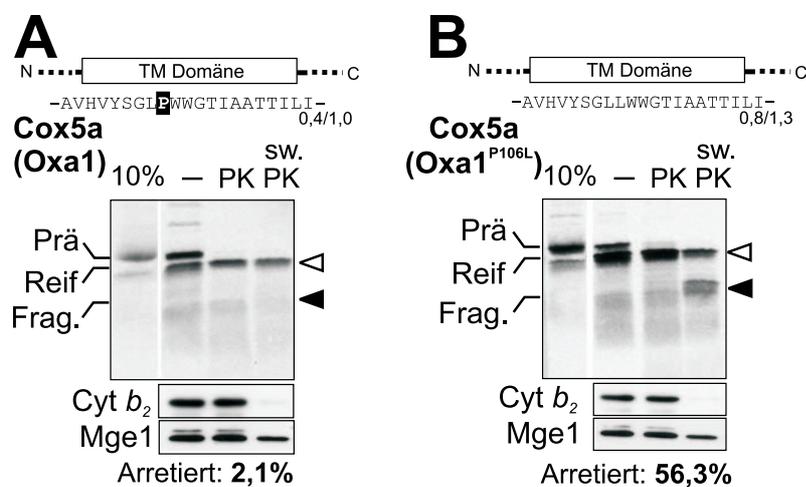
die Innenmembran inseriert wurden. Aufgrund nicht vollständiger Schwellung der Mitochondrien verblieb ein geringer Anteil an unverdaulichem reifen Cox5a (siehe Abbildung 3.19A).

Das hydrophobe Transmembransegment (Aminosäurereste 98–118) ist essentiell für die Arretierung und Membraninsertion des Proteins [36]. Der Import einer mutierten Form von Cox5a, deren Aminosäurereste 98–118 deletiert sind (Cox5a $\Delta$ TM), führte zu einer vollständigen Translokation in die Matrix, und es wurde kein charakteristisches Membranfragment beobachtet (siehe Abbildung 3.19B). Somit erlaubte dieser *in vitro* Versuchsansatz, mitochondriale Präproteine auf die An- oder Abwesenheit von Stop-Transfer-Signalen hin zu untersuchen. Da die in Abbildung 3.16 aufgeführten transferierten Transmembrandomänen sehr häufig Prolinreste aufwiesen, wurde untersucht, ob die Einführung eines Prolinrests in die Transmembrandomäne von Cox5a (Cox5a<sup>L104P</sup>) das intramitochondriale Sortierungsverhalten dieses Proteins beeinflusst. Bemerkenswerterweise führte die Einführung eines einzelnen Prolinrests in die Transmembrandomäne von Cox5a zu einer fast vollständigen Misslokalisierung dieses Proteins in die mitochondriale Matrix (siehe Abbildung 3.19C). Die Hydrophobizität der Transmembrandomänen dieses Proteins ist dabei noch deutlich höher als die vieler arretierter Sequenzen (vgl. Abbildung 3.16). Demnach ist ein einziger Prolinrest ausreichend, um das Stop-Transfer-Signal von Cox5a nahezu aufzuheben.



**Abbildung 3.19 Die Einführung eines Prolinrests zerstört das Stop-Transfer-Signal in Cox5a.** **A** Cox5a wurde für 5 min bei 25°C importiert und anschließend entweder direkt mit Proteinase K behandelt oder zusätzlich die mitochondriale Außenmembran durch hypotones Schwellen geöffnet. Die Pfeile kennzeichnen die quantifizierten proteolytischen Fragmente. Die Signale wurden auf ihren Methioningehalt hin korrigiert und das Verhältnis zwischen Proteinase K generiertem Fragment (schwarze Pfeilspitze) und reifem Protein (weiße Pfeilspitze) gebildet. Die Schwelleffizienz wurde durch Western Blots mit entsprechenden Markerproteinen (*Cyt b*<sub>2</sub>, Mge1) überprüft. In den Abbildungen **B** und **C** wurden die Cox5a-Mutanten Cox5a $\Delta$ TM und Cox5a<sup>L104P</sup> wie unter A beschrieben behandelt. Die Aminosäuresequenz sowie die berechneten Hydrophobizitäten der Transmembrandomänen sind für das jeweilige Protein aufgeführt.

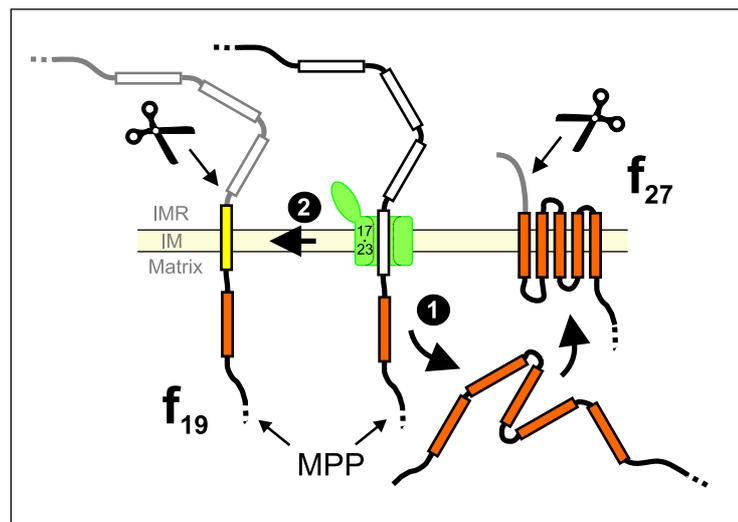
Verhindern Prolinreste in hydrophoben Segmenten von transferierten Proteinen deren Arretierung und Insertion über TIM23? Um diese Frage zu klären, wurde ein chimäres Protein generiert, in dem die erste Transmembrandomäne des konservativ sortierten Oxa1-Proteins die Transmembrandomäne von Cox5a ersetzte (Cox5a(Oxa1)). Dieses Protein wurde in die Matrix sortiert (siehe Abbildung 3.20A). Demnach trägt die Transmembrandomäne die entscheidende Information über die Sortierung von Innenmembranproteinen und determiniert ihr Sortierverhalten. Der Prolinrest in der ersten Transmembrandomäne von Oxa1 spielte dabei eine kritische Rolle, denn der Tausch des Prolinrests in der Transmembrandomäne dieses chimären Proteins in einen Leucinrest (Cox5a(Oxa1<sup>P106L</sup>)) führte zu einem partiellen Stop-Transfer dieses Proteins (siehe Abbildung 3.20B).



**Abbildung 3.20 Die Transmembrandomäne bitoper Proteine determiniert die intramitochondriale Sortierung.** **A** Cox5a(Oxa1) wurde für 5 min bei 25°C importiert und danach wurden die Ansätze entweder direkt mit Proteinase K behandelt bzw. zusätzlich die mitochondriale Außenmembran durch hypotones Schwellen geöffnet. Auf die quantifizierten Proteasefragmente wird durch Pfeile hingewiesen. Die Signale wurden auf ihren Methioningehalt hin korrigiert und das Verhältnis zwischen Proteinase K generiertem Fragment (schwarze Pfeilspitze) und reifem Protein (weiße Pfeilspitze) gebildet. Die Schwelleneffizienz wurde durch Western Blots mit entsprechenden Markerproteinen (Cyt *b*<sub>2</sub>, Mge1) überprüft. In **Abbildung B** wurde die Cox5a-Mutante Cox5a(Oxa1<sup>P106L</sup>) wie unter A beschrieben behandelt. Die Aminosäuresequenz sowie die berechneten Hydrophobizitäten der Transmembrandomänen sind für das jeweilige Protein aufgeführt.

### 3.2.3 Der Austausch einer Transmembrandomäne kann zur Arretierung eines normalerweise konservativ sortierten Proteins führen

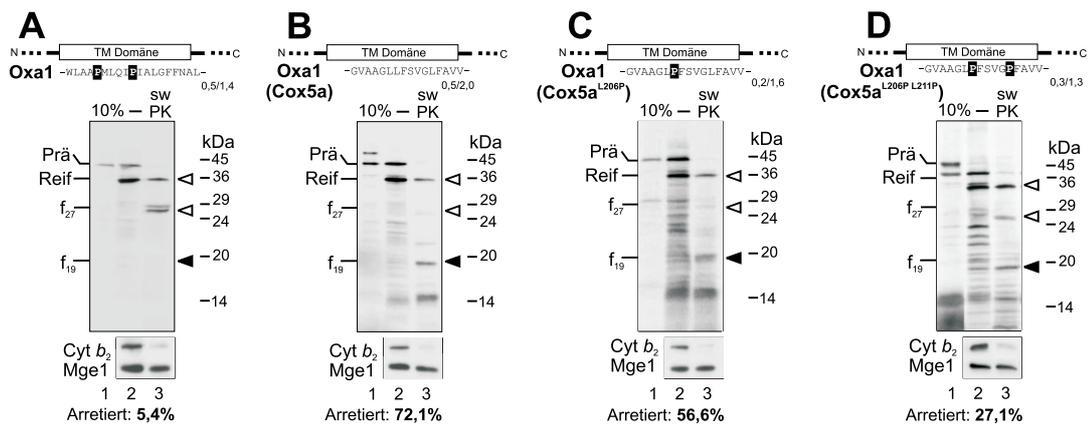
Im vorherigen Abschnitt wurde ein ursprünglich Stop-Transfer sortiertes Protein durch gezielte Manipulation in ein konservativ sortiertes Protein geändert. Ist es auch möglich, ein konservativ sortiertes Protein in ein Stop-Transfer sortiertes Protein umzuwandeln? Dazu wurde Oxa1 als Reporterprotein verwendet, da die Topogenese von Oxa1 bekannt ist [45]. Oxa1 wird als Präprotein aus 402 Aminosäureresten zunächst vollständig in die Matrix importiert und dort maturiert (siehe Abbildung 3.21). Das entstehende Sortierungs-Intermediat wird dann in die Innenmembran inseriert. In Mitoplasten kann durch zugegebene Proteasen von den membraninsetierten Proteinen ein charakteristisches etwa 27 kDa großes C-terminales Fragment generiert werden (siehe Abbildung 3.21,  $f_{27}$ ). Der Import von Oxa1 verläuft sehr effizient und es werden keine Importintermediate beobachtet, welche arretierte Präproteine darstellen könnten [45].



