

Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner des mitochondrialen Hsp70

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

Von
Martin Sichtung
aus
Berlin

München

2007

Dissertation eingereicht am 21.03.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: PD Dr. Enrico Schleiff

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2007

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich, Martin Sichtung, versichere, dass die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist. Des Weiteren habe ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 08.03.2007

Martin Sichtung

Martin Sichtung

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chaperonvermittelte Proteinfaltung	1
1.2 Chaperonsysteme in Eubakterien	2
1.2.1 Trigger factor	2
1.2.2 Hsp70-Systeme in Eubakterien	3
1.2.3 GroEL / GroES – Das prokaryotische Chaperonin-System	6
1.2.4 Kleine Hitzeschockproteine	8
1.2.5 Hsp100	8
1.3 Chaperon-Systeme in der eukaryotischen Zelle	9
1.3.1 Mit den Ribosomen assoziierte Chaperone	9
1.3.2 Hsp70-Systeme im eukaryotischen Cytosol	10
1.3.3 Hsp90	11
1.3.4 TRiC – das eukaryotische Chaperonin	12
1.3.5 Weitere Chaperonsysteme in Eukaryoten	12
1.4 Chaperonsysteme in Mitochondrien	13
1.4.1 Mitochondriale Chaperone – Ein Überblick	13
1.4.2 Die Hsp70-Systeme in Mitochondrien	15
1.5 Die Rolle mitochondrialer Chaperone beim Proteintransport in Mitochondrien	17
1.5.1 Proteinimport in Mitochondrien – Ein Überblick	17
1.5.2 Die Funktion von Ssc1 im Importmotor der TIM23-Translokase	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 MATERIALIEN UND METHODEN	21
2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	21
2.1.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.1.3 Einführung von Punktmutationen mit dem <i>Quick-Change® Site directed mutagenesis Kit</i>	22
2.1.4 Restriktionsverdau von DNS	23
2.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten	23
2.1.6 Agarosegelelektrophorese von DNS	23
2.1.7 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNS	24

2.1.9	Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
2.1.10	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	24
2.1.11	Verwendete Plasmide	25
2.1.12	Klonierungsstrategien	26
2.2	Genetische Methoden in <i>S. cerevisiae</i>	30
2.2.1	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	30
2.2.2	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit rekombinanter DNS	31
2.2.4	Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“)	32
2.2.5	Austausch von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i> („ <i>plasmid shuffling</i> “)	32
2.2.6	Sporulation diploider <i>S. cerevisiae</i> -Stämme und Tetradendissektion	32
2.3	Proteinbiochemische Methoden	33
2.3.1	Synthese von ³⁵ S-markierten Proteinen <i>in vitro</i>	33
2.3.2	Reinigung rekombinanter Proteine mit MBP-Anhang aus <i>E. coli</i>	34
2.3.3	Reinigung rekombinanter Proteine mit Histidin-Anhang aus <i>E. coli</i>	34
2.3.4	Herstellung einer Mge1-Affinitätsäule	35
2.3.5	Reinigung von mtHsp70 aus <i>E. coli</i>	36
2.3.6	Reinigung von mtHsp70 aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.3.8	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	37
2.3.9	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	38
2.3.10	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	38
2.3.11	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.3.12	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	39
2.3.13	Bestimmung des Aggregationszustandes von mtHsp70 <i>in vitro</i>	39
2.3.14	Messung der ATPase-Aktivität von mtHsp70 (ATPase-Assay)	39
2.3.15	Messung der Nukleotidaustauschrate von mtHsp70 (Nukleotid-Austauschfaktor-Assay)	40
2.3.16	Kopplung rekombinanter Proteine an CNBr-aktivierte Sepharose	40
2.4	Zellbiologische Methoden	41
2.4.1	Fraktionierung von Hefezellen	41
2.4.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.4.3	Subfraktionierung von Mitochondrien	42
2.4.4	<i>In-vitro</i> -Proteinimport in isolierte Mitochondrien	43
2.4.5	Quervernetzung mitochondrialer Proteine	43
2.4.6	Bestimmung des Aggregationszustands mitochondrialer Proteine	44
2.4.7	Limitierte Proteolyse mitochondrialer Proteine	44
2.4.8	Bestimmung der Aktivität von MDH und SDH in Mitochondrien	44

2.5	Immunologische Methoden	45
2.5.1	Verwendete Antikörper	45
2.5.2	Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	45
2.5.3	Reinigung von Antikörpern	46
2.5.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	46
2.5.5	Immunpräzipitationsexperimente	47
2.6	Nährmedien	48
2.6.1	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	48
2.6.2	Medium für <i>E. coli</i>	49
2.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	49
2.8	Geräte	50
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Die J-Proteine des mitochondrialen Importmotors	52
3.1.1	Tim14 ist das essenzielle J-Protein des Importmotors	52
3.1.2	Mdj2 ist ein weiteres J-Protein des Importmotors in <i>S. cerevisiae</i>	54
3.1.3	Tim16, ein J-ähnliches Protein im Importmotor, reguliert die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 und Mdj2	56
3.2	Hep1, ein Chaperon für mitochondriale Hsp70-Proteine	58
3.2.1	Identifizierung eines 17 kDa-Proteins, das mit mtHsp70 interagiert	58
3.2.2	Subzelluläre und submitochondriale Lokalisierung von Hep1	60
3.2.3	Ssc3 interagiert nicht mit Hep1	62
3.2.4	Die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 ist ATP-abhängig	62
3.2.5	Die ATPase-Domäne von mtHsp70 ist notwendig für die Interaktion mit Hep1	65
3.2.6	Weder die isolierte ATPase-Domäne noch die PBD von mtHsp70 interagieren mit Hep1	67
3.2.7	Hep1 hat keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70	68
3.2.8	Hefezellen, in denen das <i>HEP1</i> -Gen deletiert ist, zeigen einen Temperatur-sensitiven Wachstumsphänotyp	70
3.2.9	Mitochondriale Hsp70-Proteine aggregieren in Mitochondrien aus <i>Δhep1</i> -Zellen	70
3.2.10	Mitochondriale Hsp70-Proteine sind in <i>Δhep1</i> -Zellen nicht funktionell	75
3.2.11	Hep1 ist ausreichend, um die Aggregation von mtHsp70 zu verhindern und es in einem funktionellen Zustand zu halten	77
3.2.12	Hep1 verhindert die Aggregation von mtHsp70 in <i>E. coli</i>	80
3.2.13	Nur vollständiges mtHsp70 hat die Tendenz zu aggregieren	82
3.2.14	DnaK ist ein lösliches Protein in Mitochondrien von <i>Δhep1</i> -Zellen	84
3.2.15	Durch Austauschen eines kurzen Abschnitts von mtHsp70 gegen den entsprechenden Bereich von DnaK entsteht ein lösliches Hsp70-Protein	84
3.2.16	SscK _{ins} kann die Deletion von <i>SSC1</i> teilweise komplementieren	87

3.2.17	SscK _{ins} zeigt eine veränderte Interaktion zu Hep1 und Mdj1	88
3.2.18	Die ATPase-Aktivität von SscK _{ins} wird durch Tim14 stimuliert, aber nicht durch Mdj1	89
4	DISKUSSION	91
4.1	Die J-Proteine des Importmotors der TIM23-Proteintranslokase	91
4.2	Hep1 ein Chaperon für mitochondriale Hsp70-Chaperone	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	102
7	ABKÜRZUNGEN	120
8	DANKSAGUNGEN	122
	LEBENS LAUF	124

1 Einleitung

1.1 Chaperonvermittelte Proteinfaltung

Proteine sind die wichtigsten Biokatalysatoren. Um ihre vielfältigen Funktionen in der Zelle ausüben zu können, müssen sie eine definierte Struktur einnehmen. Die Information über diese Struktur ist in ihrer Aminosäuresequenz kodiert. Durch Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Polypeptidkette faltet sich das Protein in eine dreidimensionale Struktur, seine native Konformation. Bei einigen Proteinen verläuft der Faltungsprozess in ihre native Konformation *in vitro* spontan und ohne die Hilfe anderer Proteine (Anfinsen, 1973; Kuwajima, 1992). Der Großteil aller Proteine benötigt jedoch Faltungshelfer, so genannte Chaperone, um in die native Form zu gelangen (Martin and Hartl, 1993). Als Chaperone bezeichnet man Proteine, die in der Lage sind, ungefaltete Abschnitte in Proteinen reguliert zu binden und wieder freizusetzen. Durch diese Bindung, die hauptsächlich an hydrophobe Sequenzen erfolgt, verhindern Chaperone unproduktive inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen und somit die Ausbildung von nicht nativen Faltungsintermediaten und Aggregaten (Ellis, 1997). Besonders für die Proteinfaltung in Zellen sind Chaperone notwendig, da hier sehr hohe Proteinkonzentrationen vorliegen, die unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen favorisiert (Ellis, 2001). Wie wichtig Chaperone für lebende Zellen sind, zeigt sich in der Tatsache, dass Zellen mit Deletionen von Chaperongenomen nicht oder nur sehr eingeschränkt lebensfähig sind.

Die Bedeutung korrekter Proteinfaltung wird durch viele neurodegenerative Krankheiten wie *Morbus Parkinson* (Winklhofer and Tatzelt, 2006), *Alzheimer* (Walter et al., 2001) oder *Chorea Huntington* (Landles and Bates, 2004) klar. Bei diesen Krankheiten führt die Anhäufung von Proteinaggregaten in spezifischen Bereichen des Gehirns zum Tod der Nervenzellen, wodurch die Symptome der Krankheiten hervorgerufen werden. Chaperone sind wichtige natürliche Verteidigungssysteme gegen eine derartige toxische Anhäufung von aggregierten Proteinen sind (Muchowski and Wacker, 2005).

Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen verfügen über verschiedene Chaperonsysteme, die in einem Netzwerk zusammenarbeiten, um die korrekte Faltung der vielen verschiedenen Polypeptidketten zu vermitteln (Young et al., 2004). Die Grundprinzipien der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung sind in allen lebenden Zellen konserviert.

Neben ihrer Funktion bei der *de-novo*-Faltung von Proteinen erfüllen Chaperone weitere Aufgaben in der Zelle. So verhindern sie die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen wie zum Beispiel einem Hitzeschock. Die meisten Chaperone werden unter diesen Bedingungen verstärkt exprimiert (Nollen and Morimoto, 2002), weshalb sie auch Hitzeschockproteine (Hsp) genannt werden. Chaperone spielen eine wichtige Rolle bei der Auflösung von Proteinaggregaten und können ubiquitinylierte Proteine an das Proteasom liefern (Young et al., 2003a).

Eine besondere funktionelle Vielfalt haben Hsp70-Systeme. Neben ihrer wichtigen Funktion in der Proteinfaltung sind sie Schlüsselkomponenten bei der Translokation von Proteinen in die Mitochondrien (Voos and Rottgers, 2002; Young et al., 2003b), die Chloroplasten (Soll and Schleiff, 2004) und ins Endoplasmatische Reticulum (ER) (Johnson and van Waes, 1999). Ebenso sind sie an der Exo- und Endocytose (Young et al., 2003a), bestimmten Signaltransduktionswegen, der Replikation von DNS und an der Ausbildung eines funktionellen Cytoskeletts beteiligt (Liang and MacRae, 1997).

1.2 Chaperonsysteme in Eubakterien

In vivo interagieren Chaperone bereits während der Translation mit der naszierenden Polypeptidkette. Im weiteren Verlauf des Faltungsprozesses interagieren dann Hsp70- und/oder Hsp60-Systeme mit den Polypeptidketten.

1.2.1 Trigger factor

Das erste molekulare Chaperon, das in *E. coli* mit der naszierenden Polypeptidkette interagiert, ist der *Trigger factor* (Hesterkamp et al., 1996). Er bindet an die L23-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms in der Nähe des Ausgangstunnels und an die L29-Untereinheit (Kramer et al., 2002). Der Ausgangstunnel wird somit durch den *Trigger factor* in einer Krippen-ähnlichen Form überbrückt (Ferbitz et al., 2004). Der *Trigger factor* hat keine ATPase-Aktivität und kann die Proteinfaltung nicht durch regulierte Bindung an ungefaltete Abschnitte unterstützen. Seine Funktion besteht vermutlich in der Abschirmung von hydrophoben Sequenzabschnitten, die das Ribosom verlassen. Außerdem verfügt der *Trigger factor* über eine Peptidyl-Prolyl-Cis-Transisomerase-Aktivität, die jedoch nicht essenziell für die Funktion des *Trigger factors* ist (Kramer et al., 2004).

Sobald die Polypeptidkette eine gewisse Länge erreicht hat und aus der von *Trigger factor* gebildeten Krippe am Ribosomenausgangstunnel austritt, wird sie von DnaK gebunden, einem Mitglied der Hsp70-Familie (Teter et al., 1999).

1.2.2 Hsp70-Systeme in Eubakterien

1.2.2.1 Hsp70-Systeme – ein Überblick

Hsp70-Chaperone haben eine N-terminale ATPase-Domäne, an die sich eine Peptidbindungsdomäne (PBD) anschließt (Chappell et al., 1987; Jiang et al., 2005; Montgomery et al., 1993). Diese beiden Domänen sind in allen Mitgliedern der Hsp70-Familie konserviert, wohingegen der C-Terminus eine hohe Variabilität zeigt. Die ATPase-Domäne und die PBD sind durch einen kurzen Sequenzabschnitt, den sogenannten Linker, miteinander verbunden. Die PBD besteht aus einer N-terminalen Substratbindungstasche, die von acht anti-parallelen β -Faltblättern gebildet wird (Zhu et al., 1996), auf die ein Bündel von fünf α -Helices folgt. Die letzten drei dieser Helices bilden einen Deckel, der die Substrat in Abhängigkeit des in der ATPase-Domäne gebundenen Nukleotids verschließen oder öffnen kann (Mayer et al., 2000). Der C-Terminus von Hsp70-Proteinen bildet keine definierte Sekundärstruktur aus und zeigt auf keine Konservierung der Primärsequenz.

Für die Funktion von Hsp70-Proteinen ist die Kommunikation zwischen der ATPase-Domäne und der PBD essenziell (Buchberger et al., 1999; Szabo et al., 1994). Die Affinität der PBD zu den Substraten hängt von dem in der ATPase-Domäne gebundenen Nukleotid ab (Buchberger et al., 1995; Flynn et al., 1991; Szabo et al., 1994; Wawrzynow and Zylicz, 1995). In der ATP-Form besitzt Hsp70 eine niedrige Affinität gegenüber seinen Substraten. Durch die Hydrolyse des ATPs zu ADP kommt es zu einer erheblichen Konformationsänderung im gesamten Protein. Hsp70-Proteine in der ADP-Form binden ihre Substrate mit hoher Affinität. Dieser Mechanismus bildet die Grundlage, auf der die Mitglieder der Hsp70-Familie ihre vielfältigen Funktionen ausüben. Die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung von ADP sind durch eine Reihe von Interaktionspartnern reguliert, den so genannten Cochaperonen (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002) (Abbildung 1.1). Ohne diese haben Hsp70-Proteine nur eine geringe ATPase-Aktivität und die Austauschrate des in der ATPase-Domäne gebundenen Nukleotids ist niedrig.

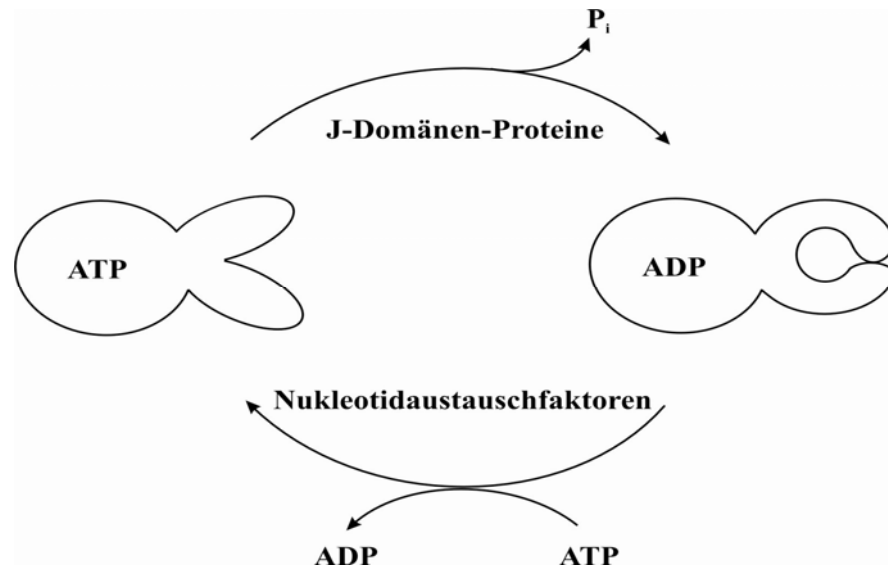


Abbildung 1.1: Der ATPase-Zyklus von Hsp70-Proteinen. In der ATP gebundenen Form haben Hsp70-Chaperone eine offene Substratbindungstasche. Sie binden ihre Substrate mit niedriger Affinität und tauschen gebundene Substrate schnell aus. Die Hydrolyse von ATP zu ADP, die durch J-Domänen-Cochaperone stimuliert wird, bewirkt eine Konformationsänderung des gesamten Proteins. In der ADP-Form ist die Substratbindungstasche der Hsp70-Proteine geschlossen. Die Substrataffinität ist hoch und die Austauschrate niedrig. Der Austausch von ADP gegen ATP, der von Nukleotidaustauschfaktoren stimuliert wird, schließt den Zyklus.

Die ATPase-Aktivität von Hsp70-Proteinen wird von J-Proteinen stimuliert (Kelley, 1999). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie haben eine J-Domäne. Die Interaktion zwischen dieser J-Domäne und einem Hsp70-Protein steigert die ATP-Hydrolyserate des Hsp70-Proteins. J-Domänen haben eine charakteristische Faltung von drei α -Helices. Bei einigen Familienmitgliedern schließt sich eine vierte Helix an diese Struktur an. Zwei dieser Helices bilden eine anti-parallele *Coiled-coil*-Struktur aus. Ein weiteres Charakteristikum der J-Domäne ist das konservierte Histidin-Prolin-Glutamat-(HPD)-Motiv, das in einer Schleife zwischen den Helices II und III liegt. Ein Austausch des Histidins zu Glutamin führt zum Verlust der Funktion der J-Domäne.

Neben der Stimulation der ATPase-Aktivität durch J-Proteine muss auch die Austauschrate von ADP und ATP gesteigert werden, damit Hsp70-Proteine ihre volle Funktionalität erreichen. Diese Aufgabe wird von den so genannten Nukleotidaustauschfaktoren übernommen (Brehmer et al., 2001). Im Gegensatz zu den J-Proteinen sind die Nukleotidaustauschfaktoren weder auf der Ebene der Primärsequenz noch in ihrem Reaktionsmechanismus konserviert. Deshalb werden die Mechanismen des Nukleotidaustauschs im Zusammenhang mit den einzelnen Hsp70-Systemen näher erläutert.

1.2.2.2 Das Hsp70-System in *E. coli*: DnaK – DnaJ – GrpE

In *E. coli* wurden drei Mitglieder der Hsp70-Familie gefunden. DnaK ist der am stärksten exprimierte Vertreter und ist an der Proteinfaltung beteiligt (Polissi et al., 1995). Seinen Namen verdankt dieses Protein seiner ursprünglichen Identifikation. Mutationen im DnaK-Gen unterdrücken die Replikation der DNS des Bakteriophagen λ (Georgopoulos et al., 1979). Später konnte gezeigt werden, dass DnaK unter Hitzeschockbedingungen verstärkt exprimiert wird und wichtig für die Proteinfaltung ist (Tilly et al., 1983). Ein *E. coli*-Stamm, in dem das DnaK-Gen deletiert wurde, ist zwar lebensfähig, zeigt aber einen stark temperatursensitiven Phänotyp (Paek and Walker, 1987). Unter normalen Wachstumsbedingungen erfüllt DnaK eine wichtige Funktion bei der Faltung von neu synthetisierten Proteinen.

Das J-Protein des DnaK-Systems ist DnaJ, das häufigste J-Protein in *E. coli*. Es ist der Namensgeber dieser Proteinfamilie. Wie DnaK wurde es aufgrund von Mutationen entdeckt, die die Replikation der DNA des Bakteriophagen λ unterdrücken (Georgopoulos et al., 1980). DnaJ hat vier Domänen (Kelley, 1998): Eine N-terminale J-Domäne, die die ATPase-Aktivität von Hsp70-Proteinen stimuliert, eine Glycin- und Phenylalanin-reiche Domäne (G/F-Domäne), eine Cystein-reiche Zinkfinger-Domäne und eine wenig konservierte C-terminale Domäne.

In allen Species finden sich Homologe von DnaJ, die eine molekulare Masse von etwa 40 kDa haben (Hartl, 1995; Kelley, 1998). Deshalb werden diese Proteine auch als Hsp40-Proteine bezeichnet. Es gibt aber auch Mitglieder der J-Proteinfamilie, die nicht alle vier Domänen besitzen. Einige Familienmitglieder besitzen nur die J-Domäne. Die Funktionen der anderen Domänen von Hsp40-Proteinen sind weniger gut charakterisiert. Es wird angenommen, dass die C-terminale Domäne für die Substratbindung verantwortlich ist (Linke et al., 2003).

Hsp40-Proteine sind in der Lage, ungefaltete Proteine zu binden, und dadurch deren Aggregation zu verhindern (Hendrick et al., 1993). Allerdings können sie diese nicht aktiv wieder in ihre native Konformation zurückbringen. Hsp40-Proteine besitzen somit eine „Halter“-Aktivität.

Die Rückfaltung in die native Konformation erfolgt im Zusammenspiel mit Hsp70-Proteinen (Bukau and Horwich, 1998). Auch diese können die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen verhindern, indem sie an teilweise entfaltete Proteine binden. Im Gegensatz zu Hsp40-Proteinen besitzen sie aber auch eine Faltungsaktivität, die es ihnen ermöglicht unter Verbrauch von ATP entfaltete Proteine in ihre native Konformation zu bringen. Dabei sind die Substratproteine entweder direkt von Hsp70-Proteinen gebunden oder

werden von einem Hsp40-Protein präsentiert (Langer et al., 1992). Der genaue Mechanismus der Proteinfaltung durch Hsp70-Systeme ist noch nicht endgültig geklärt. Ein Modell der Hsp70-Funktion geht davon aus, dass durch wiederholtes Binden und Freisetzen der Substrate die Konzentration an ungefalteten Proteinen so gering gehalten wird, dass sich die freien Substrate in ihre native Konformation falten können (Bukau and Horwich, 1998). Ein anderes Modell geht davon aus, dass die Energie aus der Hydrolyse von ATP dazu verwendet wird, Konformationsänderungen im Substrat hervorzurufen und somit kinetische Barrieren während des Faltungsprozesses zu überwinden (Bukau and Horwich, 1998).

Der Nukleotidaustauschfaktor für DnaK ist GrpE (Liberek et al., 1991). Es bindet in eine zentrale Spalte in der ATPase-Domäne von DnaK (Harrison et al., 1997). Dadurch wird die Nukleotidbindungsstelle von DnaK gestört. Diese Konformationsänderung führt zur Freisetzung des gebundenen ADP. Durch die anschließende Bindung von ATP schließt sich der ATPase-Zyklus.

Neben dem DnaK-DnaJ-GrpE-System gibt es noch zwei weitere Hsp70-Systeme in *E. coli*. Der zweite Vertreter der Hsp70-Familie in *E. coli* ist HscA (Seaton and Vickery, 1994). Dieses Hsp70-Protein ist an der Biogenese von Proteinen beteiligt, die ein Eisen-Schwefel-Cluster enthalten. Es interagiert mit einem spezialisierten J-Domänen Cochaperon, Hsc20 (Silberg et al., 1998).

Der dritte Vertreter der Hsp70-Familie in *E. coli* ist HscC (Kluck et al., 2002). Allerdings zeigt es eine für Hsp70-Proteine nur geringe Sequenzidentität von 30% bezogen auf DnaK. Wie HscA interagiert es mit einem spezifischen J-Domänen Cochaperon, Dj1C. Eine genaue molekulare Funktion von HscC konnte noch nicht bestimmt werden, allerdings sind *hscC*-Deletionsmutanten hypersensitiv gegenüber Cadmium-Ionen und UV-Strahlung.

1.2.3 GroEL / GroES – Das prokaryotische Chaperonin-System

Einige Proteine können nur mit Hilfe der Hsp70-Systeme in ihre native Konformation falten. Andere hingegen benötigen dazu auch das Hsp60-System (Langer et al., 1992).

Das Hsp60-System in *E. coli* besteht aus dem 57 kDa GroEL-Protein und seinem etwa 10 kDa Cofaktor GroES (Horwich et al., 1993). Solche Systeme bezeichnet man auch als Gruppe-I-Chaperonin-System. Chaperonine werden für die Faltung bestimmter Proteine benötigt. Aufgrund ihrer molekularen Masse nennt man GroEL auch Hsp60 und GroES Hsp10. GroEL bildet einen Doppelzylinder in dem zwei Ringe aus jeweils sieben GroEL-Monomeren Rücken an Rücken zueinander orientiert sind (Ewalt et al., 1997). Die GroEL-Untereinheiten haben drei Domänen: Eine ATP-Bindungsdomäne bildet die Kontaktstellen zwischen den beiden Ringen. Sie ist über eine Scharnierdomäne mit einer apikalen Domäne verbunden.

Diese apikalen Domänen bilden eine Öffnung, so dass jeder Ring ein zentrales Loch besitzt. Ungefaltete Proteine interagieren zunächst durch verschiedene hydrophobe Wechselwirkungen mit beweglichen Teilen der apikalen Domänen der GroEL-Untereinheiten. Danach werden sie in das zentrale Loch eingeschlossen. GroES bildet einen homoheptameren Ring, der ebenfalls mit den apikalen Domänen der GroEL-Untereinheiten interagiert.

Der Reaktionsmechanismus des Hsp60-Systems in *E. coli* beruht auf der negativen allosterischen Wechselwirkung zwischen den beiden GroEL-Ringen (Martin et al., 1993). Sie können nicht das gleiche Nukleotid binden. Der Zyklus beginnt mit der Bindung eines ungefalteten Proteins an den freien Ring eines GroEL-GroES-Komplexes (Abbildung 1.2). Man nennt den Ring, der GroES gebunden hat, *cis*-Ring und den GroES-freien Ring *trans*-Ring. Es folgt die Bindung von sieben ATP-Molekülen und GroES an den Ring, in dem sich das Substrat befindet. Dieser wird dadurch zum neuen *cis*-Ring. Die sieben ADP-Moleküle und GroES werden vom alten *cis*-Ring freigesetzt. Ebenso wird das Substrat in das Loch des neuen *cis*-Ringes verschoben und befindet sich nun in einer von GroES verschlossenen Höhle. Durch die Bindung von GroES kommt es zu starken Konformationsänderungen in den GroEL-Untereinheiten. Die Höhle vergrößert sich und ihre Kontaktfläche zum eingeschlossenen Protein wird hydrophiler. Dadurch wird die Faltung des eingeschlossenen Proteins begünstigt. Durch die Hydrolyse der sieben ATP-Moleküle wird die Zeit vorgegeben, die das Substrat in der GroEL-GroES-Höhle verbleibt. Sind diese Moleküle in ADP umgewandelt, kann ATP an den *trans*-Ring binden. Diese Bindung bewirkt die Freisetzung von GroES und des Substrats. Für die vollständige Faltung eines Proteins sind in der Regel mehrere Zyklen von Bindung und Freisetzung an GroEL/GroES notwendig.