**Abbildung 3.21 Die intramitochondriale Sortierung von Oxa1.** Das Sortierungsverhalten von Wildtyp (1) und mutierten Formen (2) von Oxa1 ist schematisch gezeigt. Konservativ sortierte Oxa1-Proteine werden in der Matrix in die reife Form überführt (etwa 36 kDa) und von dort aus in die Innenmembran inseriert. In Mitoplasten kann von den membraninsetierten Oxa1-Proteinen ein C-terminales Proteasefragment von etwa 27 kDa gewonnen werden ( $f_{27}$ ). Stop-Transfer arretierte Formen von Oxa1 liefern dagegen in Mitoplasten ein spezifisches N-terminales Proteasefragment von etwa 19 kDa ( $f_{19}$ ).

Um zu testen, ob Oxa1 in ein Stop-Transfer sortiertes Protein verändert werden kann, wurde die zweite Transmembrandomäne gegen die Transmembrandomäne von Cox5a bzw. gegen die von Dld1 ausgetauscht. Aus technischen Gründen wurde nicht die erste Transmembrandomäne getauscht, da die MPP-prozessierten Fragmente inserierter Spezies keine Methioninreste enthalten und deshalb nicht detektiert werden könnten. Das so erhaltene Oxa1(Cox5a)-Präprotein wurde effizient in Mitochondrien importiert. In Mitoplasten wurde nach Proteasebehandlung ein 19 kDa-Fragment generiert (siehe Abbildung 3.22, schwarze Pfeilspitze). Diese Größe entsprach einem arretierten und maturierten Oxa1(Cox5a)-Protein und stimmte gut mit der berechneten Größe von 18,6 kDa des zu erwartenden Fragments überein (Abbildung 3.21,  $f_{19}$ ). Durch Quantifizierung und die Korrektur für den Methioningehalt der erhaltenen Spezies konnte gezeigt werden, dass über 70% der importierten Oxa1(Cox5a)-Präproteine auf Ebene der TIM23-Translokase arretiert und inseriert wurden. Somit haben die Transmembrandomänen für sich alleine betrachtet bereits einen großen Einfluss auf das intramitochondriale Sortierverhalten. Die Effizienz der Arretierung wurde ebenfalls für den hydrophoben Bereich von Dld1, einer weiteren Stop-Transfer sortierten Transmembrandomäne, untersucht. Diese Transmembrandomäne stellte für sich alleine ein nur wenig effizientes Arretierungssignal dar. Der größte Anteil der Oxa1(Dld1)-Präproteine wurde konservativ sortiert und es konnte in Mitoplasten durch Proteasen das charakteristische C-terminale Fragment der in die Innenmembran inserierten Spezies gewonnen werden ( $f_{27}$ ) (Daten nicht gezeigt). Im Fall von Dld1 scheint das der Transmembrandomäne folgende Ladungsmotiv für die Stop-Transfer-Effizienz dieses Sortierungssignals mitverantwortlich zu sein.

Kann das Oxa1(Cox5a)-Präprotein wieder in ein konservativ sortiertes Protein umgewandelt werden? Dazu wurden ein bzw. zwei Prolinreste in die Cox5a-Transmembrandomäne des mutierten Proteins eingeführt, um so eine Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne herzustellen, die der des Wildtyp-Oxa1 nahekommt. In dem generierten Oxa1(Cox5a<sup>L206P L211P</sup>)-Protein haben die beiden Prolinreste den gleichen Abstand wie die beiden Prolinreste in der zweiten Transmembrandomäne von Oxa1. Die Insertion von einem bzw. zwei Prolinresten in die Transmembrandomäne des chimären Oxa1(Cox5a)-Proteins führte zu einer Zunahme der konservativ sortierten Proteinspezies. Von dem Oxa1(Cox5a<sup>L206P L211P</sup>)-Protein werden schließlich wieder über 70% der Proteine wie das Wildtyp-Oxa1-Protein sortiert - sie folgen mehrheitlich der Route der konservativen Sortierung.

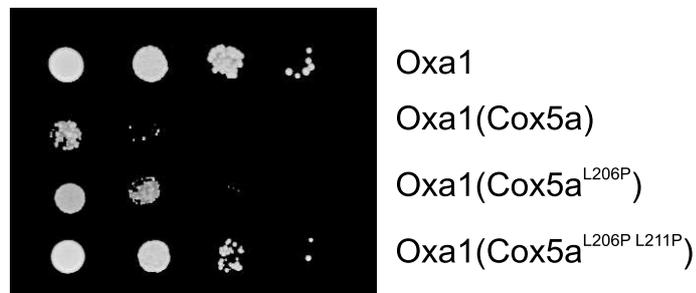


**Abbildung 3.22 Die Einführung der Cox5a-Transmembrandomäne arretiert Oxa1 während des Imports.** **A** Oxa1 wurde für 10 min bei 25°C importiert und danach wurden die Ansätze entweder direkt mit Proteinase K behandelt bzw. zusätzlich die mitochondriale Außenmembran durch hypotones Schwellen geöffnet. Auf die quantifizierten proteolytischen Fragmente wird durch Pfeile hingewiesen. Die Signale wurden auf ihren Methioningehalt hin korrigiert und das Verhältnis aus den beiden Proteinase K generierten Fragmenten gebildet (Stop-Transfer sortierte Spezies: Schwarze Pfeilspitze; reifes Protein bzw. konservativ sortierte Spezies: Weiße Pfeilspitze). Die Schwelleffizienz wurde durch Western Blots mit entsprechenden Markerproteinen (*Cyt b<sub>2</sub>*, *Mge1*) überprüft. In den Abbildungen **B** bis **D** wurden die Oxa1-Mutanten Oxa1(Cox5a), Oxa1(Cox5a<sup>L206P</sup>) und Oxa1(Cox5a<sup>L206P L211P</sup>) wie unter A beschrieben behandelt. Die Aminosäuresequenz sowie die berechneten Hydrophobizitäten der Transmembrandomänen sind für das jeweilige Protein aufgeführt.

### 3.2.4 Die intramitochondriale Sortierung wird von strukturellen Eigenschaften der hydrophoben Domänen bestimmt

Um die Relevanz der *in vitro* gewonnenen Daten zu verifizieren, wurde das Sortierverhalten der Oxa1-Mutanten *in vivo* untersucht. Für das bakterielle Homolog von Oxa1 - YidC - konnte gezeigt werden, dass es signifikante Modifikationen in der Primärsequenz sowie die Austausch kompletter Transmembrandomänen tolerieren kann [49].

Im vorliegenden Ansatz wurde dazu ein *OXA1*-disruptierter Stamm mit Plasmiden transformiert, von denen die verschiedenen Oxa1-Mutanten unter Kontrolle des endogenen *OXA1*-Promotors exprimiert wurden. Der Wachstumsphänotyp wurde auf YPD und YPG-Platten untersucht. Funktionelle Oxa1-Mutanten sollten dem *OXA1*-Disruptionsstamm ein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen - hier YPG - erlauben. Mutierte Oxa1-Proteine, welche einer Stop-Transfer-Sortierung folgen, sind für einen Defekt in der Assemblierung der Atmungskette verantwortlich und verhindern so ein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dabei bestätigte sich der *in vitro* gefundene Einfluss von Prolinresten auf die Sortierung von Membranproteinen (siehe Abbildung 3.23). So war Oxa1(Cox5a) nicht in der Lage, Oxa1 funktionell zu ersetzen. Dies deutet darauf hin, dass dieses Protein auch *in vivo* arretiert und wahrscheinlich abgebaut wird. Die Einführung eines Prolinrests in die Transmembrandomäne von Cox5a stellte das Wachstum des Stammes teilweise, die Einführung von zwei Resten sogar wieder vollständig her. Zwei Prolinreste sind auch in der Wildtyp-Oxa1-Sequenz an diesen Positionen vorhanden. Die Sortierung von Innenmembranproteinen *in vivo* wie *in vitro* scheint somit von der Anwesenheit von Prolinresten in deren Transmembrandomänen abzuhängen. Prolinreste fungieren dabei als Sortierungssignale, die selbst die Translokation hydrophober Sequenzen in die Matrix erlauben.