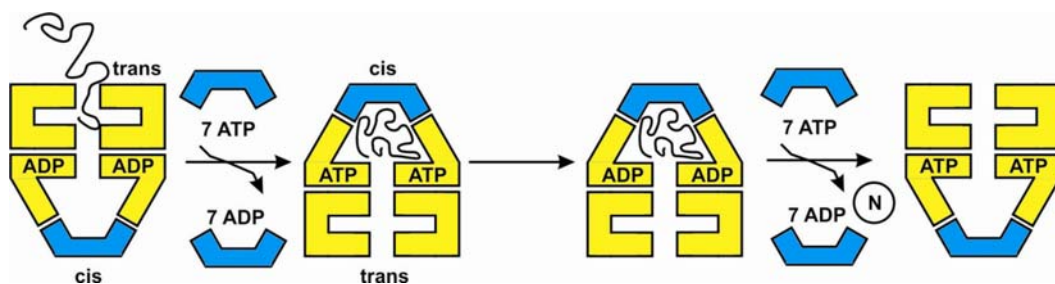


Abbildung 1.2: Proteinfaltung durch Hsp60-Chaperone. Ungefaltete Proteine binden an den freien Ring eines Hsp60-Hsp10-Komplexes und werden in dessen zentraler Höhle eingeschlossen. Durch Anlagerung von Hsp10 wird diese Höhle verschlossen. Die Hydrolyse von ATP führt zu Konformationsänderungen in der Höhle, welche die Faltung des Substrates begünstigen. Das Substrat wird dann durch Bindung von ATP und Hsp10 im *trans*-Ring freigesetzt. N, gefaltetes Protein in seiner nativen Konformation

Das GroEL-GroES-System kann auch Proteine falten, die zu groß sind, um in die zentrale Höhle zu passen (Chaudhuri et al., 2001). Der Mechanismus dieses Faltungsweges ist jedoch weniger gut beschrieben. Hier scheint GroEL eher eine „Halte“-Funktion auszuführen, welche die Faltung des Substratproteins in Lösung ermöglicht.

1.2.4 Kleine Hitzeschockproteine

Neben ihrer Funktion bei der Faltung von Proteinen verhindern Chaperone auch die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen wie zum Beispiel Hitze. So kommt es unter diesen Bedingungen zu einer verstärkten Expression der Chaperongene. Zusätzlich verfügt die Zelle über so genannte kleine Hitzeschockproteine (sHsp) (Haslbeck et al., 2005). Hierbei handelt es sich um Proteine mit einer molekularen Masse von 12 bis 43 kDa. Diese Proteine formen dynamische oligomere Komplexe, welche in der Lage sind ungefaltete Proteine zu binden. Allerdings sind sHsps nicht kontinuierlich aktiv, sondern wechseln zwischen einem Zustand mit niedriger Affinität zu ungefalteten Proteinen in einen Zustand mit hoher Affinität. Der Übergang von niedriger zu hoher Affinität wird durch Stress ausgelöst. Ein aktiver sHsp-Komplex bindet fest an seine Substrate. In *E. coli* werden die an das sHsp IbpB gebundenen Substrate an das Hsp70-System übergeben und von diesem wieder gefaltet (Veinger et al., 1998).

Wenn unter Stressbedingungen die ATP-abhängigen Chaperone nicht mehr in der Lage sind, alle ungefalteten Proteine zu binden und rückzufalten, werden diese von sHsps gebunden. Somit entsteht ein Reservoir nicht nativer faltungskompetenter Proteine, die rückgefaltet werden, sobald die Zelle keinem Stress mehr ausgesetzt ist. Kleine Hitzeschockproteine ermöglichen es der Zelle, die Unterbindung der Proteinaggregation zeitlich von der ATP-abhängigen Rückfaltung zu trennen.

1.2.5 Hsp100

Trotz der Anwesenheit von Chaperonen kann es in der Zelle zur Aggregation von Proteinen kommen. Da die Anhäufung von Proteinaggregaten schädlich für die Zelle ist, gibt es spezialisierte Chaperone, die diese Aggregate wieder auflösen. Diese Chaperone gehören zur Hsp100-Familie und haben eine ATP-abhängige Proteinfaltungsaktivität. Diese verwenden sie nicht nur zur Auflösung von Proteinaggregaten, sondern auch zur Entfaltung von Proteinen, die anschließend von Proteasen abgebaut werden (Schirmer et al., 1996). Entsprechend dieser beiden Funktionen werden Hsp100-Chaperone in zwei Gruppen eingeteilt:

Die Mitglieder der Hsp104 oder ClpB-Unterfamilie kooperieren mit dem Hsp70-System beim Auflösen von Aggregaten und der Rückfaltung der aggregierten Proteine (Horwich, 2004). Die Mitglieder der ClpA-Unterfamilie (ClpA, ClpC und ClpX-Proteine) arbeiten mit Proteasen der ClpP-Familie zusammen (Bukau et al., 2006). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler biologischer Prozesse, indem sie Schlüsselenzyme für den Abbau durch Proteasen zugänglich machen.

1.3 Chaperon-Systeme in der eukaryotischen Zelle

Wie prokaryotische Zellen so enthalten auch eukaryotische Zellen verschiedene Chaperon-Systeme. Obwohl die grundlegenden Mechanismen der Proteinfaltung zwischen Prokaryoten und Eukaryoten konserviert sind, unterscheiden sich die einzelnen Chaperonsysteme in manchen Aspekten. So verfügt die eukaryotische Zelle über Chaperon-Systeme im Cytosol (Young et al., 2004), dem ER (Kleizen and Braakman, 2004) sowie den Chloroplasten (Becker, 2005) und Mitochondrien (Voos and Rottgers, 2002). Allerdings ähneln die Chaperonsysteme der Chloroplasten und Mitochondrien eher denen der Eubakterien als denen des eukaryotischen Cytosols, was auf den endosymbiontischen Ursprung dieser Organellen zurückzuführen ist. Größere Unterschiede zu den Chaperonsystemen der Eubakterien finden sich aber bei den Chaperon-Systemen des eukaryotischen Cytosols.

1.3.1 Mit den Ribosomen assoziierte Chaperone

Im eukaryotischen Cytosol gibt es kein Homolog des *Trigger factors*. Allerdings kommt es auch hier zu Interaktionen zwischen Chaperonen und naszierenden Polypeptidketten, sobald diese das Ribosom verlassen. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) interagiert ein Heterodimer aus dem J-Domänen Protein *Zuotin* und dem Hsp70-ähnlichen Protein *Ssz1* (Gautschi et al., 2001). Der Komplex aus *Zuotin* und *Ssz1* wird RAC (*ribosome associated complex*) genannt. RAC ist über *Zuotin* an das Ribosom gebunden. Es rekrutiert *Ssb1* und *Ssb2*, zwei Hsp70-Chaperone an das Ribosom. Die ATPase-Aktivität dieser *Ssb*-Chaperone wird durch die J-Domäne des *Zuotins* stimuliert.

Neben RAC gibt es einen zweiten Chaperon-Komplex, der im eukaryotischen Cytosol mit naszierenden Polypeptiden interagiert. Er wird NAC (*nascent-polypeptide-associated complex*) genannt und ist für den korrekten Transport von naszierenden Ketten zum ER notwendig (Wiedmann et al., 1994).

Einige Proteine benötigen für ihre Faltung Prefoldin (Geissler et al., 1998). Dieses Chaperon bindet an die naszierenden Ketten von zum Beispiel Tubulin und Actin und kooperiert bei deren Faltung mit dem Chaperonin-System des eukaryotischen Cytosols.

1.3.2 Hsp70-Systeme im eukaryotischen Cytosol

Wie in Eubakterien sind auch im eukaryotischen Cytosol Hsp70- und Chaperonin-Systeme für die weitere Faltung der Proteine notwendig.

Die Hefe *S. cerevisiae* verfügt über vierzehn Gene, die für Hsp70-Proteine kodieren. Neun dieser Hsp70-Proteine befinden sich im Cytosol. Neben den bereits erwähnten zwei Ssb-Chaperonen und Ssz1, die mit dem Ribosom assoziiert sind, findet man vier Ssa-Proteine und zwei Sse-Proteine. Von den vier Ssa-Proteinen sind unter normalen Wachstumsbedingungen nur Ssa1p und Ssa2p detektierbar. Unter Stressbedingungen werden aber alle vier Proteine exprimiert. Die Sse-Chaperone gehören zur Hsp110-Subfamilie, die ausschließlich in Eukaryoten gefunden wird (Easton et al., 2000). Sie sind nicht aktiv an der Proteinfaltung beteiligt, unterstützen diese aber durch ihre „Halte“-Aktivität und durch Stimulierung der Hsp70-Hsp90-Komplexe. Des Weiteren fungieren sie als Nukleotidaustauschfaktoren für Ssa und Ssb-Proteine (Dragovic et al., 2006).

Die Vielzahl an Hsp70-Chaperonen ermöglicht ein breites Spektrum an Funktionen. So sind Hsp70-Proteine im eukaryotischen Cytosol neben der Proteinfaltung auch an der Endocytose, der Exocytose, dem Transport von Proteinen, dem Aufbau des Cytoskeletts und dem regulierten Auf- und Abbau von Proteinkomplexen beteiligt (Young et al., 2003a).

Im Gegensatz zu den Ssb-Chaperonen, deren ATPase-Aktivität vermutlich von *Zuotin* stimuliert wird, interagieren die Ssa-Chaperone mit mehreren verschiedenen DnaJ-Homologen. Mit Hilfe dieser Proteine können die Hsp70-Proteine ihre verschiedenen Funktionen ausführen (Silver and Way, 1993). Während der Faltung von Proteinen interagieren die Ssa-Proteine mit den zwei Hsp40-Proteinen Ydj1 und Sis1p (Lu and Cyr, 1998). Diese beiden Proteine sind allerdings nicht redundant und haben unterschiedliche Substratspezifitäten. Der Mechanismus der Proteinfaltung ähnelt sehr dem des DnaK-DnaJ-Systems. Das am besten untersuchte J-Domänen-Protein im Cytosol von *S. cerevisiae* ist Auxilin (Aux1). Es ist an der Hsp70-vermittelten Ablösung von Clathrin von Clathrin-umhüllten Vesikeln während der Endocytose beteiligt (Ungewickell et al., 1995). Auxilin hat eine J-Domäne am C-Terminus, verfügt aber sonst über keine weitere typische Domäne eines Hsp40-Proteins. Stattdessen besitzt es eine Clathrin-bindende Domäne. Diese bindet an die Clathrin-umhüllten Vesikel. Mit Hilfe seiner J-Domäne rekrutiert Auxilin nun ein Hsp70-Protein und stimuliert dessen ATPase-Aktivität. Die ADP-Form von Hsp70 bindet sehr fest

an Clathrin. Dies führt zu einer Konformationsänderung im Clathrin, was wiederum dessen Ablösung vom Vesikel bewirkt (Ungewickell et al., 1997).

Ein Unterschied zu prokaryotischen Hsp70-Systemen lässt sich auch bei den Nukleotidaustauschfaktoren feststellen. Es findet sich kein Homolog von GrpE im eukaryotischen Cytosol. Stattdessen enthält das Cytosol von *S. cerevisiae* zwei Nukleotidaustauschfaktoren: Sn1p (BAG-1 in Säugetieren) (Sondermann et al., 2002) und Fes1p (HSPBP1 in Säugetieren) (Shomura et al., 2005). Obwohl Sn1p und GrpE keine Ähnlichkeit in ihrer Primärsequenz zeigen, ist ihr Funktionsmechanismus sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu verwendet Fes1p einen anderen Mechanismus für den Nukleotidaustausch (Shomura et al., 2005). Während durch die Bindung von GrpE oder Sn1p die Nukleotidbindungsstelle eines Hsp70-Proteins in eine „offene“ Konformation gezwungen wird, kommt es durch die Bindung von Fes1p zu einer Verschiebung innerhalb der Bindungstasche. Diese Verschiebung verringert die Affinität des Hsp70-Proteins zu ADP. Neben Sn1p und Fes1p fungieren auch die Mitglieder der Hsp110-Subfamilie als Nukleotidaustauschfaktoren (Dragovic et al., 2006).

Hsp70-Chaperone des eukaryotischen Cytosols sind auch an der Proteintranslokation beteiligt, zum Beispiel am Proteintransport in Peroxisomen (Hetteema et al., 1998) und am Proteinimport in Mitochondrien. Die meisten mitochondrialen Proteine werden an freien Ribosomen im Cytosol als Vorläuferproteine synthetisiert und posttranslational in das Organell importiert (Neupert, 1997). Die Vorläuferproteine werden im Cytosol von Hsp70-Chaperonen im Zusammenspiel mit den J-Proteinen Hdj1 und Hdj2 gebunden und in einem importkompetenten Zustand gehalten (Terada et al., 1997). In Säugern konnte gezeigt werden, dass Hsp70 und Hsp90 Komplexe mit Vorläuferproteinen bilden und diese zu den Importrezeptoren in der mitochondrialen Außenmembran bringen (Young et al., 2003b).

1.3.3 Hsp90

Eine weitere Besonderheit des eukaryotischen Cytosols ist die Anwesenheit von Hsp90-Chaperonen. Diese arbeiten bei der Faltung von bestimmten Proteinen mit Hsp70-Chaperonen zusammen. Dabei binden die Hsp70-Proteine ungefaltete oder nur partiell gefaltete Substrate. Die endgültige Faltung erfolgt dann im Zusammenspiel mit Hsp90 (Young et al., 2001). Hsp90-Proteine bilden Homodimere. Jedes Monomer hat eine N-terminale ATPase-Domäne, die für die Funktion von Hsp90 essenziell ist (Panaretou et al., 1998), eine zentrale Region und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne. Wenn ATP in der N-terminalen Domäne gebunden ist, können auch die N-terminalen Domänen im Hsp90-Dimer miteinander

interagieren. Dadurch können Substrate von Hsp90 eingeschlossen werden. Die Hydrolyse von ATP führt dann zur Öffnung dieser Struktur und zur Freisetzung des Substrates.