**Abbildung 3.23 Intramitochondriale Sortierung von Oxa1-Mutanten.** Ein  $\Delta$ Oxa1-Stamm (W303A) wurde mit Plasmiden transformiert, von denen Oxa1, Oxa1(Cox5a), Oxa1(Cox5a<sup>L206P</sup>) sowie Oxa1(Cox5a<sup>L206P L211P</sup>) exprimiert wurden. Von den auf Selektivmedium kultivierten Hefe-Stämmen wurden Verdünnungen mit gleichen optischen Dichten hergestellt ( $OD_{578} = 0,5$ ). Ausgehend von diesen Kulturen wurden serielle zehnfache Verdünnungen auf YPG-Medium aufgetragen und für drei Tage bei 30°C inkubiert.



# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Charakterisierung von Tim17

In der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Tim17 untersucht. Über die Funktion der einzelnen Untereinheiten des TIM23-Komplexes ist bisher nur wenig bekannt. Tim23 weist eine im Intermembranraum lokalisierte N-terminale Rezeptordomäne sowie eine hydrophobe C-terminale Region auf [3, 19]. Dieser hydrophobe Bereich kann, als rekombinantes Protein in Lipidvesikel rekonstituiert, spannungsabhängig-regulierte Kanäle ausbilden [64, 110]. Da diese hydrophobe Region von Tim23 Homologie zu der von Tim17 besitzt, wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Tim23 und Tim17 zwei voneinander unabhängige Kanäle bilden können [91].

#### 4.1.1 Der N-Terminus von Tim17 ist entscheidend für die Proteintranslokation mitochondrialer Präproteine

Obwohl die N-terminale Domäne von Tim17 deutlich kleiner ist als die von Tim23, ist dieser Bereich von entscheidender Bedeutung für die Funktion der TIM23-Translokase. Für den N-Terminus von Tim23 konnte bereits früher eine elementare Bedeutung bei der Proteintranslokation über den TIM23-Komplex gezeigt werden [3, 19]. Die Deletion der ersten 11 Aminosäurereste von Tim17 führte ebenfalls zu einem ausgeprägten funktionellen Defekt in der Proteintranslokation durch die TIM23-Translokase. Diese Mutation resultierte in einer signifikanten Reduktion der Transportraten von Präproteinen über die mitochondriale Innenmembran. Dabei waren weder die Untereinheiten des TIM23-Komplexes destabilisiert noch änderte sich die Zusammensetzung der TIM23-Translokase. Demnach scheint es wahrscheinlich, dass der N-Terminus von Tim17 eine direkte Rolle in der Proteintranslokation über den TIM23-Komplex hat. In den Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien wurde ein genereller Import-

defekt für Präproteine mit mitochondrialen Präsequenzen festgestellt. Dies legt ein Zusammenspiel der beiden Untereinheiten Tim17 und Tim23 in der aktiven TIM23-Translokase nahe. Aufgrund dieser Beobachtungen ist die Ausbildung von zwei unterschiedlichen Poren durch Tim17 und Tim23 für unterschiedliche Substrate eher unwahrscheinlich.

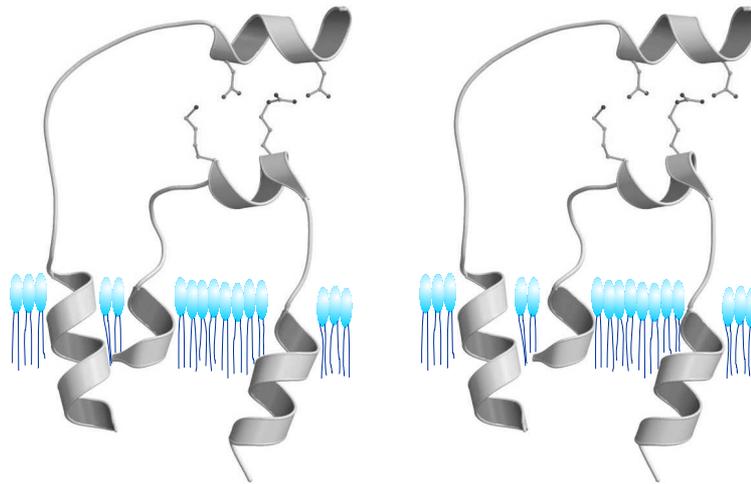
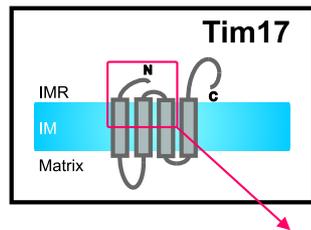
Die entscheidende Funktion von Tim17 für den Mechanismus der TIM23-Translokase wird auch durch den hohen Grad der Sequenzkonservierung verdeutlicht. Somit haben wohl funktionelle Notwendigkeiten die Sequenzvariation der Tim17-Homologen während der Evolution limitiert.

#### **4.1.2 Zwei negativ geladene Aminosäurereste im N-Terminus von Tim17 sind von besonderer Bedeutung**

Ein systematisches Einführen von Punktmutationen (Alaninscanning) identifizierte zwei für die Funktion der TIM23-Translokase entscheidende konservierte Aspartatreste im N-Terminus von Tim17. Diese beiden negativ geladenen Aminosäurereste sind innerhalb der bislang bekannten Tim17-Sequenzen von Tieren, Pflanzen und Pilzen konserviert. Zusätzlich zu den beiden negativen Ladungen im N-Terminus exponiert Tim17 noch weitere zumeist konservierte Ladungen in den Intermembranraum wie beispielsweise zwei konservierte, positiv geladene Aminosäurereste zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (siehe Abbildung 3.1).

Es ist ein Modell denkbar, nach welchem die negativen Ladungen des N-Terminus mit den positiv geladenen Präsequenzen mitochondrialer Präproteine wechselwirken und somit einen Einfluss auf die Substraterkennung oder die daran anschließende Öffnung des Proteintranslokationskanals nehmen. Des Weiteren könnte der N-Terminus von Tim17 über ionische Wechselwirkungen mit Regionen im Intermembranraum den TIM23-Komplex in einem für die Proteintranslokation „geschlossenen“ Zustand halten (siehe Abbildung 4.1). Eintretende Präsequenzen könnten mit dem N-Terminus von Tim17 wechselwirken und zu einem „Öffnen“ des TIM23-Kanals führen. Diese Regulation wäre in den Tim17 $\Delta$ N-Mitochondrien nicht möglich und folglich wäre das Öffnen und Schließen des TIM23-Komplexes gestört. Somit wären Probleme zwischen dem Wechsel von einem translokationsaktiven (offenen) zu einem translokationsinaktiven (geschlossenen) Kanal zu erwarten.

In der Tat zeigen die Tim17 $\Delta$ N-Mutante und die Ladungsmutante (DD $\rightarrow$ AA) ein erniedrigtes Membranpotential. Dies legt einen erhöhten unkontrollierten Ionenfluss über die mitochondriale Innenmembran nahe. Des Weiteren deutet der dominant negative Effekt des Tim17 $\Delta$ N-Proteins auf eine aktive Fehlregulation dieses Proteins in der TIM23-Translokase hin, was ebenfalls für einen erhöhten Protonenfluss über die Innenmembran spricht. Es ist allerdings schwierig, diese Hypothese zu beweisen,



**Abbildung 4.1 Stereostrukturmodell des N-Terminus von Tim17.** Mit den Programmpaketen MAIN und MOLSCRIPT wurde ein Modell des N-Terminus von Tim17 generiert. Es zeigt eine mögliche Interaktion der konservierten negativen Ladungen des N-Terminus im Intermembranraum mit den konservierten positiven Ladungen des Loops zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne. Positiv geladene Präproteine könnten mit den negativen Resten des N-Terminus wechselwirken und dadurch ihre Translokation über die mitochondriale Innenmembran initiieren.

da über die Struktur des membranständigen Anteils der TIM23-Translokase und über die molekularen Mechanismen der Translokase praktisch nichts bekannt ist. Bisher ist es nicht gelungen, Tim17 rekombinant zu gewinnen, was den Beweis des obigen Modells noch weiter erschwert.

Für die N-terminale Ladungsaustauschmutante (DD→RK) wurde ebenfalls ein starker Wachstumsdefekt beobachtet. Gleiches gilt auch für eine Mutante, in der ein konservierter Lysinrest zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne in einen Aspartatrest mutiert wurde (K80D, nicht gezeigt). Überraschenderweise zeigte eine Mutante, in der sowohl die negativen N-terminalen Ladungen als auch die konservierten positiven Ladungen zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne wechselseitig ausgetauscht waren (DD→RK / KR→DD), wieder Wildtyp-Wachstum. Diese Beobachtungen deuten auf die Wichtigkeit ionischer Wechselwirkungen des N-Terminus von Tim17 mit Domänen im Intermembranraum hin. Die konservierten Ladungen haben wahrscheinlich eine wichtige Funktion für die Regu-

lation und/oder Funktion des TIM23-Komplexes. Die praktisch vollständige Wiederherstellung der Tim17-Funktionalität der DD→RK / KR→DD-Doppelmutante legt eine direkte intermolekulare Wechselwirkung im Tim17-Molekül nahe (siehe Abbildung 4.1).