Die Interaktion zwischen Hsp70- und Hsp90-Proteinen wird von dem Cochaperon HOP (Chen and Smith, 1998) (*Hsp-organizing protein*, Sti1p in *S. cerevisiae* (Wegele et al., 2003)) koordiniert. Dieses Protein bindet sowohl Hsp90 als auch Hsp70 über Tetratricopeptid Repeat (TPR)-Domänen. Es verringert die ATPase-Aktivität von Hsp90 und ist vermutlich am Transfer von Substraten von Hsp70 zu Hsp90 beteiligt. Die Rückbindung von noch nicht vollständig gefalteten Substraten an Hsp70 wird von *TPR2* unterstützt (Brychzy et al., 2003). Dieses Cochaperon verfügt über mehrere TPR-Domänen, mit denen es an Hsp90 und Hsp70 bindet. Es ist ein Mitglied der J-Proteinfamilie.

1.3.4 TRiC – das eukaryotische Chaperonin

Das Chaperonin-System des eukaryotischen Cytosols TRiC (TCP1 enthaltender Ring-Komplex) unterscheidet sich stark von dem in Eubakterien (Young et al., 2004). Man spricht deshalb von Gruppe-II-Chaperoninen. TRiC formt einen Doppelring aus je acht Untereinheiten, die eine äquatoriale ATPase-Domäne und eine apicale Substratbindungsdomäne haben. Hier zeigt sich eine strukturelle Verwandtschaft zu den Gruppe-I-Chaperoninen der Eubakterien. Allerdings haben die apikalen Domänen der TRiC-Untereinheiten Einschübe, die vermutlich das zentrale Loch während des Faltungsprozesses verschließen. Die apikalen Domänen der TRiC-Untereinheiten übernehmen somit die Funktion von GroES aus Eubakterien, das kein Homolog im eukaryotischen Cytosol hat. Der genaue Faltungsmechanismus der Gruppe-II-Chaperonine ist noch nicht aufgeklärt.

1.3.5 Weitere Chaperonsysteme in Eukaryoten

Das eukaryotische Cytosol verfügt, wie das Cytosol der Bakterien, über Hsp100- und Hsp104-Chaperone (Parsell et al., 1994; Parsell et al., 1991). Die Struktur und der Mechanismus dieser Proteine ähneln denen ihrer bakteriellen Homologen. Auch kleine Hitzeschockproteine befinden sich im eukaryotischen Cytosol (Haslbeck et al., 2005). Obwohl sie auf Ebene der Primärstruktur kaum Ähnlichkeiten untereinander oder zu den kleinen Hitzeschockproteinen der Eubakterien haben, bilden sie vergleichbare oligomere Strukturen aus. Es wird deshalb vermutet, dass sich die Funktionsweise eukaryotischer und bakterieller Hsp104-Chaperone ähnelt.

Neben dem Cytosol enthalten auch einige Organellen der eukaryotischen Zelle Chaperone. So finden sich im ER von *S. cerevisiae* zwei Mitglieder der Hsp70-Familie: Kar2 (BiP in höheren Organismen) und Ihs1. Kar2 ist an der Proteintranslokation ins ER (Zimmermann et al., 2006)

und an der Proteinfaltung im ER (Kleizen and Braakman, 2004) beteiligt. Ihs1 interagiert mit Kar2 und dient als Nukleotidaustauschfaktor (Steel et al., 2004). Ebenso enthält das ER ein vollständiges Chaperonsystem zur Faltung glykosylierter Proteine sowie Chaperone, die die Faltung von Proteinen mit Disulfidbrücken katalysieren (Kleizen and Braakman, 2004).

Ein weiteres Organell der eukaryotischen Zelle mit eigenständigem Chaperonsystem ist der Chloroplast (Becker, 2005). Dieses System ist aufgrund des bakteriellen Ursprungs der Chloroplasten mit dem Chaperonsystem der Bakterien verwandt. Im Stroma des Chloroplasten befinden sich Gruppe-I-Chaperonine, Vertreter der Hsp100-Familie und mindestens ein vollständiges Hsp70-System. Eine Besonderheit der Chloroplasten stellt ein Hsp70-Protein dar, das sich im Intermembranraum befindet und am Proteinimport in Chloroplasten beteiligt ist (Soll and Schleiff, 2004). Auch Mitochondrien verfügen über ein eigenständiges Chaperonsystem.

1.4 Chaperonsysteme in Mitochondrien

1.4.1 Mitochondriale Chaperone – Ein Überblick

Mitochondrien sind durch Endosymbiose eines α -Proteobakteriums mit einer Vorläuferzelle der Eukaryoten entstanden (Gray et al., 1999). Die Identität dieser Zelle ist bislang nicht endgültig geklärt. Viele Eigenschaften der Mitochondrien erinnern an ihre bakterielle Abstammung. Viele Proteine, die wichtige biologische Prozesse in Mitochondrien (wie die Proteintranslation, die Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese oder die oxidative Phosphorylierung) katalysieren, haben Homologe in Eubakterien. Mitochondrien haben eine Doppelmembran. In der äußeren Membran findet man β -barrel-Proteine, die auch in der Außenmembran von Bakterien vorkommen. Alle anderen eukaryotischen Membranproteine haben jedoch keine β -barrel-Struktur. Ebenso ist der Proteintranslationsapparat der Mitochondrien näher mit dem prokaryotischen Proteintranslationsapparat verwandt als mit dem eukaryotischen.

Die Verwandtschaft der Mitochondrien zu Bakterien spiegelt sich auch in den Chaperonsystemen der mitochondrialen Matrix wieder (Voos and Rottgers, 2002) (Abbildung 1.3). Diese ähneln sehr stark den Chaperonsystemen in Eubakterien. So haben Mitochondrien klassische Hsp70- und Hsp60-Systeme, die eine korrekte Proteinfaltung in der mitochondrialen Matrix gewährleisten. Die Hsp70-Systeme der Mitochondrien sind Gegenstand dieser Arbeit und werden deshalb im folgenden Kapitel detailliert besprochen

(siehe 1.4.2). Das Gruppe-I-Chaperonin-System in Mitochondrien, welches sonst nur in Eubakterien vertreten ist (Manning-Krieg et al., 1991), wird von den Proteinen Hsp60, dem Homolog zu GroEL, und Hsp10, dem Homolog zu GroES, gebildet. Allerdings bildet Hsp60 in Mitochondrien von Säugetieren keinen Doppelring aus, sondern nur einen einfachen Ring aus sieben Untereinheiten (Nielsen and Cowan, 1998). Trotzdem ist es in der Lage eine Deletion von GroEL in *E. coli* zu komplementieren (Nielsen et al., 1999). Es wird davon ausgegangen, dass der Mechanismus der Proteinfaltung durch das mitochondriale Hsp60/Hsp10-System dem Mechanismus des bakteriellen GroEL/GroES-System ähnelt.

Eine Besonderheit der Chaperonsysteme in Mitochondrien ist die Anwesenheit der Petidyl-Prolyl-Cis-Transisomerase Cyclophilin/Cpr3 (Matouschek et al., 1995). Dieses Protein ist zwar nicht essenziell für die Proteinfaltung in der mitochondrialen Matrix, es beschleunigt diese aber und erhöht die Faltungsrate importierter Proteine.

Wie in Eubakterien findet sich auch in Mitochondrien ein Vertreter der Hsp100-Familie. In *S. cerevisiae* wird dieses Protein aufgrund seiner molekularen Masse von 78 kDa Hsp78 genannt und gehört der Hsp104-Subfamilie an (Leonhardt et al., 1993; Schmitt et al., 1995). Es ist sowohl an der Rückfaltung von aggregierten Proteinen (im Zusammenspiel mit dem Hsp70-System) als auch am proteolytischen Abbau von Proteinen (im Zusammenspiel mit der Protease Pim1) (Wagner et al., 1994) beteiligt.

Die Protease Pim1 gehört, wie auch Hsp78, zur Superfamilie der AAA-Proteine (ATPase assoziiert mit verschiedenen zellulären Aktivitäten). Sie ist ein Homolog der bakteriellen LON-Protease und hat neben ihrer proteolytischen Aktivität vermutlich auch Chaperonaktivität (Suzuki et al., 1994; van Dyck et al., 1998). Weitere Mitglieder der AAA-Familie in Mitochondrien sind die AAA-Proteasen der Innenmembran. Yme1 bildet ein Homohexamer, dessen aktive Zentren sich im Intermembranraum befinden. Deshalb bezeichnet man diesen Komplex als i-AAA-Protease (Leonhard et al., 2000). Neben seiner proteolytischen Aktivität bindet Yme1 über seine AAA-Domäne an entfaltete Proteine und erkennt so den Faltungszustand von Proteinen des Intermembranraumes (Leonhard et al., 1999). Die AAA-Domäne verhindert also die Aggregation von entfaltenen Proteinen bis diese vollständig abgebaut sind. Außerdem wird vermutet, dass die AAA-Domäne aktiv Substratprotein aus der Innenmembran extrahieren kann. Eine ähnliche Protease der Innenmembran hat ihre aktiven Zentren auf der Matrixseite und wird dementsprechend m-AAA-Protease genannt. Sie ist ein Heterohexamer aus den Untereinheiten Yta10 und Yta12 (Tzagoloff et al., 1994).

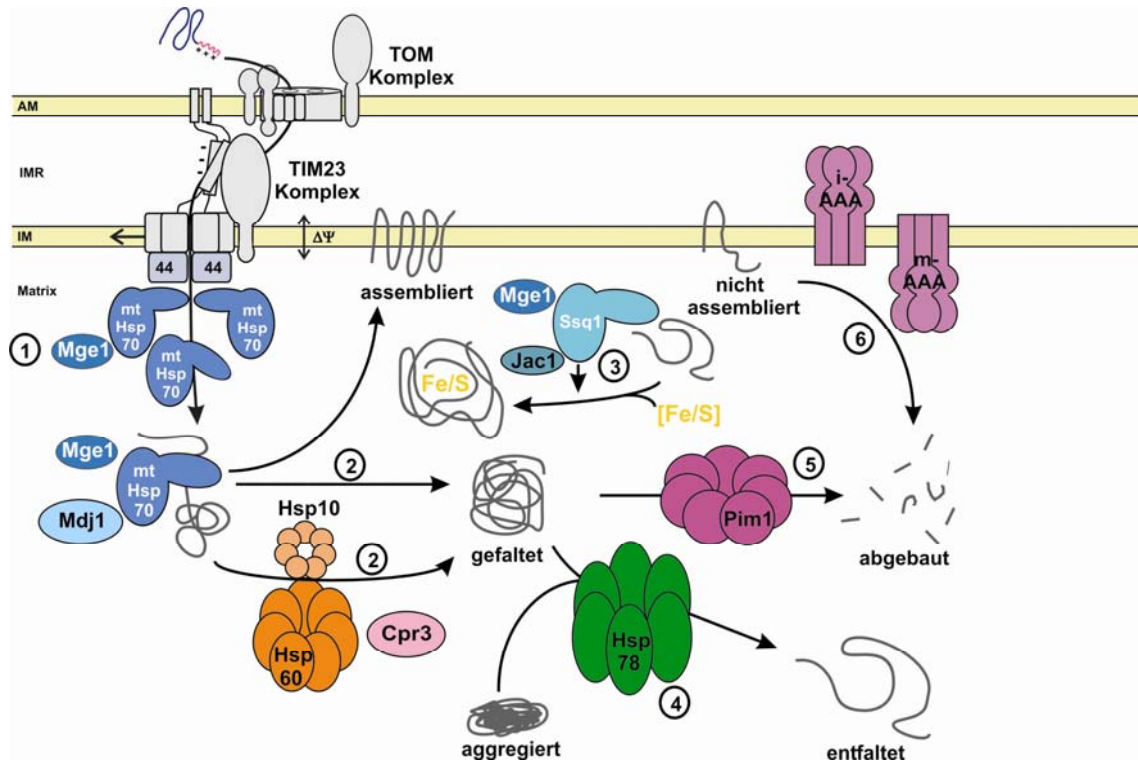


Abbildung 1.3: Chaperonsysteme in Mitochondrien Ssc1, ein Mitglied der Hsp70-Familie, ist die ATP-verbrauchende Untereinheit der TIM23-Translocase (1). Ebenso vermittelt es die Faltung von importierten Proteinen in Zusammenarbeit mit dem Hsp60-System (2). Ssq1, ein anderes Mitglied der Hsp70-Familie ist an der Biogenese von Proteinen beteiligt, die einen Eisen-Schwefel-Cluster enthalten (3). Hsp78 ist an der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt (4). Die Proteine aus diesen Aggregaten werden dann entweder mit Hilfe der Hsp70- und Hsp60-Systeme gefaltet oder von der Protease Pim1 abgebaut (5). AAA-Proteasen in der Innenmembran extrahieren nicht korrekt inserierte Membranproteine und bauen sie ab (6). AM: Außenmembran, IMR: Intermembranraum, IM: Innenmembran, 44: Tim44

1.4.2 Die Hsp70-Systeme in Mitochondrien

In den Mitochondrien von höheren Eukaryoten befindet sich nur ein Mitglied der Hsp70-Familie, das Ssc1 oder mitochondriales Hsp70 (mtHsp70) genannt wird. Einige Hefearten enthalten aber zwei mitochondriale Vertreter dieser Proteinfamilie und in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* finden sich sogar drei Hsp70-Chaperone.

Wie alle Hsp70-Proteine so bestehen auch die mitochondrialen Vertreter der Hsp70-Familie aus einer N-terminalen ATPase-Domäne, die über eine Linkerregion mit der PBD verbunden ist. Der C-Terminus dieser Proteine bildet einen Deckel aus, der die PBD verschließt (Moro et al., 2002). Ebenso interagieren die mitochondrialen Hsp70-Proteine während ihres Reaktionszyklusses mit J-Domänen-Cochaperonen (Kim et al., 2001; Lutz et al., 2001;

Rowley et al., 1994; Westermann et al., 1996; Westermann and Neupert, 1997) und dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Miao et al., 1997; Westermann et al., 1995).