### 4.1.3 Das erniedrigte Membranpotential ist nicht die primäre Ursache für den Importdefekt der Tim17ΔN-Mutante

Der Import von Präproteinen über die mitochondriale Innenmembran ist membranpotentialabhängig. Ist es möglich, dass die reduzierten Proteinimportraten der Tim17ΔN-Mutante ausschließlich durch einen erhöhten unkontrollierten Ionenfluss über die Innenmembran (und ein dadurch reduziertes Membranpotential) verursacht werden? Dies kann aus folgenden Gründen als eher unwahrscheinlich angesehen werden: Selbst unter Bedingungen mit vergleichbarem Membranpotential (künstliches Membranpotential) besaß die Tim17ΔN-Mutante immer noch einen ausgeprägten Importdefekt.

Hefe-Mutanten mit stark reduziertem mitochondrialem Membranpotential, wie beispielsweise Mutanten der mitochondrialen Atmungskette, zeigen typischerweise keinen Wachstumsphänotyp auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dagegen wächst die Tim17ΔN-Mutante auch auf Glukose-haltigen Medien nur äußerst langsam. Die Mitochondrien mit Defekten in der Atmungskette haben unter den hier verwendeten hohen ATP-Konzentrationen zwar ein niedrigeres Membranpotential, importieren Präproteine aber immer noch deutlich effizienter als die Tim17ΔN-Mitochondrien [108]. Demnach führt die Deletion des N-Terminus von Tim17 zu einem funktionellen Defekt der TIM23-Translokase, welcher nicht ausschließlich als sekundärer Effekt des reduzierten mitochondrialen Membranpotentials erklärt werden kann.

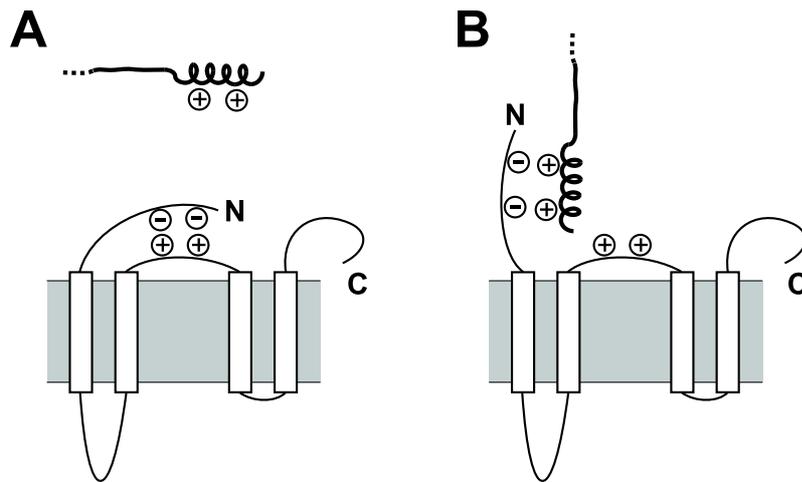
### 4.1.4 Die konservierten Cysteinreste des Tim17-Proteins sind nicht kritisch für seine Funktion

Der N-Terminus von Tim17 enthält zusätzlich zu den beiden konservierten Aspartatresten noch ein stringent konserviertes Prolin-Cystein-Prolin-Motiv (siehe Abbildung 3.1), welches in allen untersuchten Organismen konserviert ist. Ein weiterer konservierter Cysteinrest liegt C-terminal nach der zweiten Transmembrandomäne (in *S. cerevisiae* an Position 77). Somit bestünde theoretisch die Möglichkeit, eine im Intermembranraum lokalisierte intramolekulare Disulfidbrücke auszubilden. Das Auftreten von Disulfidbrücken wurde für einige Proteine des Intermembranraums gezeigt [28, 47]. Allerdings konnte kein Wachstumsphänotyp für Hefestämme nachgewiesen werden, bei denen der erste oder zweite Cysteinrest mutiert wurde

(siehe Abbildung 3.13A, sowie nicht gezeigte Daten). Auch konnte mit Cystein-modifizierenden Agenzien (AMS oder NEM) und auf nichtreduzierenden Gelen kein Hinweis auf eine Disulfidbrücke in Tim17 erhalten werden (nicht gezeigt). Selbst unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre konnte unter den experimentellen Bedingungen keine über die SH-Gruppen der Cysteinreste gebildete Disulfidbrücke nachgewiesen werden. Demnach scheint dieses konservierte Motiv nicht für die Funktion von Tim17 essentiell zu sein. Dennoch ist eine regulatorische Funktion dieser Cysteinreste möglich. Da eine kovalente Bindung zwischen den beiden Cysteinresten den Komplex in einem „geschlossenen“ Zustand fixieren sollte (s.o.), könnte dieses Motiv ein Abschalten des Proteinimports erlauben. Experimentelle Hinweise darauf, dass die TIM23-Translokase Redox-reguliert wird, existieren allerdings nicht.

#### 4.1.5 Modell einer Präprotein-abhängigen Regulation der TIM23-Translokase

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten auf eine mögliche Regulation der TIM23-Translokase über den N-Terminus von Tim17 hin. Dabei liefert die Bedeutung konservierter geladener Aminosäurereste von Tim17, welche im Intermembranraum lokalisiert sind, Hinweise auf die mögliche Regulation der TIM23-Translokase. Für die positiv geladenen Präsequenzen können Interaktionspartner mit einer zunehmenden Bindungsaffinität im Intermembranraum postuliert werden. So würde die Affinität von Präsequenzen zu dem C-Terminus von Tim50 über den N-Terminus von Tim23 zum N-Terminus von Tim17 zunehmen und so die Präsequenz zum Translokationskanal hin leiten. Diese zunehmende Bindungsaffinität wäre mit der Translokation von Präsequenzen über den TOM-Komplex (*cis* nach *trans*) vergleichbar. Allerdings konnten bislang keine direkten Beweise für eine Bindung von Präsequenzen an den N-Terminus von Tim17 gewonnen werden. Es konnte auch keine durch Präproteine induzierte Konformationsänderung im N-Terminus von Tim17 bewiesen werden. Dabei ist es jedoch unklar, ob dies aufgrund experimenteller Unzulänglichkeiten nicht gezeigt werden konnte oder ob in der TIM23-Translokase andere strukturelle Gegebenheiten vorliegen. Die bislang erhaltenen Ergebnisse können in einem spekulativen Modell zusammengefasst werden, welches eine mögliche Präsequenz-abhängige Regulation der Tim17-Tim23-Translokase erklären kann (siehe Abbildung 4.2).

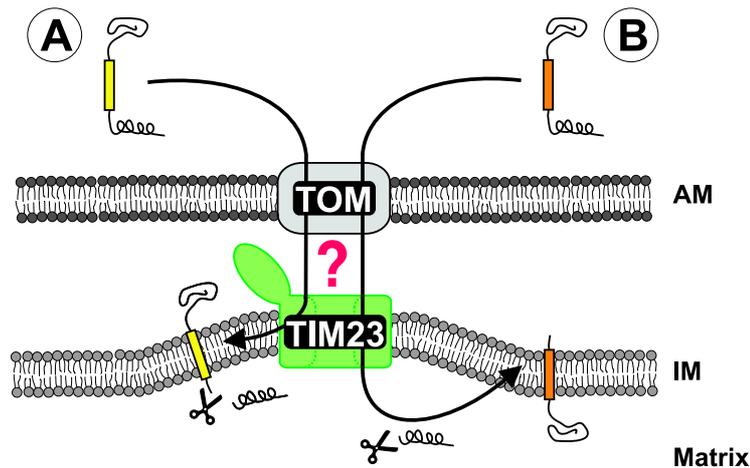


**Abbildung 4.2 Topologiemodell zur möglichen Funktion des N-Terminus von Tim17.** **A** Durch elektrostatische Wechselwirkungen des N-Terminus von Tim17 mit konservierten Aminosäureresten in einem Loop im Intermembranraum wird die Translokase in einem „geschlossenen“ Zustand gehalten. **B** Die Interaktion einer positiv geladenen Präsequenz mit dem N-Terminus von Tim17 führt zu einer Konformationsänderung in Tim17 und dadurch zu einem „Öffnen“ des Importkanals.

Die Funktionsweise der Translokasen in der mitochondrialen Innenmembran ist bisher noch wenig verstanden. Die Notwendigkeit, ein Membranpotential über die Innenmembran aufrechtzuerhalten, erfordert eine strenge Regulation dieser Transportkanäle. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der Proteintranslokation und -insertion und das Verständnis der möglichen Regulationsmöglichkeiten der Translokasen stellen spannende Fragen für zukünftige Untersuchungen.

## 4.2 Topogenese von Membranproteinen vermittelt durch den TIM23-Komplex

Die TIM23-Translokase hat während der Translokation von hydrophoben Segmenten die Aufgabe, Stop-Transfer sortierte Transmembrandomänen zu inserieren und die konservativ sortierten Transmembrandomänen zu translozieren. Welche Parameter eines hydrophoben Bereichs erkennt die Translokase und welche hydrophoben Bereiche werden als Transmembrandomäne erkannt?