Da in dieser Arbeit *S. cerevisiae* als Modellorganismus verwendet wurde, werden im Folgenden die Funktionen der verschiedenen mitochondrialen Hsp70-Proteine in diesem Organismus beschrieben. Da es in höheren Eukaryoten aber nur ein mitochondriales Hsp70-Protein gibt, werden alle hier erwähnten Funktionen in diesen Organismen von diesem einen Hsp70 ausgeführt.

Ssc1 ist der am stärksten exprimierte Vertreter der Hsp70-Familie in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* (Craig et al., 1989). Es wird auch als multifunktionales mitochondriales Hsp70 (mtHsp70) bezeichnet. *SSC1* ist in *S. cerevisiae* ein essenzielles Gen (Craig et al., 1987). Das hebt seine besondere Bedeutung hervor. Ssc1 erfüllt viele wichtige Funktionen in Mitochondrien. So ist es an der Faltung von sowohl kernkodierten als auch mitochondrial kodierten Proteinen beteiligt (Kang et al., 1990). Ebenso spielt es eine wichtige Rolle bei Proteinabbau in der mitochondrialen Matrix (Savel'ev et al., 1998) und ist eine zentrale Komponente des Importmotors der TIM23-Translokase, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird. Auch zur Aufrechterhaltung der korrekten Morphologie der Mitochondrien wird Ssc1 benötigt (Kawai et al., 2001).

MtHsp70 interagiert mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Miao et al., 1997) und mit dem Hsp40-Protein Mdj1 (Rowley et al., 1994). Diese drei Proteine vermitteln die Proteinfaltung in Mitochondrien (Gambill et al., 1993; Horst et al., 1997; Westermann et al., 1996; Westermann et al., 1995). MtHsp70 ist ein Teil der Endonuclease *EndoSec1*, die mtHsp70 für ihre Aktivität benötigt (Morishima et al., 1990). Das erklärt, warum die Beeinträchtigung der Funktion von mtHsp70 (Moczko et al., 1995) oder Mdj1 (Duchniewicz et al., 1999) leicht zum Verlust der mitochondrialen DNA führt.

Der zweite Vertreter der Hsp70-Familie in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* ist Ssq1. Es ist ein spezialisiertes Hsp70-Protein, das an der Biogenese von Proteinen beteiligt ist, die ein Eisen-Schwefel-Cluster enthalten (Lutz et al., 2001; Muhlenhoff and Lill, 2000). Die Deletion von *SSQ1* führt in *S. cerevisiae* zu einem Kälte-sensitiven Phänotyp (Schilke et al., 1996) und zur Anhäufung von Eisen in den Mitochondrien. Ssq1 interagiert mit dem J-Protein Jac1 (Kim et al., 2001; Lutz et al., 2001) und dem Gerüstprotein Isu1 (Dutkiewicz et al., 2004), welche die homologen Proteine der Eisen-Schwefel-Cochaperone aus Bakterien sind. Im Gegensatz zu diesen beiden Proteinen, die die Mitochondrien von ihren bakteriellen Vorläufern geerbt haben, wird davon ausgegangen, dass sich Ssq1 aus Ssc1 entwickelt hat (Schilke et al., 2006). So kann die Überexpression von Ssc1 eine Deletion von Ssq1 kompensieren und die

Funktion von Ssq1 wird in höheren Eukaryoten von Ssc1 übernommen. Außerdem interagieren beide Proteine mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1, dem mitochondrialen Homolog des bakteriellen GrpE (Schmidt et al., 2001).

Die Funktion des dritten Hsp70-Proteins in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, Ecm10 (*extracellular mutant 10*), das auch Ssc3 genannt wird (Baumann et al., 2000), ist nicht genau bekannt. Es wurde bei einer Selektionsuntersuchung gefunden, in der nach Genen gesucht wurde, deren Inaktivierung eine erhöhte Sensitivität von *S. cerevisiae*-Zellen gegenüber der die Zelloberfläche angreifenden Chemikalie Calciflour White zeigen (Lussier et al., 1997). Ssc3 kann den Phänotyp einer temperatursensitiven Mutante von Ssc1, dem Hauptvertreter der Hsp70-Familie in Mitochondrien, teilweise komplementieren (Baumann et al., 2000). Eine Deletion des *SSC3*-Gens zeigt neben der erhöhten Sensitivität gegenüber Calciflour White keinen Phänotyp. Das endogene Expressionsniveau von Ssc3 ist sehr niedrig und somit eine Funktion als allgemeines Chaperon eher unwahrscheinlich.

1.5 Die Rolle mitochondrialer Chaperone beim Proteintransport in Mitochondrien

1.5.1 Proteinimport in Mitochondrien – Ein Überblick

Die Mitochondrien von *S. cerevisiae* enthalten etwa 800 Proteine (Sickmann et al., 2003). Es werden jedoch nur acht dieser Proteine vom mitochondrialen Genom kodiert. Der Hauptteil der mitochondrialen Proteine ist im Kern kodiert und wird an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. Diese Proteine werden dann vorwiegend posttranslational in die Mitochondrien importiert (Neupert, 1997). Allerdings wurde auch über cotranslationalen Import in Mitochondrien berichtet (Marc et al., 2002). Wie bereits erwähnt, halten Hsp70- und Hsp90-Chaperone die zu importierenden Proteine im Cytosol in einem importkompetenten Zustand (Murakami et al., 1988; Young et al., 2003b) und bringen sie zu den Rezeptoren des TOM(*translocase of the outer membrane*)-Komplexes (Stan et al., 2000) in der Außenmembran der Mitochondrien. Neben seiner Rezeptorfunktion bildet der TOM-Komplex auch die generelle Importpore (GIP) (Ahting et al., 1999), durch die fast alle mitochondrialen Proteine importiert werden. Hier trennen sich dann die Importwege je nach der Beschaffenheit des importierten Proteins.

Außenmembranproteine mit N- oder C-terminalen Membranankern werden mit Hilfe des TOM-Komplexes in die Außenmembran eingebaut (Ahting et al., 2005; Waizenegger et al., 2003). Die komplexeren β -barrel-Proteine der mitochondrialen Außenmembran werden mit

Hilfe der kleinen Tim(*translocase of the inner membrane*)-Proteine (Hoppins and Nargang, 2004) des Intermembranraums zum TOB(*topogenesis of outer membran β -barrel-proteins*)-Komplex gebracht (Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Dieser übernimmt dann die Insertion in die Außenmembran.

Proteine des Intermembranraums, die konservierte Cysteinmotive enthalten, werden mit Hilfe des Erv1-Mia40-Systems importiert (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005; Terziyska et al., 2005). Dabei bilden sich Disulfidbrücken zwischen dem importierten Protein und dem Rezeptor Mia40. Anschließend löst sich das importierte Protein vom Rezeptor, wobei der Rezeptor reduziert wird. Das importierte Protein faltet sich dann im Intermembranraum. Die reduzierten Cysteine des Rezeptors Mia40 werden von der Sulphydroxidase Erv1 reoxidiert.

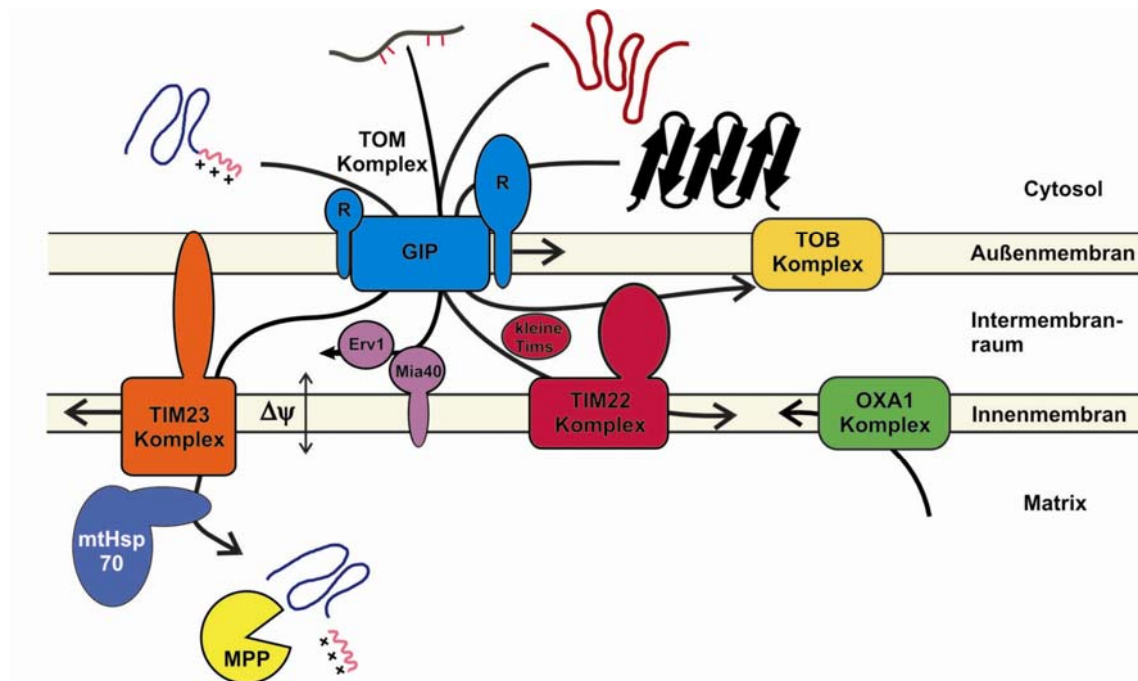


Abbildung 1.4 Proteinimport in Mitochondrien. Beschreibung siehe Text.

Polytopische Innenmembranproteine werden von den kleinen Tim-Proteinen zum TIM22-Komplex gebracht, der sie dann in die Innenmembran einbaut (Bauer et al., 2000; Rehling et al., 2004). Homotopische Innenmembranproteine mit einer N-terminalen Signalsequenz werden von der TIM23-Translokase in die Innenmembran lateral inseriert (Meier et al., 2005). Die gleiche Translokase benutzen auch einige kernkodierte polytopische Innenmembranproteine mit N-terminaler Signalsequenz. Allerdings werden diese Proteine nicht lateral inseriert, sondern gelangen zunächst in die mitochondriale Matrix, von wo aus sie in die Innenmembran inseriert werden (Rojo et al., 1995). Der OXA1-Komplex vermittelt die

Insertion der vom mitochondrialen Genom kodierten Proteine in die Innenmembran (Hell et al., 1997; Hell et al., 2001).

Die Mehrheit aller mitochondrialen Proteine hat eine N-terminale Signalsequenz und wird über die TIM23-Translokase in die Matrix importiert. Dieser Prozess benötigt sowohl ein Membranpotential $\Delta\Psi$ als auch die Energie aus der Hydrolyse von ATP (Neupert and Brunner, 2002). Das Membranpotential wird benötigt, um die positiv geladene Signalsequenz durch den Kanal der TIM23-Translokase zu leiten. Noch während des Importprozesses wird die Signalsequenz durch Prozessierungsproteasen vom importierten Protein abgespalten (Hawlitsek et al., 1988; Schneider et al., 1990). Der Import wird vom Importmotor der TIM23-Translokase komplettiert (Neupert and Brunner, 2002). Die zentrale Komponente dieser molekularen Maschine ist mtHsp70 (Kang et al., 1990; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994).

1.5.2 Die Funktion von Ssc1 im Importmotor der TIM23-Translokase

Die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Komponenten des Importmotors der TIM23-Translokase waren mtHsp70, Tim44 und der Nukleotidaustauschfaktor Mge1. Allerdings war kein J-Protein bekannt, das Teil dieser molekularen Maschine ist.

Sobald die importierten Proteine den Kanal der TIM23-Translokase verlassen, werden sie von mtHsp70 gebunden. Dieser Schritt ist die ATP verbrauchende Reaktion beim Import von Matrixproteinen in Mitochondrien. Um sicherzustellen, dass sich mtHsp70 in der Nähe des Importkanals befindet, bindet das Cochaperon Tim44 an die Matrixseite der TIM23-Translokase (Berthold et al., 1995; Moro et al., 1999). Dieses periphere Membranprotein interagiert zum einen mit den membranintegrierten Proteinen Tim17 und Tim23, zum anderen rekrutiert es mtHsp70 (Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Zusätzlich kann Tim44 entfaltete Proteine binden (Blom et al., 1993; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Wie bei der Proteinfaltung dient auch beim Proteinimport Mge1 als Nukleotidaustauschfaktor für mtHsp70.

Zurzeit gibt es zwei Modelle über den genauen Mechanismus des Proteinimports. Ein Modell geht davon aus, dass mtHsp70 die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzt, um das importierte Protein aktiv in die Matrix zu ziehen (*pulling*-Modell) (Matouschek et al., 1997; Matouschek et al., 2000; Voisine et al., 1999). In einem anderen Modell verhindert die Bindung von mtHsp70 auf der Matrixseite, dass das importierte Protein aus dem TIM23-Kanal heraus ins Cytosol zurückgleitet. Durch spontane Entfaltung des importierten Proteins und Brownsche Molekularbewegung sowie wiederholte Bindung von mtHsp70 wird so ein

gerichteter Import des Proteins in die mitochondriale Matrix ermöglicht (*trapping*-Modell) (Gaume et al., 1998; Liu et al., 2003; Neupert and Brunner, 2002; Okamoto et al., 2002).