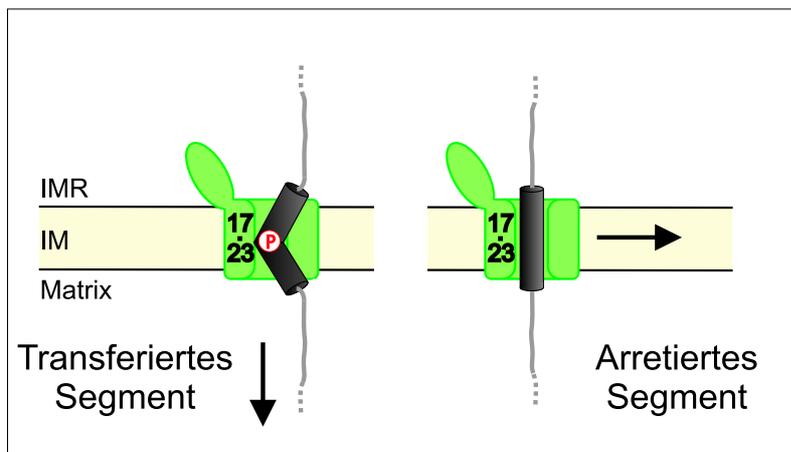
**Abbildung 4.3 Die möglichen Insertionswege mitochondrialer Innenmembranproteine.** Nach der Stop-Transfer-Sortierung (A) werden Präproteine auf der Ebene der TIM23-Translokase arretiert und lateral in die Innenmembran inseriert. Bei dem Mechanismus der konservativen Sortierung (B) werden die Proteine zunächst in einem ersten Schritt in die Matrix importiert und in einem nachfolgenden Schritt in die Innenmembran inseriert. AM: Außenmembran; IM: Innenmembran.

Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Prolinresten in Transmembrandomänen einer Stop-Transfer-Sortierung entgegenwirkt. Prolinreste in Transmembrandomänen sind notwendig und hinreichend für eine zumindest partiell konservative Sortierung von Präproteinen durch den TIM23-Komplex. Dabei muss die TIM23-Translokase die durch die Prolinreste induzierten strukturellen Veränderungen erkennen [80]. In dieser Arbeit konnten Prolinreste in Transmembrandomänen als wichtige Sortierungssignale identifiziert werden (siehe Abbildung 4.4). Für die konstruierten Transmembrandomänen der arretierten und transferierten Reporterproteine wurden praktisch identische Helizitäten berechnet [14]. Somit konnte auf theoretischer Basis kein Unterschied in der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen festgestellt werden.

Der Vergleich von transferierten mit arretierten Transmembrandomänen mitochondrialer Innenmembranproteine (siehe Abbildung 3.16) zeigte ebenfalls keine klaren Unterschiede in den Helix-ausbildenden Eigenschaften der untersuchten Trans-

membrandomänen. Dies wird hauptsächlich durch die vermehrte Präsenz von Glycinresten in arretierten Transmembrandomänen verursacht (siehe Abbildung 3.17). Folglich registriert die TIM23-Translokase bei hydrophoben Bereichen nicht primär die effiziente Ausbildung einer stabilen  $\alpha$ -Helix, sondern die Ausbildung einer kontinuierlichen, nicht-geknickten Struktur. Diese kontinuierlichen Helices werden von der Translokase als Stop-Transfer-Signal erkannt (siehe Abbildung 4.4).

Der Einfluss der flankierenden Regionen von Transmembrandomänen wurde in einer früheren Studie für Dld1 untersucht [93]. Dabei konnte einem Ladungsmotiv, welches der Transmembrandomäne C-terminal folgt, eine wichtige Rolle für die Stop-Transfer-Sortierung zugeordnet werden. Auch für die hier untersuchten chimären Proteine wurde ein gewisser Einfluss der flankierenden Regionen auf das Sortierverhalten beobachtet. Allerdings stellt Dld1 einen besonderen Fall dar, da die Transmembrandomäne eine eher niedrige Hydrophobizität aufweist (berechnet nach der Methode 2.6.1) und dadurch kein besonders starkes Arretierungssignal darstellt. In diesem Fall sorgt das der Transmembrandomäne C-terminal folgende Ladungsmotiv eventuell für eine Verlangsamung der Translokation durch die TIM23-Translokase. Eine längere Verweildauer des Präproteins in dem TIM23-Kanal könnte dabei die laterale Membraninsertion einer hydrophoben Domäne begünstigen.



**Abbildung 4.4 Modell für die Sortierung von mitochondrialen Innenmembranproteinen.** Einzelheiten siehe Text.

Im Laufe der Evolution der eukaryotischen Zelle wurde, durch den Gentransfer des Endosymbionten in den Zellkern bedingt, der Proteinimport von kernkodierten Proteinen zunehmend wichtiger. Somit mussten die Translokasen in der Lage sein, kernkodierte hydrophobe Proteine zu importieren und zu translozieren. Es ist denkbar, dass in die Transmembrandomänen eingeführte Prolinreste die Translokation dieser hydrophoben Bereiche in die Matrix erlaubten, von der aus die Membranproteine ihre finale Topologie erreichen konnten. Vermittelt durch die konservierten Insertionskomplexe konnten diese Proteine schließlich ihren finalen Wirkungsort in

der Innenmembran erreichen. Dadurch musste nicht für jede einzelne Transmembrandomäne (bzw. für jedes Paar) polytooper Innenmembranproteine neue Sortierungssignale entwickelt werden. Statt dessen konnten die vorhandenen Insertionsmechanismen genutzt werden. Dies mag den fast vollständigen Gentransfer aus den Mitochondrien in den Nukleus unter Verwendung etablierter Translokationssysteme deutlich erleichtert haben.

Für die erste Transmembrandomäne von Oxa1 konnte ein Prolinrest als entscheidendes Sortierungssignal in die mitochondriale Matrix identifiziert werden. Dieser Prolinrest ist in Oxa1-Homologen in Tieren und Pflanzen konserviert und tritt auch in den weiter entfernten mitochondrialen Oxa2/Cox18-Homologen auf [31]. Dagegen ist in der entsprechenden Transmembrandomäne des bakteriellen Homologen von Oxa1 kein Prolinrest zu finden. Wahrscheinlich wurde dieser Prolinrest im Zuge der mitochondrialen Evolution eingeführt und seither konserviert. Der Einfluss von Prolinresten auf die intramitochondriale Sortierung könnte auch in zukünftigen Experimenten untersucht werden, in denen mit gentherapeutischen Methoden ursprünglich mitochondrial kodierte Proteine in humane Zellen eingeführt werden. Diese Proteine sollten dann einer konservativen Sortierung folgen, um schließlich ihre korrekte Topologie zu erreichen. Erste Versuche in dieser Richtung waren bereits erfolgreich, jedoch wenig effizient, was durch eine vorwiegende Stop-Transfer-Sortierung der hydrophoben und ursprünglich mitochondrial kodierten Proteine erklärt werden könnte [67, 103].

Der Einfluss der Lipidzusammensetzung von Membranen auf die Topologie von Membranproteinen wurde bisher nur wenig untersucht. Die unterschiedlichen Lipidseitenketten und ihre Ladungsverteilung beeinflussen dabei die Topologie von Membranproteinen über elektrostatische Anziehungs- und Abstoßungskräfte [114, 121]. Dabei gilt es auch die Bedeutung der die Transmembrandomänen flankierenden Ladungen näher zu untersuchen [74].

Wie inseriert eine Translokase eine Transmembrandomäne in eine Lipidmembran? Aufbauend auf der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Sec-Translokase wurde ein Modell vorgeschlagen, welches die Insertion hydrophober Segmente in die Membran vermittelt [113]. Dabei zeigt die Kristallstruktur nur eine mögliche Position, über welche eine Transmembrandomäne die Translokase lateral verlassen könnte. Allerdings findet die Insertion von Membranproteinen über die Sec-Translokase kotranslational statt, wobei sowohl konformelle Änderungen ribosomaler Proteine als auch assoziierter Faktoren zusätzliche Informationen für die Topogenese vermitteln.

Bisher konnten für die TIM23-Translokase noch keine strukturellen Daten gewonnen werden, welche die Funktion dieses Komplexes, der sowohl als Insertase als auch als Translokase fungiert, aufklären könnten. Des Weiteren ist der Einfluss unterschiedlich geladener Lipidseitenketten auf die Topologie von Membranproteinen noch wenig verstanden [114]. Zusätzlich ist eine wahrscheinlich asymmetrische Verteilung der Lipide auf den beiden Seiten der mitochondrialen Innenmembran zu berücksichtigen. Bei den Wechselwirkungen zwischen den Lipiden, den Transmembrandomänen und den Membran-assoziierten Proteindomänen spielen elektrostatische Anziehungs- und Abstoßungskräfte eine entscheidende Rolle.

### 4.2.1 Die Funktion von Prolinresten in Transmembrandomänen

Es ist eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, in denen Mutationen der mitochondrialen DNS für Defekte in der Atmungskette verantwortlich sind [120, 123]. Diese Erkrankungen könnten entweder mit einer mitochondrialen Gentherapie oder gar durch den Transfer von Mitochondrien behandelt werden, für die die Methoden erst noch etabliert werden müssen. Ebenfalls wäre eine Gentherapie der ursprünglich mitochondrial kodierten Genprodukte mit nun kernkodierten Proteinen denkbar [21, 50, 124].

Eine Gentherapie, die auf das Einbringen von DNS-Sequenzen in Mitochondrien abzielt, scheint derzeit nicht erfolgversprechend [21]. Weder existieren geeignete Expressionsvektoren, noch gibt es Verfahren, DNS-Sequenzen in Mitochondrien von Säugerzellen einzubringen. Darum wird der Ansatz verfolgt, die defekten Genprodukte durch kernkodierte Präproteine zu ersetzen, die durch Präsequenzen in die Mitochondrien dirigiert werden [67, 81]. Für diesen Ansatz sind die hier erhaltenen Ergebnisse relevant, da es sich bei allen mitochondrial kodierten Proteinen des Menschen um Innenmembranproteine handelt. Das Einführen von Prolinresten in die Transmembrandomänen könnte die Importeffizienz dieser Proteine deutlich steigern, da ein eventueller Translokationsarrest dieser Proteine unterbunden werden würde.

Eine wichtige Aufgabe wird es sein, die Sortierungssignale in mitochondrialen Proteinen genauer zu entschlüsseln. Zwar lassen sich mitochondriale Präsequenzen recht gut vorhersagen (mit Software-Programmen wie MitoPred oder Predotar), aber über die Signale, die die intramitochondriale Sortierung von Proteinen anzeigen, ist wenig bekannt. Einen Einblick in die Sortierung von Transmembrandomänen liefert diese Arbeit. Hier wurden diejenigen Parameter identifiziert, die die Transmembrandomänen auf Ebene der TIM23-Translokasen arretieren bzw. in die Matrix passieren lassen.

Die Transportsignale, welche den für die konservative Sortierung notwendigen Exportschritt vermitteln, sind bisher noch völlig unklar. Es wird die Aufgabe von zukünftigen Studien sein, die funktionellen und strukturellen Eigenschaften solcher Exportsignale zu identifizieren, welche für die Proteininsertion aus der mitochondrialen Matrix in die Innenmembran verantwortlich sind.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Biogenese von Mitochondrien erfordert den Import von Präproteinen aus dem Cytosol in die mitochondrialen Subkompartimente. Der TIM23-Komplex der mitochondrialen Innenmembran ist für die Translokation von Präproteinen über die Innenmembran verantwortlich und vermittelt darüber hinaus die Insertion von Proteinen in die Innenmembran. Tim23 weist zwei funktionell unterscheidbare Domänen auf: Eine N-terminale hydrophile Rezeptordomäne im Intermembranraum und einen hydrophoben C-terminalen Bereich. Das phylogenetisch verwandte Tim17 ist ein sehr hydrophobes Protein, welches vier Transmembrandomänen ausbildet, die von zwei kurzen Enden im Intermembranraum flankiert werden. Die hydrophoben Bereiche von Tim17 und Tim23 bilden vermutlich den kanalbildenden Teil der Translokase.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Tim17 bei der Translokation von Präproteinen über die Innenmembran untersucht. Es konnte eine kurze N-terminale Sequenz von 11 Aminosäureresten identifiziert werden, welche für die Funktionalität der TIM23-Translokase essentiell ist. Die Deletion dieser Sequenz beeinflusst die Integrität der bekannten Untereinheiten der TIM23-Translokase nicht, führt jedoch zu einer starken Beeinträchtigung der Translokation von Präproteinen über die mitochondriale Innenmembran. Durch gezielte Alanin-Punktmutagenese konnten zwei konservierte Aspartatreste in der Tim17-Sequenz identifiziert werden, welche für den Translokationsdefekt verantwortlich sind. Die Analyse weiterer Mutanten in Tim17 mit einzelnen oder wechselseitig ausgetauschten geladenen Aminosäureresten im Intermembranraum legen nahe, dass die konservierten negativen Ladungen in Tim17 mit den positiv geladenen Präsequenzen interagieren und dadurch die Translokation von Präproteinen durch den TIM23-Komplex regulieren. Diese Ergebnisse geben einen Einblick in eine Präprotein-abhängige Regulation der TIM23-Translokase über ein mögliches „Öffnen“ und „Schließen“ des Translokationskanals via Tim17.

Die meisten Proteine der mitochondrialen Innenmembran, die als Präproteine mit mitochondrialen Präsequenzen im Cytosol synthetisiert werden, erreichen die Innenmembran auf einem von zwei alternativen Sortierungswegen: Dem „Stop-Transfer-Weg“, auf dem Präproteine während der Translokation durch den TIM23-Komplex arretiert und lateral in die Innenmembran inseriert werden und dem Weg der „Konservativen Sortierung“, auf dem die Proteine über Intermediate in der mitochondrialen Matrix in die Innenmembran inseriert werden. Folglich müssen diese Proteine entsprechende Sortierungssignale aufweisen, die entweder die laterale Membraninsertion (Stop-Transfer-Proteine) oder die die Translokation in die Matrix (konservativ sortierte Proteine) durch die TIM23-Translokase vermitteln. Das Sortierungsverhalten von mitochondrialen Innenmembranproteinen mit N-terminalen Präsequenzen, die zunächst für die initiale Translokation des N-Terminus der Proteine sorgen, wird von den Transmembrandomänen bestimmt.

Um den Einfluss der Transmembrandomänen auf den Sortierungsweg zu untersuchen, wurden die entsprechenden Domänen von Stop-Transfer sortierten Proteinen und konservativ sortierten Proteinen wechselseitig ausgetauscht. In den chimären Proteinen bestimmten jeweils die eingeführten Transmembrandomänen das Sortierungsverhalten. Eine Untersuchung dieser Transmembrandomänen zeigte zwei systematische Unterschiede: Transmembrandomänen, die die konservative Sortierung vermitteln, weisen eine zumeist moderate Hydrophobizität auf und enthalten zumeist Prolinreste. Dagegen sind Stop-Transfer vermittelnde Transmembrandomänen typischerweise stärker hydrophob und frei von Prolinresten. Die Einführung von Prolinresten in die Transmembrandomänen von ursprünglich Stop-Transfer sortierten Proteinen führte zu deren Translokation in die Matrix. Umgekehrt führte die Mutagenese von Prolinresten in Transmembrandomänen ursprünglich konservativ sortierter Proteine zu deren Arretierung in der Innenmembran.

Die Anwesenheit von Prolinresten in den Transmembrandomänen bestimmt demnach den Sortierungsweg dieser Innenmembranproteine. Zukünftige Studien werden zeigen, wie diese Sortierungssignale, welche eventuell eine von Prolinresten gebrochene hydrophobe Helix darstellen, von der TIM23-Translokase erkannt und entsprechend umgesetzt werden.

Die Bedeutung von Prolinresten in Transmembrandomänen von konservativ sortierten Proteinen konnte durch Mutagenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Diese Erkenntnis sollte sowohl in Vorhersagen von Proteinsortierungswegen als auch bei der zukünftigen Entwicklung mitochondrialer Proteine für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung mitochondrialer Erkrankungen berücksichtigt werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] U. Ahting, M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert, and S. Nussberger. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 153(6):1151–1160, Jun 2001.
- [2] S. G. E. Andersson, O. Karlberg, B. Canback, and C. G. Kurland. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1429):165–177, Jan 2003.
- [3] M. F. Bauer, C. Sirrenberg, W. Neupert, and M. Brunner. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87(1):33–41, Oct 1996.
- [4] F. Baumann, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix. *J Biol Chem*, 277(24):21405–21413, Jun 2002.
- [5] E. M. Beasley, S. Muller, and G. Schatz. The signal that sorts yeast cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space contains three distinct functional regions. *EMBO J*, 12(6):2303–2311, Jun 1993.
- [6] J. Berthold, M. F. Bauer, H. C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert, and M. Brunner. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, 81(7):1085–1093, Jun 1995.
- [7] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–1523, Nov 1979.
- [8] U. Bomer, J. Rassow, N. Zufall, N. Pfanner, M. Meijer, and A. C. Maarse. The pre-protein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17. *J Mol Biol*, 262(4):389–395, Oct 1996.
- [9] P. Borst and L. A. Grivell. The mitochondrial genome of yeast. *Cell*, 15(3):705–723, Nov 1978.
- [10] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, May 1976.
- [11] J. Brix, G. A. Ziegler, K. Dietmeier, J. Schneider-Mergener, G. E. Schulz, and N. Pfanner. The mitochondrial import receptor Tom70: identification of a 25 kDa core domain with a specific binding site for preproteins. *J Mol Biol*, 303(4):479–488, Nov 2000.
- [12] G. Burger, M. W. Gray, and B. F. Lang. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet*, 19(12):709–716, Dec 2003.