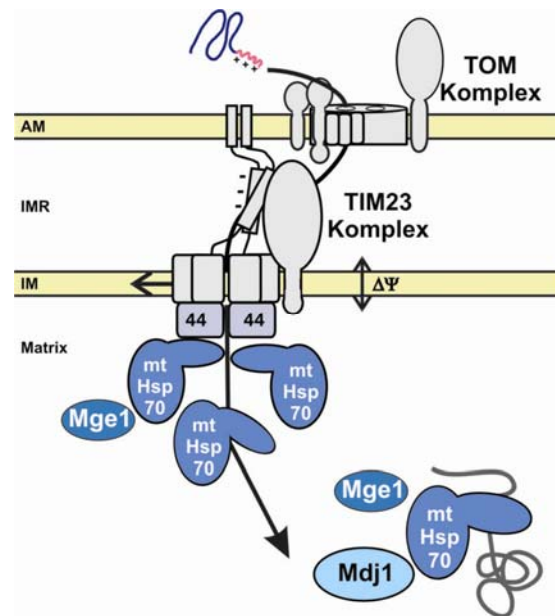


Abbildung 1.5: Der Importmotor der TIM23-Proteintranslokase. Tim44, mtHsp70 und Mge1 bilden den Importmotor der TIM23-Translokase. Tim44 rekrutiert mtHsp70 an den Importkanal, wo es an das importierte Protein bindet. In der Matrix werden die importierten Proteine dann gefaltet. AM: Außenmembran; IMR: Intermembranraum; IM: Innenmembran; 44: Tim44

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Interaktionspartner der mitochondrialen Hsp70-Proteine gefunden und charakterisiert werden. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen sollten neue Komponenten des Importmotors der TIM23-Translokase charakterisiert werden. Dieses Hsp70-System verfügt zwar über einen Nukleotidaustauschfaktor, jedoch war zu Beginn dieser Arbeit kein J-Protein bekannt, das Teil des Importmotors ist. Zum anderen sollten Interaktionspartner, die mit diesem Ansatz nicht identifiziert werden konnten, durch Koisolierung mit Ssc1 gefunden werden. Die mit dieser Methode gefundenen Proteine sollten funktionell charakterisiert werden. Dabei sollte der Einfluss dieser neuen Komponenten auf die von mtHsp70 katalysierten Reaktionen wie den Import von Proteinen über die TIM23-Translokase oder die Faltung von Proteinen in der mitochondrialen Matrix untersucht werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob diese Proteine ihre Funktionen durch Beeinflussung des ATPase-Zyklus von mtHsp70 oder über einen anderen Mechanismus ausführen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

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

a) Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNS (Miniprep)

Die Zellen aus 1,5 ml einer Übernachts-Flüssigkultur wurden in der Tischzentrifuge geerntet (800 Upm, 5 min) und anschließend in 200 µl Lösung I resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 400 µl Lösung II und vorsichtiges Mischen durch Invertieren. Durch Zugabe von 300 µl Lösung III wurden die Proteine und die genomische DNA gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min sedimentiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen an 96% Ethanol versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNS durch Zentrifugation ($20.000 \times g$, 5 min) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA getrocknet und dann in 50 µl Wasser aufgenommen.

Lösung I

50 mM Glukose

10 mM EDTA

10 mM Tris/HCl pH 7,9

Lösung II

1 M NaOH

20% (w/v) SDS

Lösung III

50 mM Kaliumacetat pH 4,8

11% (v/v) Eisessig

b) Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNS (Midiprep)

Für die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNS wurde das *Pure-Yield[®] Plasmid Midiprep* System der Firma Promega verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden Gene oder Genabschnitte aus *S. cerevisiae* amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide enthielten an der 5'-Seite eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und dahinter eine mindestens achtzehn Nukleotide lange Sequenz, die komplementär zur Matrizen-DNS ist.

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

39 μ l aqua dest.

5 μ l 10 \times *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer mit MgSO₄

1 μ l 10 \times dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

1 μ l 100 ng/ μ l Matrizen-DNS

1 μ l 20 pmol/ μ l Oligonukleotid 1 (entsprechend dem zu amplifizierenden Gen)

1 μ l 20 pmol/ μ l Oligonukleotid 2 (entsprechend dem zu amplifizierenden Gen)

0,5 μ l *Pfu*-DNA-Polymerase (5 U / ml)

0,5 μ l Taq- DNA-Polymerase (5 U / ml)

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

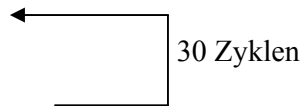
5 min bei 95°C

1 min bei 95°C

45 s Annealingtemperatur (s. 2.1.6b)

1min / 1kb erwartete Produktgröße bei 72°C

10 min 72°C



Zum Überprüfen von Klonierungen mittels PCR wurden einzelne *E. coli*-Kolonien in 10 μ l sterilem Wasser resuspendiert und 1 μ l dieser Suspension als Matrize verwendet.

2.1.3 Einführung von Punktmutationen mit dem **Quick-Change® Site directed mutagenesis Kit**

Zur Einführung von Punktmutationen in eine DNS-Sequenz wurde der *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Zunächst wurden zwei komplementäre Oligonukleotide mit der von nicht modifizierten Nukleotidsequenzen flankierten gewünschten Mutation synthetisiert. Anschließend wurde das Plasmid mit dem gewünschten Gen, in das die Punktmutation eingeführt werden sollte, amplifiziert. Dazu wurden 5 μ l 10-fach Reaktionspuffer, 20 ng doppelsträngige DNS-Matrize, 125 ng Oligonukleotid I, 125 ng Oligonukleotid II, 1 μ l dNTP-Mix und 1 μ l *PfuTurbo* DNS-Polymerase (2,5 U/ μ l) mit ddH₂O auf 50 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde der DNS-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 30 s denaturiert, bevor zwölf Zyklen, bestehend aus Denaturieren (30 s bei 95°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 55°C) sowie DNA-Synthese (1 min/kb Plasmidlänge bei 68°C) durchlaufen wurden. Danach wurde die methylierte, nicht mutierte Ausgangs-DNS-Matrize durch Zugabe von 1 μ l *DpnI* (10 U/ μ l) und Inkubation bei 37°C für 1 h verdaut. Die zirkuläre, doppelsträngige DNA wurde schließlich in *E. coli* XL1-Blue „Superkompetente Zellen“ (Stratagene) transformiert. Dazu wurden nach Auftauen eines

50 µl Aliquots auf Eis die Zellen mit 1 µl DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach für 45 s auf 42°C erhitzt und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 0,5 ml LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension 1 h bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen auf eine LB_{Amp}-Kulturplatte (LB mit 2% (w/v) Agar und 100 mg/l Ampicillin) ausgestrichen wurden. Die Kulturplatte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.4 Restriktionsverdau von DNS

Für die Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von *New England Biolabs* sowie die von Hersteller mitgelieferten 10×Reaktionspuffer verwendet.

Für einen analytischen Verdau wurden 2 µl des isolierten Plasmids, 1 µl Reaktionspuffer, 0,1 µl des Restriktionsenzym sowie 1 µl 10 mg/ml BSA vermischt, mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und für 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für einen präparativen Verdau wurden 5 bis 8 µl des Plasmids in einem 20 µl Reaktionsansatz verdaut. Die Probe wurde für 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation von Insert und geschnittenem Vektor wurden die T4-DNA-Ligase sowie der vom Hersteller gelieferte Ligase-Puffer verwendet. Es wurden 1,5 Units Ligase eingesetzt und das Verhältnis Insert:Vektor betrug etwa 3:1, wobei die eingesetzten Mengen anhand der Intensität der Banden im Agarosegel abgeschätzt wurden.

2.1.6 Agarosegelelektrophorese von DNS

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden je nach Größe der Fragmente Agarosegele mit einem Agarosegehalt zwischen 0,8% (w/v) und 2% (w/v) gegossen. Dazu wurde die Agarose in 1×TAE durch Aufkochen in Lösung gebracht. Nach kurzem Abkühlen wurde diese Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, in eine Agarose-Gelelektrophoresekammer gegossen und dort erstarren lassen.

Die DNA-Proben wurden zum Auftragen auf das Gel mit $\frac{1}{10}$ -Volumen 10×DNA-Probenpuffer vermischt. Die Elektrophorese fand für 1 h bei 80 bis 120 Volt statt.

10×TAE-Puffer

400 mM Tris/Base

200 mM Natriumacetat

10 mM EDTA pH 8,0

10×DNA Probenpuffer

0,5% (w/v) Bromphenolblau

0,1 M EDTA

50% (w/v) Glycerin

2.1.7 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNS-Bande wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *E.Z.N.A.*[®] *Gel Extraction Kits* der Firma Peqlab isoliert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in einem Milliliter XP2-Bindepuffer bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose bei 50°C geschüttelt. Die Lösung wurde dann auf die *HiBind*[®]-DNA-Säulen gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die an die Säule gebundene DNS mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution der DNS erfolgte mit 30 bis 50 µl Wasser.

2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS-Proben wurde durch Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm (E_{260} und E_{280}) bestimmt. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger bzw. 33 µg/µl einzelsträngiger DNS. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.9 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Um elektrokompetente *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_{600} von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 4500 g (4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen hintereinander mit 400 ml, 200 ml und 4 ml kaltem 10%igem Glycerol (mit Milli-Q-Wasser angesetzt) gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Probe in 400 µl 10%iger Glycerollösung resuspendiert, in Aliquots von 45 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.10 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde 1 µl Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45 µl kompetenter Zellen gemischt. Von diesem Ansatz wurden 40 µl in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann einem Stromstoß (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml LB-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 den für die Selektion nötigen Zusätzen ausgestrichen wurden.

2.1.11 Verwendete Plasmide

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit einer kurzen Beschreibung und einer Referenz angegeben. Die Klonierungsstrategien der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind in 2.1.12 beschrieben.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMalcRI Tim14	Zur Expression eines MBP-Tim14-Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pMalcRI-Mdj2	Zur Expression eines MBP-Mdj2-Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pQE60-Mge1 Δ 43	Zur Expression eines his-markierten Mge1 ohne Signalsequenz in <i>E. coli</i>	(Horst et al., 1997)
pQE30-Tim16 Δ 25	Zur Expression eines his-markierten Tim16 ohne die ersten 25 Aminosäuren in <i>E. coli</i>	(Mokranjac et al., 2005)
pGem4-Tim14	Zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation von Tim14	(Mokranjac et al., 2003b)
pVT102U-Tim14 (H141Q)	Zur Expression einer QPD-Mutante von Tim14 in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pGem4-Hep1	Zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation von Hep1	(Sichting et al., 2005)
pQE30-Hep1mat	Zur Expression von Hep1 mit Histidin-Anhang ohne Signalsequenz in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pRS315-Ssc1 _{PromPräs}	Hefeexpressionsvektor, der den Promotor und die Signalsequenz von <i>SSC1</i> enthält	diese Arbeit
pRS315-Ssc1 _{PromPräs} Ssc3	Zur Expression von Ssc3 unter der Kontrolle des <i>SSC1</i> -Promotors in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pGem4-pF ₁ β	Zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation von pF ₁ β	
pGem4-Jac1	Zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation von Jac1	(Lutz et al., 2001)
pGem4-AAC	Zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation von AAC (aus <i>Neurospora crassa</i>)	
pETDuet-Hsp70	Zur Expression von mtHsp70 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit

pETDuet-Hsp70 + Hep1	Zur Koexpression von mtHsp70 und Hep1 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pYX132-A1P3	Zur Expression einer Chimäre aus der ATPase- Domäne von Ssc1 und der PBD von Ssc3 in <i>S. cerevisiae</i>	(Baumann et al., 2000)
pYX132-A3P1	Zur Expression einer Chimäre aus der ATPase- Domäne von Ssc1 und der PBD von Ssc3 in <i>S. cerevisiae</i>	(Baumann et al., 2000)
pYX142-ATPase-his	Zur Expression der ATPase-Domäne von Ssc1 mit Histidin-Anhang in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pYX142-pSu9-PBD- his	Zur Expression der PBD von Ssc1 mit Histidin- Anhang in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS315- Ssc1 _{PromPräs} Dank	Zur Expression von DnaK in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS314- Ssc1 _{PromPräs} SscK _{ins}	Zur Expression der SscK _{ins} -Mutante in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS315- Ssc1 _{PromPräs} SscK _{ins}	Zur Expression der SscK _{ins} -Mutante in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pETDuet-SscK _{ins}	Zur Expression der SscK _{ins} -Mutante in <i>E. coli</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

2.1.12 Klonierungsstrategien

Im Folgenden werden die verwendeten Klonierungsstrategien der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide erläutert. Die Identität der Plasmide wurde durch Sequenzierung der DNS bestätigt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Medigenomix in Martinsried, Deutschland durchgeführt.

pMalcRI Tim14

Die kodierende Sequenz des *TIM14*-Gens wurde mit Hilfe einer PCR mit den Oligonukleotiden Bam-YLR008c und YLR008c-Pst aus genomischer DNS von *S. cerevisiae* amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *BamHI*- und *PstI*-Schnittstellen in den Vektor pMalcRI kloniert.

Bam-YLR008c: 5'- CCG GAT TCA TGA GTT CTC AAA GTA ATA CTG G -3'

YLR008c-Pst: 5'- CCC TGC AGT TAT TTG CTA ATA CCC CTT TTT TCC -3'

pMalcRI-Mdj2

Die kodierende Sequenz des *MDJ2*-Gens wurde mit Hilfe einer PCR mit den Oligonukleotiden Kpn-Mdj2 und Mdj2-Pst aus genomischer DNS von *S. cerevisiae* amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *KpnI*- und *PstI*-Schnittstellen zunächst in den Vektor pGem4 kloniert. Aus diesem wurde es dann mit den Restriktionsenzymen *BamI*- und *PstI* ausgeschnitten und in den Vektor pMalcRI kloniert.

Kpn-Mdj2: 5'- CCC GGT ACC ATG GTT TTG CCT ATA ATA ATT GG -3'

Mdj2-Pst : 5'- AAA CTG CAG TTA TCT CTT TCT TAG TAA AAC AC -3'

pVT102U-Tim14(H141Q)

Zunächst wurde eine gerichtete Mutagenese des *TIM14*-ORFs im pGEM4-Vektor wie unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt. Dafür wurden die Oligonukleotide YLR008-H141Q-for und YLR008-H141Q-rev verwendet. Das erhaltene mutierte *TIM14* wurde anschließend über die enthaltenen *BamHI*- und *PstI*-Schnittstellen in den Hefevektor pVT102U kloniert.