- [13] C.-N. Chin, G. von Heijne, and J.-W. L. de Gier. Membrane proteins: shaping up. *Trends Biochem Sci*, 27(5):231–234, May 2002.
- [14] P. Y. Chou and G. D. Fasman. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 47:45–148, 1978.
- [15] M. G. Claros, S. Brunak, and G. von Heijne. Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr Opin Struct Biol*, 7(3):394–398, Jun 1997.
- [16] J. de Keyzer, C. van der Does, and A. J. M. Driessen. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci*, 60(10):2034–2052, Oct 2003.
- [17] K. S. Dimmer, S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13(3):847–853, Mar 2002.
- [18] B. Dobberstein. Protein transport. On the beaten pathway. *Nature*, 367(6464):599–600, Feb 1994. Comment.
- [19] M. Donzeau, K. Kaldi, A. Adam, S. A. Paschen, G. Wanner, B. Guiard, M. F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, 101(4):401–412, May 2000.
- [20] W. J. Dower, J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13):6127–6145, Jul 1988.
- [21] G. G. M. D’Souza and V. Weissig. Approaches to mitochondrial gene therapy. *Curr Gene Ther*, 4(3):317–328, Sep 2004.
- [22] V. V. Emelyanov. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci Rep*, 21(1):1–17, Feb 2001.
- [23] J. L. Emtage and R. E. Jensen. MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol*, 122(5):1003–1012, Sep 1993.
- [24] T. Endo and D. Kohda. Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta*, 1592(1):3–14, Sep 2002.
- [25] M. Endres, W. Neupert, and M. Brunner. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J*, 18(12):3214–3221, Jun 1999.
- [26] D. M. Engelman, Y. Chen, C.-N. Chin, A. R. Curran, A. M. Dixon, A. D. Dupuy, A. S. Lee, U. Lehnert, E. E. Matthews, Y. K. Reshetnyak, A. Senes, and J.-L. Popot. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett*, 555(1):122–125, Nov 2003.
- [27] S. England and L. Siegel. Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *Methods Enzymol*, 13:99–106, 1969.
- [28] L. S. Field, Y. Furukawa, T. V. O’Halloran, and V. C. Culotta. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem*, 278(30):28052–28059, Jul 2003.

- [29] A. E. Frazier, J. Dudek, B. Guiard, W. Voos, Y. Li, M. Lind, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H. E. Meyer, V. Bilanchone, M. G. Cumsky, K. N. Truscott, N. Pfanner, and P. Rehling. Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, 11(3):226–233, Mar 2004.
- [30] T. G. Frey and C. A. Mannella. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25(7):319–324, Jul 2000.
- [31] S. Funes, F. E. Nargang, W. Neupert, and J. M. Herrmann. The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol Biol Cell*, 15(4):1853–1861, Apr 2004.
- [32] S. M. Gasser, G. Daum, and G. Schatz. Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21):13034–13041, Nov 1982.
- [33] B. Gaume, C. Klaus, C. Ungermann, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J*, 17(22):6497–6507, Nov 1998.
- [34] A. Geissler, A. Chacinska, K. N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H. E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner, and P. Rehling. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, 111(4):507–518, Nov 2002.
- [35] A. Geissler, T. Krimmer, U. Bomer, B. Guiard, J. Rassow, and N. Pfanner. Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell*, 11(11):3977–3991, Nov 2000.
- [36] S. M. Glaser, B. R. Miller, and M. G. Cumsky. Removal of a hydrophobic domain within the mature portion of a mitochondrial inner membrane protein causes its mislocalization to the matrix. *Mol Cell Biol*, 10(5):1873–1881, May 1990.
- [37] B. S. Glick, A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R. L. Hallberg, and G. Schatz. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, 69(5):809–822, May 1992.
- [38] B. S. Glick and G. von Heijne. *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type sec machinery. *Protein Sci*, 5(12):2651–2652, Dec 1996.
- [39] V. Goder and M. Spiess. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett*, 504(3):87–93, Aug 2001.
- [40] M. W. Gray, G. Burger, and B. F. Lang. Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407):1476–1481, Mar 1999.
- [41] F. U. Hartl, J. Ostermann, B. Guiard, and W. Neupert. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell*, 51(6):1027–1037, Dec 1987.
- [42] K. Hell, W. Neupert, and R. A. Stuart. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J*, 20(6):1281–1288, Mar 2001.

- [43] J. M. Herrmann and W. Neupert. What fuels polypeptide translocation? An energetic view on mitochondrial protein sorting. *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3):331–338, Aug 2000.
- [44] J. M. Herrmann and W. Neupert. Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life*, 55(4-5):219–225, Apr 2003.
- [45] J. M. Herrmann, W. Neupert, and R. A. Stuart. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J*, 16(9):2217–2226, May 1997.
- [46] J. M. Herrmann, B. Westermann, and W. Neupert. Analysis of protein-protein interactions in mitochondria by coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. *Methods Cell Biol*, 65:217–230, 2001.
- [47] S. Iwata, M. Saynovits, T. A. Link, and H. Michel. Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*, 4(5):567–579, May 1996.
- [48] R. E. Jensen and C. D. Dunn. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta*, 1592(1):25–34, Sep 2002.
- [49] F. Jiang, M. Chen, L. Yi, J.-W. de Gier, A. Kuhn, and R. E. Dalbey. Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *J Biol Chem*, 278(49):48965–48972, Dec 2003.
- [50] Y. Kagawa, Y. Inoki, and H. Endo. Gene therapy by mitochondrial transfer. *Adv Drug Deliv Rev*, 49(1-2):107–119, Jul 2001.
- [51] K. Kaldi, M. F. Bauer, C. Sirrenberg, W. Neupert, and M. Brunner. Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *EMBO J*, 17(6):1569–1576, Mar 1998.
- [52] H. Kim, K. Melen, and G. von Heijne. Topology models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins based on C-terminal reporter fusions and predictions. *J Biol Chem*, 278(12):10208–10213, Mar 2003.
- [53] C. M. Koehler, M. P. Murphy, N. A. Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz, and E. Or. Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, 20(4):1187–1193, Feb 2000.
- [54] T. Komiya, S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz, and K. Mihara. Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J*, 17(14):3886–3898, Jul 1998.
- [55] P. Kovermann, K. N. Truscott, B. Guiard, P. Rehling, N. B. Sepuri, H. Muller, R. E. Jensen, R. Wagner, and N. Pfanner. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, 9(2):363–373, Feb 2002.
- [56] C. Kozany, D. Mokranjac, M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, 11(3):234–241, Mar 2004.

- [57] A. Kuhn, R. A. Stuart, R. Henry, and R. E. Dalbey. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, 13(10):510–516, Oct 2003.
- [58] K. P. Kunkele, S. Heins, M. Dembowski, F. E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger, and W. Neupert. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, 93(6):1009–1019, Jun 1998.
- [59] J. Kyshe-Anderson. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, 10:203–207, 1984.
- [60] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259):680–685, Aug 1970.
- [61] P. A. Lanzetta, L. J. Alvarez, P. S. Reinach, and O. A. Candia. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem*, 100(1):95–97, Nov 1979.
- [62] R. H. Law, S. Manon, R. J. Devenish, and P. Nagley. ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 260:133–163, 1995.
- [63] R. Lill and G. Kispal. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25(8):352–356, Aug 2000.
- [64] T. A. Lohret, R. E. Jensen, and K. W. Kinnally. Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J Cell Biol*, 137(2):377–386, Apr 1997.
- [65] T. Lutz, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J*, 22(17):4400–4408, Sep 2003.
- [66] A. C. Maarse, J. Blom, P. Keil, N. Pfanner, and M. Meijer. Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS Lett*, 349(2):215–221, Aug 1994.
- [67] G. Manfredi, J. Fu, J. Ojaimi, J. E. Sadlock, J. Q. Kwong, J. Guy, and E. A. Schon. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet*, 30(4):394–399, Apr 2002.
- [68] L. Margulis. Symbiosis and evolution. *Sci Am*, 225(2):48–57, Aug 1971.
- [69] A. Matouschek, N. Pfanner, and W. Voos. Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep*, 1(5):404–410, Nov 2000.
- [70] M. P. Mayer. Timing the catch. *Nat Struct Mol Biol*, 11(1):6–8, Jan 2004. News.
- [71] I. Milisav, F. Moro, W. Neupert, and M. Brunner. Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, 276(28):25856–25861, Jul 2001.
- [72] D. Mokranjac, S. A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S. C. Hoppins, F. E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J*, 22(4):816–825, Feb 2003.
- [73] D. Mokranjac, M. Sichtung, W. Neupert, and K. Hell. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J*, 22(19):4945–4956, Oct 2003.

- [74] M. Monne, I. Nilsson, M. Johansson, N. Elmhed, and G. von Heijne. Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J Mol Biol*, 284(4):1177–1183, Dec 1998.
- [75] F. Moro, K. Okamoto, M. Donzeau, W. Neupert, and M. Brunner. Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *J Biol Chem*, 277(9):6874–6880, Mar 2002.
- [76] F. Moro, C. Sirrenberg, H. C. Schneider, W. Neupert, and M. Brunner. The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J*, 18(13):3667–3675, Jul 1999.
- [77] M. W. Murcha, R. Lister, A. Y. Y. Ho, and J. Whelan. Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 131(4):1737–1747, Apr 2003.
- [78] F. E. Nargang, M. Preuss, W. Neupert, and J. M. Herrmann. The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 277(15):12846–12853, Apr 2002.
- [79] W. Neupert and M. Brunner. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(8):555–565, Aug 2002.
- [80] I. Nilsson and G. von Heijne. Breaking the camel’s back: proline-induced turns in a model transmembrane helix. *J Mol Biol*, 284(4):1185–1189, Dec 1998.
- [81] J. Ojaimi, J. Pan, S. Santra, W. J. Snell, and E. A. Schon. An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Mol Biol Cell*, 13(11):3836–3844, Nov 2002.
- [82] K. Okamoto, A. Brinker, S. A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert, and M. Brunner. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J*, 21(14):3659–3671, Jul 2002.
- [83] T. Palmer and B. C. Berks. Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology*, 149(Pt 3):547–556, Mar 2003. Lectures.
- [84] S. A. Paschen, T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, 426(6968):862–866, Dec 2003.
- [85] H. R. Pelham and R. J. Jackson. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67(1):247–256, AUG 1976.
- [86] N. Pfanner. Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol*, 10(11):412–415, Jun 2000.
- [87] N. Pfanner and A. Geissler. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(5):339–349, May 2001.
- [88] N. Pfanner and W. Neupert. Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier. *EMBO J*, 4(11):2819–2825, Nov 1985.
- [89] N. Pfanner and W. Neupert. Transport of F1-ATPase subunit beta into mitochondria depends on both a membrane potential and nucleoside triphosphates. *FEBS Lett*, 209(2):152–156, Dec 1986.