YLR008-H141Q-for : 5'- GGT TCA TAG GAA AAT TAT GCT AGC TAA TCA ACC
TGA CAA AGG TGG TTC TCC -3'

YLR008-H141Q-rev: 5'- GGA GAA CCA CCT TTG TCA GGT TGA TTA GCT AGC
ATA ATT TTCC TAT GAA CC -3'

pQE30-Hep1mat

Die kodierende Sequenz des reifen Hep1-Proteins (Aminosäuren 74 bis 205) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Bam-YNLmat und YNL310c-Hind aus dem Plasmid pGem4-Hep1 amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert.

Bam-YNLmat : 5'- ATA TGG ATC CAA TAT CAT CGC ACA TAA TGA AGT G -3'

YNL310c-Hind: 5'- GGA AGC TTC ATT TCT GGG AAG GGTGAG GG -3'

pRS315-Ssc1_{PromPräs}

Es wurde ein DNS-Fragment amplifiziert, das den Promotor und die für die Signalsequenz kodierende Region des *SSC1*-Gens enthält (Nukleotide -500 bis 69). Für diesen Zweck wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'-SacI-Ssc1Prom und 3'-BamHI-Ssc1Präs und

genomischer DNS von *S. cerevisiae* als Matrize durchgeführt. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *SacI*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor pRS315 kloniert.

5'-SacI-Ssc1Prom : 5'- ATA TGA GCT CAC AGG CAC GCG CAA AAC C-3'

3'-BamHI-Ssc1Präs: 5'- ATA TGG ATC CCA AAC GTG TGG CAA TAC G-3'

pRS315-Ssc1_{PromPräs}Ssc3

Die kodierende Sequenz des reifen Ssc3-Proteins (Aminosäuren 21 bis 641) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-Bam-Ecm10mat und 3'-XhoI-Ecm10 aus genomischer DNS von *S. cerevisiae* amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *BamHI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pRS315-Ssc1_{PromPräs} kloniert.

5'-Bam-Ecm10mat: 5'-ATA TGG ATC CCA GTC AAC CAA AAT TCC AGA TG-3'

3'-XhoI-Ecm10 : 5'- ATA TCT CGA GTT ATT TAT TTT CTC TCC CGT TC-3'

pETDuet-Hsp70

Die kodierende Sequenz des reifen mtHsp70-Proteins (Aminosäuren 24 bis 654) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-NdeI-Ssc1mat und 3'-XhoI-Ssc1 aus genomischer DNS von *S. cerevisiae* amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pETDuet kloniert.

5'-NdeI-Ssc1mat: 5'- GGA ATT GCA TAT GCA GTC AAC CAA GGT TCA AAG -3'

3'-XhoI-Ssc1 : 5'- ATA TCT CGA GCT GCT TAG TTT CAC CAG ATT C -3'

pETDuet-Hsp70 + Hep1

Die kodierende Sequenz des reifen Hep1-Proteins (Aminosäuren 74 bis 205) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Bam-YNLmat und YNL310c-Hind aus dem Plasmid pGem4-Hep1 amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den Vektor pETDuet-Hsp70 kloniert.

pYX142-ATPase-his

Die kodierende Sequenz der ATPase-Domäne von mtHsp70 (Aminosäuren 24 bis 409) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-EcoRI-Ssc1 und 3'-XhoI-Ssc1ATPasehis aus dem Plasmid pETDuet-Hsp70 amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pYX142 kloniert.

5'-EcoRI-Ssc1 : 5'- ATA TGA ATT CAT GCT TGC TGC TAA AAA C -3'

3'-XhoI-Ssc1ATPasehis: 5'- ATA TCT CGA GTT AAT GGT GAT GGT GAT GGT GAA
CCT CAC CGG ACA AGA CAG -3'

pYX142-pSu9-PBD-his

Die kodierende Sequenz der PBD von mtHsp70 (Aminosäuren 410 bis 654) einschließlich einer für die Präsequenz der Untereinheit 9 der F₁F₀-ATPase von *N. crassa* codierenden Sequenz am 5'-Ende wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-EcoRI-Su9-PBD und 3'-XhoI-Ssc1his aus dem Plasmid pYX132-PBD (Moro et al., 2002) amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pYX142 kloniert.

5'-EcoRI-Su9-PBD: 5'- ATA TGA ATT CAT GGC CTC CAC TCG TGT C -3'

3'-XhoI-Ssc1his : 5'- GGG CTC GAG TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CTG CTT
AGT TTC ACC AGA TTC -3'

pRS315- Ssc1_{PromPräs}DnaK

Die kodierende Sequenz des DnaK-Proteins von *E. coli* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-BamHI-DnaK und 3'-XhoI-DnaKhis aus *E. coli*-Zellen amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *BamHI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pRS315-Ssc1_{PromPräs} kloniert.

5'-BamHI-DnaK : 5'- ATA TGG ATC CGG TAA AAT AAT TGG TAT CGA C-3'

3'-XhoI-DnaKhis: 5'- ATA TCT CGA GTT AAT GGT GAT GGT GAT GGT GTT TTT
TGT CTT TGA CTT CTT C-3'

pRS314- Ssc1_{PromPräs}SscK_{ins} und pRS315- Ssc1_{PromPräs}SscK_{ins}

Zur Herstellung der SscK_{ins}-Mutante wurde die kodierende Sequenz von mtHsp70 in zwei PCR-Reaktionen mit pETDuet-Hsp70 als Matrize amplifiziert. Zum einen wurde der N-terminale Bereich (Aminosäuren 24 bis 236) mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-SacI-Ssc1Prom und 3'-NheI-Kins amplifiziert, zum anderen der C-terminale Bereich (Aminosäuren 244 bis 654) mit den Oligonukleotiden 5'-NheI-Kins und 3'-XhoI-Ssc1his. Der Einschub von DnaK (Aminosäuren 210 bis 220) wurde in diesen Reaktionen durch die Überhänge in den Oligonukleotiden 5'-NheI-Kins und 3'-NheI-Kins eingeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden mit SacI und NheI bzw. mit NheI und XhoI verdaut und in einer Dreifach-Ligation in den SacI und XhoI geschnittenen Vektor pRS314 eingebaut.

Anschließend wurde das gesamte Insert über *SacI* und *XhoI* aus dem Vektor pRS314-*SscI*_{PromPräs}*SscK*_{ins} ausgeschnitten und in den Vektor pRS315 umklont.

5'-NheI-Kins : 5'- ATA TCG CTA GCA ACT AAC GGT GAC ACT CAT TTG -3'

3'-NheI-Kins : 5'- ATA TCG CTA GCA CTT CGA AGG TTT TTT CGC CGT CAA CTT
CGT CAA TAT CTA AGA TGG AG -3'

pETDuet-SscK_{ins}

Die kodierende Sequenz der *SscK*_{ins}-Mutante wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-*NdeI*-*SscI*_{mat} und 3'-*XhoI*-*SscI*_{his} aus dem Vektor pRS315-*SscI*_{PromPräs}*SscK*_{ins} amplifiziert. Das erhaltene DNS-Fragment wurde über die in den Oligonukleotiden enthaltenen *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pETDuet kloniert.

2.2 Genetische Methoden in *S. cerevisiae*

2.2.1 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme mit einer kurzen Beschreibung und einer Referenz angegeben.

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>TIM14/tim14::HIS3</i>	Diploider Stamm, in dem eine Kopie des <i>TIM14</i> -Gens gegen die <i>HIS3</i> -Kassette ausgetauscht ist	(Mokranjac et al., 2003b)
Hsp70-his	<i>ssc1</i> -Deletionsstamm, der eine Variante von <i>Ssc1</i> mit C-terminalen Histidin-Anhang auf einem <i>URA3</i> -Plasmid exprimiert	(Bolliger et al., 1994)
YPH499	Wildtyphefestamm für Lokalisierung und Quervernetzungsexperimente	(Sikorski and Hieter, 1989)
YPH499 Hep1-his ₇	Hefestamm, in dem an das <i>HEP1</i> -Gen auf dem Chromosom mit ein Histidin-Anhang angefügt wurde	diese Arbeit
FY1679-11a	Wildtypstamm, isogen zum <i>hep1</i> -Deletionsstamm	Euroscarf (10000R)

FY1679-11a $\Delta hep1$	<i>hep1</i> -Deletionsstamm	Euroscarf (10179B)
<i>ssc1-2</i>	temperatur-sensitiver Stamm, Punktmutation in der PBD von mtHsp70	(Gambill et al., 1993)
<i>ssc1-3</i>	temperatur-sensitiver Stamm, Punktmutation in der ATPase-Domäne von mtHsp70	(Gambill et al., 1993)
$\Delta ssq1$	<i>ssq1</i> -Deletionsstamm	

Tabelle 2.2: Verwendete Hefestämme

2.2.2 Anzucht von *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden normalerweise auf YPD oder Laktatmedium (siehe 2.6.1) bei 30°C und temperatursensitive Mutanten bei 24°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 130 Upm in Erlenmeyerkolben in Schüttlern inkubiert. Zum Animpfen wurde entweder eine Hefekolonie von einer Agarplatte oder Zellen direkt aus einem Glycerol-Stock (15% (v/v)), welcher bei -80°C gelagert wurde, verwendet. Zur Selektion von Hefestämmen mit bestimmten Markergenen wurde SD-Medium benutzt, das entsprechend den gewünschten Selektionsbedingungen mit Markersubstanzen versetzt war. Atmungsdefiziente Hefestämmen, die nicht auf Laktatmedium wuchsen, wurden in YPD kultiviert. Für die Präparation von Mitochondrien wurden die entsprechenden Hefestämmen ca. drei Tage in steigenden Volumina kultiviert, wobei darauf geachtet wurde, dass die OD₆₀₀ 1,2 nicht überschritt.

2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNS

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert und die Kultur am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,1 verdünnt (50 ml Kulturvolumen). Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und in einem sterilen 50 ml-Zentrifugationsröhrchen 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. Die Zellen wurden bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden nicht eingefroren, sondern sofort transformiert.

DNS (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelagert. Ein 50 µl-Aliquot kompetenter Zellen wurde 5 min bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Folgende Lösungen wurden in der

angegebenen Reihenfolge auf das Zellsediment gegeben: 240 μ l PEG 3350 (50% (v/v)), 36 μ l 1 M Lithiumacetat, 25 μ l einzelsträngige Lachsspermien-DNS (2 mg/ml), 50 μ l steriles Wasser, in dem 0,1-10 μ g der zu transformierenden DNS gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C (bei temperatur-sensitiven Mutanten bei 24°C) inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation bei 42°C für 20 min. Dann wurden die Hefezellen 15 s bei 6000 bis 8000 Upm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte mit Hilfe von Auxotrophiemarkern auf den entsprechenden SD-Platten.

2.2.4 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* („Tüpfeltest“)

Hefestämme wurden in Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 passagiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (von 1:10 bis 1:1000) hergestellt. Pro Verdünnung wurden 2 μ l auf die gewünschten Agarplatten aufgetragen. Diese wurden bei der zu untersuchenden Temperatur 2 bis 7 Tage inkubiert.

2.2.5 Austausch von Plasmiden in *S. cerevisiae* („*plasmid shuffling*“)

Zum Austauschen von Plasmiden mit einem *URA3*-Marker gegen Plasmide mit einem anderen Selektionsmarker, wurde ein Hefestamm, der das auszutauschende *URA3*-Plasmid trägt, mit einem zweiten Plasmid transformiert. Nach erfolgreicher Selektion, wurden die Transformanten für zwei Tage auf YPD-Platten inkubiert. Anschließend wurden sie auf Platten, die 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) enthielten, ausgestrichen und für drei Tage inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden abermals auf 5-FOA-Platten ausgestrichen und inkubiert. Die nach dieser Selektion erhaltenen Kolonien wurden auf Wachstum auf SD-ura und SD-xy (entsprechend des Selektionsmarkers des eingetauschten Plasmids) getestet.

2.2.6 Sporulation diploider *S. cerevisiae*-Stämme und Tetraden-dissektion

Diploide Hefestämme wurden sporuliert, indem sie zunächst auf einer YPD-Platte angezogen wurden. Dann wurden sie auf eine nährstoffarme Sporulationsplatte (1 % (w/v) Kaliumacetat) überimpft und auf dieser Platte für 3–6 Tage bei 30°C inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop charakteristische Vierergruppen von Sporen, so genannte Tetraden, sichtbar waren.

Um die vier Sporen einer Tetrade zu trennen, wurden zunächst einige Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze von den Sporulationsplatten abgekratzt und in 200 μ l sterilem Wasser suspendiert. Anschließend wurden 5 μ l Zymolyase (10 mg/ml) zugegeben und für 3-5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. 50 µl der Suspension wurden auf den Rand einer YPD-Platte aufgebracht. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die vier Sporen einer Tetrade getrennt und in einer Reihe an definierten Positionen auf der Platte abgelegt. Die Platte wurde für 3 Tage bei 30°C inkubiert und die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, auf ihren Phänotyp untersucht.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

Alle Reinigungen von Proteinen erfolgten bei 4°C. Die Flußgeschwindigkeit der Säulen betrug etwa 2 ml/min.

2.3.1 Synthese von ³⁵S-markierten Proteinen *in vitro*

Um ³⁵S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM4 klonierte Gene mit Hilfe der SP6-RNS-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert.

Zur Transkription wurden 30 µl Premix, 2,5 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G und 15 µl Plasmid-DNS gemischt, auf 200 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl SP6-RNS-Polymerase (je 25 U/µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNS wurde anschließend durch Zusatz von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol für 15 min bei -20°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000×g (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes bei RT getrocknet. Die mRNS wurde dann in 30 µl Wasser mit 0,75 U/µl RNasin aufgenommen.