- [90] N. Pfanner, M Tropschug, and W. Neupert. Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell*, 49(6):815–823, Jun 1987.
- [91] N. Pfanner and N. Wiedemann. Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol*, 14(4):400–411, Aug 2002.
- [92] D. Roise and G. Schatz. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem*, 263(10):4509–4511, Apr 1988.
- [93] E. E. Rojo, B. Guiard, W. Neupert, and R. A. Stuart. Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem*, 273(14):8040–8047, Apr 1998.
- [94] G. A. Rutter and R. Rizzuto. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci*, 25(5):215–221, May 2000.
- [95] K. R. Ryan, R. S. Leung, and R. E. Jensen. Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol Cell Biol*, 18(1):178–187, Jan 1998.
- [96] M. T. Ryan, W. Voos, and N. Pfanner. Assaying protein import into mitochondria. *Methods Cell Biol*, 65:189–215, 2001.
- [97] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, Jan 1988.
- [98] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, Dec 1985.
- [99] G. Schatz. Just follow the acid chain. *Nature*, 388(6638):121–122, Jul 1997. Comment.
- [100] G. Schatz and B. Dobberstein. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271(5255):1519–1526, Mar 1996.
- [101] I. E. Scheffler. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev*, 49(1-2):3–26, Jul 2001.
- [102] H. C. Schneider, J. Berthold, M. F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert. Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, 371(6500):768–774, Oct 1994.
- [103] E. A. Schon and S. DiMauro. Medicinal and genetic approaches to the treatment of mitochondrial disease. *Curr Med Chem*, 10(23):2523–2533, Dec 2003.
- [104] A. D. Sharrocks. A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene*, 138(1-2):105–108, Jan 1994.
- [105] J. M. Shaw and J. Nunnari. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, 12(4):178–184, Apr 2002.

- [106] A. Sickmann, J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H. E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23):13207–13212, Nov 2003.
- [107] R. S. Sikorski and P. Hieter. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1):19–27, May 1989.
- [108] G. Szyrach, M. Ott, N. Bonnefoy, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J*, 22(24):6448–6457, Dec 2003.
- [109] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4354, Sep 1979.
- [110] K. N. Truscott, P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A. J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner, and R. Wagner. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, 8(12):1074–1082, Dec 2001.
- [111] K. N. Truscott, W. Voos, A. E. Frazier, M. Lind, Y. Li, A. Geissler, J. Dudek, H. Muller, A. Sickmann, H. E Meyer, C. Meisinger, B. Guiard, P. Rehling, and N. Pfanner. A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*, 163(4):707–713, Nov 2003.
- [112] K. N. Truscott, N. Wiedemann, P. Rehling, H. Muller, C. Meisinger, N. Pfanner, and B. Guiard. Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol*, 22(22):7780–7789, Nov 2002.
- [113] B. Van den Berg, W. M. Jr. Clemons, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison, and T. A. Rapoport. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969):36–44, Jan 2004.
- [114] W. van Klompenburg, I. Nilsson, G. von Heijne, and B. de Kruijff. Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J*, 16(14):4261–4266, Jul 1997.
- [115] A. P. van Loon, A. W. Brandli, and G. Schatz. The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell*, 44(5):801–812, Mar 1986.
- [116] G. von Heijne. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, 5(6):1335–1342, Jun 1986.
- [117] G. von Heijne. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, 341(6241):456–458, Oct 1989.
- [118] G. von Heijne and Y. Gavel. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, 174(4):671–678, Jul 1988.
- [119] T. Waizenegger, S. J. Habib, M. Lech, D. Mokranjac, S. A. Paschen, K. Hell, W. Neupert, and D. Rapoport. Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep*, 5(7):704–709, Jul 2004.

- 
- [120] D. C. Wallace. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407):1482–1488, Mar 1999.
- [121] S. H. White, A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe, and K. Hristova. How membranes shape protein structure. *J Biol Chem*, 276(35):32395–32398, Aug 2001.
- [122] N. Wiedemann, A. E. Frazier, and N. Pfanner. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem*, 279(15):14473–14476, Apr 2004.
- [123] M. Zeviani and V. Carelli. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol*, 16(5):585–594, Oct 2003.
- [124] M. Zeviani and A. Spinazzola. Mitochondrial disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 3(5):423–432, Sep 2003.



# Veröffentlichungen

## Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- S. Meier** und J. M. Herrmann. Quo vadis, Protein? Proteinsortierung in Mitochondrien. *BioFORUM*, 1-2: 32-34, Feb 2003.
- S. Meier**, W. Neupert, J. M. Herrmann. Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280(9): 7777-7785, Mar 4 2005.
- S. Meier**, W. Neupert, J. M. Herrmann. Proline residues determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J. Cell. Biol.*, in Revision.
- S. C. Stadler, R. Polanetz, **S. Meier**, P. U. Mayerhofer, J. M. Herrmann, K. Anslinger, A. A. Roscher, W. Röschinger und A. Holzinger. Identification of mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. *Biochem. J.*, in Revision.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der letzten Jahre mit Rat und Tat unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für seine Unterstützung, für die lehrreiche Zeit an seinem Institut und für die interessanten Seminare danken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner danke ich vielmals für die Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Johannes Herrmann bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine Anregungen und Ideen - sowie zahlreiche Diskussionen - haben zum Gelingen meiner Arbeit entscheidend beigetragen. Seine stets gute Laune wird mir immer im Gedächtnis bleiben.

Einen besonders herzlichen Dank möchte ich Petra Robisch aussprechen, die mich in der zweiten Hälfte meiner Arbeit unterstützt hat und auch widerspenstige Projekte mit großer Hartnäckigkeit meisterte. Die Zusammenarbeit mit ihr hat mir besonders viel Freude bereitet.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, durch deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ein hervorragendes Arbeitsklima entstand. Besonderer Dank gebührt Tom für die nette Zeit im Labor und für die musikalischen und abendlichen Auflockerungen des Forschungsalltags. Herzlichen Dank an Sole für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Zusatzkalorien sowie an Nikola, Tanja, Heike, Martin und Marc für die gute Zusammenarbeit. Sandra möchte ich für ihre Freundschaft und für das ansteckendste Lachen Münchens danken.

Allen Institutsangehörigen möchte ich für den großzügigen Austausch von Wissen und Materialien aller Art danken, wobei ich Dejana und Stefan Paschen besonders hervorheben möchte. Michael Groll verdanke ich mein ganzes Wissen über die Röntgenstruktur-Aufklärung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Sekretärinnen Helga Döge, Elke Farsen und Karin Hauck für ihre Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten sowie bei Frau Reisenauer und allen anderen Mitarbeiterinnen aus der Spülküche. Vielen Dank für die hervorragende Versorgung mit Kaffee! Den Mitarbeiterinnen Eva und Ruth aus

dem Tierstall möchte ich für die Pflege der Versuchstiere danken. Des Weiteren möchte ich mich bei unserer perfekt eingerichteten Werkstatt mit Willi, Peter und Gerd bedanken.

Bei meiner unvergesslichen Essensgruppe mit Kai, Jutta, Tom, Stefan Fritz und Tung möchte ich mich für all die wissenschaftlichen, philosophischen und profanen Diskussionen bedanken, die so manches Mensamenü erheitert haben.

Meinen Eltern Hilde und Ernst sowie meiner Schwester Elke gebührt großer Dank, da sie mich in all den Jahren stets unterstützt haben und mir jederzeit mit Rat und Tat beigestanden haben.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei Anke für alles Übrige bedanken.

# Lebenslauf

	<b>Stephan Meier</b>
26.06.1972	geboren in Lörrach
1978-1982	Besuch der Herrmann-Daur Grundschule Märkt
1982-1991	Besuch des Kant Gymnasium Weil am Rhein
1991-1992	Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuz Lörrach
1993-1995	Grundstudium Biochemie an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
1996-1997	Forschungspraktika an der Griffith University und am „ <i>National Research Centre for Environmental Toxicology</i> “ in Brisbane (Australien) sowie an der <i>Auckland Medical School</i> (Neuseeland)
1998-1999	Diplomarbeit im Friedrich-Miescher Laboratorium der Max-Planck Gesellschaft in Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr. C. M. Schuster „Gezielte Induktion synaptischer Plastizität an der neuromuskulären Endplatte von <i>Drosophila melanogaster</i> “
1999	Forschungspraktikum bei der Asta Medica AG in Bielefeld
2000	Beginn der vorliegenden Dissertation an der LMU München bei Prof. Dr. Dr. W. Neupert in der Arbeitsgruppe von Dr. J. M. Herrmann