Um *in vitro* Vorstufenproteine zu translatieren, wurden 140 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 µl RNasin, 8 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 16 µl ³⁵S-Methionin und 30 µl RNS gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100.000×g (2°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

10×Translationssalze:

400 mM Hepes/KOH; pH 7,4
60 mM Mg-Acetat
20 mM Spermidin

Premix:

1 ml 10×Translationssalze
20 µl 50 mg/ml BSA
200 µl 0,5 M DTT
Je 50 µl 100 mM ATP, CTP, GTP und UTP
H₂O ad 10 ml

2.3.2 Reinigung rekombinanter Proteine mit MBP-Anhang aus *E. coli*

Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteine wurden aus XL1-Blue-*E. coli*-Zellen gereinigt. Dazu wurden 500 ml LB_{amp}-Medium mit 10 ml einer Übernacht-Kultur eines Stammes beimpft, der mit dem gewünschten pMalCRI-Vektor transformiert worden war. Diese Kultur wurde 2 h bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 3 h induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (4400xg, 10 min, RT) und in 20 ml MBP-Bindepuffer resuspendiert. Um die Zellwand zu zerstören wurde 1 mg/ml Lysozym zugesetzt und die Lösung 45 min bei 4°C inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung im Eisbad wurden die Zellen komplett aufgeschlossen (zehnmal 12s, Branson Sonifier, setting 4, 80% duty cycle). Danach wurden die Zellbruchstücke abzentrifugiert (27200xg, 15 min, 4°C) und der klare Überstand auf eine 4 ml Amylose-Resin-Säule, die zuvor mit Wasser gewaschen und mit Bindepuffer äquilibriert worden war, geladen. Die Säule wurde mit 40 ml Bindepuffer gewaschen und das gebundene Protein mit MBP-Elutionspuffer eluiert.

Die gereinigten Proteine wurden über eine PD10-Gelfiltrationssäule nach Angaben des Herstellers in Hsp70-Lagerungspuffer umpuffert und bei -80°C gelagert.

MBP-Bindepuffer

20 mM HEPES NaOH pH 7,4
200 mM NaCl
10 mM β-Mercaptoethanol
1 mM PMSF

MBP-Elutionspuffer

20 mM HEPES NaOH pH 7,4
200 mM NaCl
10 mM β-Mercaptoethanol
1 mM PMSF
10 mM Maltose

Hsp70-Lagerungspuffer

20 mM HEPES KOH pH 7,4
100 mM KCl
5 mM MgCl₂
5% Glycerol

2.3.3 Reinigung rekombinanter Proteine mit Histidin-Anhang aus *E. coli*

Die Proteine His-Mge1Δ43 und His-Hep1_{mat} wurden aus XL1-Blue-*E. coli*-Zellen gereinigt. Dazu wurden 500 ml LB_{amp}-Medium mit 10 ml einer Über-Nacht-Kultur eines Stammes beimpft, der mit dem gewünschten pQE-Vektor transformiert worden war. Diese Kultur wurde 2 h bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 3 h induziert. Anschließend

wurden die Zellen geerntet (4400xg, 10 min, RT) und in 20 ml Puffer A resuspendiert. Um die Zellwand zu zerstören, wurde 1 mg/ml Lysozym zugesetzt und die Lösung 45 min bei 4°C inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung im Eisbad wurden die Zellen komplett aufgeschlossen (10 x 12s, Branson Sonifier, setting 4, 80% duty cycle). Danach wurden die Zellbruchstücke abzentrifugiert (27200xg, 15 min, 4°C) und der klare Überstand auf eine 0,5 ml Ni-NTA-Säule, die zuvor mit Wasser gewaschen und mit Puffer A äquilibriert worden war, geladen. Die Säule wurde mit 10 ml Puffer A gewaschen und das gebundene Protein durch Puffer A mit 300 mM Imidazol eluiert.

Die gereinigten Proteine wurden über eine PD10-Gelfiltrationssäule in Hsp70-Lagerungspuffer umgepuffert.

Puffer A

20 mM HEPES KOH pH 7,4

250 mM KCl

20 mM Imidazol

2 mM β -Mercaptoethanol

10% Glycerol

1 mM PMSF

2.3.4 Herstellung einer Mge1-Affinitätssäule

Zur Herstellung einer Mge1-Affinitätssäule wurden His-Mge1 Δ 43 exprimierende Zellen wie in 2.3.3 beschrieben induziert, geerntet und aufgeschlossen. Nach Bindung von His-Mge1 an die Ni-NTA-Säule und Waschen mit 10 ml Puffer A wurde jedoch nicht eluiert, sondern mit 10 ml Puffer D gewaschen. Anschließend wurde mit 10 ml Puffer E gewaschen und die Säule dann mit Puffer A reäquilibriert.

Puffer D

20 mM HEPES KOH pH 7,4

250 mM KCl

2 mM β -Mercaptoethanol

10% Glycerol

1 mM PMSF

Puffer E

20 mM HEPES KOH pH 7,4

250 mM KCl

2 mM β -Mercaptoethanol

10% Glycerol

1 mM PMSF

10 mM MgCl₂

5 mM ATP

2.3.5 Reinigung von mtHsp70 aus *E. coli*

Um mtHsp70 aus *E. coli* zu reinigen wurden BL21(DE3)-Zellen mit dem Vektor pETDuet-mtHsp70 + Hep1 transformiert. Einzelne Transformaten wurden in 3 ml LB_{amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei Liter LB_{amp}-Medium mit 60 ml der Vorkulturen angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 3 h induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (4400xg, 10 min, RT) und in 20 ml Puffer A resuspendiert. Um die Zellwand zu zerstören wurde 1 mg/ml Lysozym zugesetzt und die Lösung 45 min bei 4°C inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung im Eisbad wurden die Zellen komplett aufgeschlossen (10 x 12s, Branson Sonifier, setting 4, 80% duty cycle). Nach Abtrennen der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (27200xg, 15 min, 4°C) wurde das Lysat auf eine Mge1-Affinitätssäule geladen. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer D gewaschen und anschließend wurde mit Puffer E eluiert.

Das gereinigte Protein wurde über eine PD10-Gelfiltrationssäule in Hsp70-Lagerungspuffer umgepuffert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3.6 Reinigung von mtHsp70 aus *S. cerevisiae*

Die Reinigung von mtHsp70 erfolgte aus Zellen des Hsp70-his-Stammes. Dazu wurden isolierte Mitochondrien dieses Stammes zunächst in Importpuffer (siehe 2.4.4) mit entweder 20 µM Oligomycin und 2 U/ml Apyrase (um die ATP-Menge in den Mitochondrien zu verringern) oder mit 2 mM ATP, 2 mM NADH, 0,1 mg/ml Kreatinkinase und 10 mM Keratinphosphat (um die ATP-Menge in den Mitochondrien zu erhöhen) für 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert und bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Puffer B mit 1% Triton X-100 30 min bei 4°C solubilisiert. Nach Abtrennen der nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation bei 100.000×g, 4°C wurde das Lysat über eine Ni-NTA-Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit zehn Säulenvolumina Puffer B wurden die gebundenen Proteine durch Puffer B mit 300 mM Imidazol eluiert.

Puffer B

20 mM HEPES KOH pH 7,4

250 mM KCl

30 mM Imidazol

2 mM β-Mercaptoethanol

10% Glycerol; 1 mM PMSF

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ((Laemmli, 1970)). Dazu wurden Glasplatten von 160×180 mm und Abstandshalter von 1 mm Dicke verwendet. Zum Gießen wurde das Gel mit einer 2%igen Agarlösung in Laufpuffer abgedichtet. Die Konzentration von Acrylamid variierte zwischen 8 und 16% im Trenngel und betrug 4% im Sammelgel. Die Konzentration an Bisacrylamid betrug 0,8%. Wenn Gradientengele verwendet wurde, wurde mit einem Gradientenmischer ein Trenngel mit einem Konzentrationsgradienten an Acrylamid von 14% bis 6% gegossen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA für 2 h (Standardgele) oder 3 h (Gradientengele). Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Trenngel

8-16% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid
375 mM Tris HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS
0,05% (w/v) APS
0,05% (w/v) TEMED

2x SDS Probenpuffer

20% (v/v) Glycerin
10% (v/v) β -Mercaptoethanol
6% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Bromphenolblau
125 mM Tris/HCl pH 6,8

Sammelgel

4% (w/v) Acrylamid
0,1% (w/v) Bisacrylamid
60 mM Tris HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS
0,05% (w/v) APS
0,05% (w/v) TEMED

Laufpuffer (PAGE)

0,38 M Glycin
50 mM Tris/HCl pH 8,3
0,1%(w/v) SDS

2.3.8 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Zum Färben von Acrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Gele nach der Elektrophorese 30 min in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und solange in Entfärbelösung bis zur ausreichenden Entfärbung geschwenkt.

Coomassie-Blau-Färbung (R250)

0,5% (w/v) Coomassie-Blau
10% (v/v) Essigsäure
40 % (v/v) Methanol

Coomassie-Entfärber

10% (v/v) Essigsäure
35% (v/v) Methanol

2.3.9 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurde gemäß Blum durchgeführt (Blum et al., 1987). Das Gel wurde zunächst 30-60 min in einer Fixierlösung aus 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure und 50 µl 37% Formaldehyd pro 100 ml inkubiert. Danach wurde es zweimal 10 min in 50% (v/v) Ethanol, einmal 1 min in 0,02% (w/v) Na₂S₂O₃·5H₂O und dreimal 20 s in Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel 15 min in 0,2% (w/v) AgNO₃ mit 75 µl 37% Formaldehyd pro 100 ml und zweimal 20 s in Wasser inkubiert. Schließlich wurde es mit einer 6% (w/v) Na₂CO₃-Lösung, der 2 ml 0,02% (w/v) Na₂S₂O₃·5H₂O und 50 µl 37% Formaldehyd pro 100 ml zugesetzt worden waren, je nach gewünschter Intensität der Färbung 1-15 min entwickelt. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen in Wasser und schließlich durch Zugabe einer wässrigen Lösung von 50 mM EDTA, pH 8,0 gestoppt.

2.3.10 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Halbtrocken-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Khyse-Anderson, 1984). Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je zwei Whatman-Papieren in eine Blotkammer geklemmt wurden. Gel, Nitrozellulosemembran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte für eine Stunde zwischen zwei 15×15 cm große Graphitelektroden bei 250 mA. Die Proteine wurden durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau-Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser sichtbar gemacht.

Blotpuffer

20 mM Tris

150 mM Glycin

20% Methanol

0,08% SDS

Ponceau-Lösung

0,2% Ponceau S

3% Trichloressigsäure

2.3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers. Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit Immunglobulin G-Proteinen (IgG) erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei IgG-Konzentrationen von 3; 6; 12; und 24 µg/ml gemessen.

2.3.12 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Um Proteine aus einer Lösung zu fällen, wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 12% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 30 min bei 35000×g (4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpräzipitat wurde mit 1 ml Aceton (auf -20°C gekühlt) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min wurde das Aceton verworfen und das Sediment für 5 min bei 37°C getrocknet. Die Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und kurzes Aufkochen gelöst.

2.3.13 Bestimmung des Aggregationszustandes von mtHsp70 *in vitro*

Um den Aggregationszustand gereinigter Hsp70-Proteine zu bestimmen, wurden diese zunächst in 50 mM HEPES/KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ in Anwesenheit verschiedener Effektoren (1 mM Nukleotid oder äquimolare Mengen eines anderen Proteins) für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach weiteren 30 min bei 30°C wurde die Quervernetzungsreaktion durch Zugabe von 200 mM Glycin in Laemmli-Puffer gestoppt. Die Quervernetzungsprodukte wurden auf einem 6-14%-SDS-Gradientengel aufgetrennt und mittels Silberfärbung analysiert.

2.3.14 Messung der ATPase-Aktivität von mtHsp70 (ATPase-Assay)

Die Messung der ATPase-Aktivität von mtHsp70 erfolgte nach Horst *et al* (Horst *et al.*, 1997) mit folgenden Modifikationen: Die Messungen wurden bei 25°C in 50 mM HEPES/KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 66 µM ATP und 0,1 mM γ -³²P-ATP durchgeführt. Pro Reaktion von 20 µl Volumen wurden 7,4 µg mtHsp70 verwendet. Die Mengen der verwendeten Cochaperone waren 2 µg Mge1, 4,9 µg MBP-Tim14, 4,8 µg MBP-Mdj2 und 2,5 µg Hep1. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 50 mM EDTA, 5 mM ATP und 5 mM ADP gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf PEI-Cellulose F Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen und es wurde eine Dünnschichtchromatographie in 1 M Ameisensäure, 0,5 M LiCl durchgeführt. Nach Trocknen der Platten wurden Phosphorimager-Platten aufgelegt und die Signale von ATP und freiem Phosphat mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji Bas3000, *Aida Image Analyzer* 3.4.3 Auswertungssoftware) quantifiziert. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wurde als Prozentsatz an hydrolysiertem ATP zum gegebenen Zeitpunkt angegeben.

2.3.15 Messung der Nukleotidaustauschrates von mtHsp70 (Nukleotid-Austauschfaktor-Assay)

Die Nukleotidaustauschrates von mtHsp70 wurde nach Miao *et al.* (Miao *et al.*, 1997) an mtHsp70- α - 32 P-ATP-Komplexen gemessen. Dazu wurden zunächst 50 μ g mtHsp70 mit 10 μ Ci α - 32 P-ATP in 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 25 μ M ATP für 10 min bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Nukleotide wurden durch Gelfiltration über ein NICK-Säule (Amersham Biosciences) abgetrennt. Für die einzelnen Reaktionen wurden 4 μ g des mtHsp70- α - 32 P-ATP-Komplexes in Gegenwart von 250 μ M ATP und gegebenenfalls in Gegenwart von 4 μ M Mge1 bzw. 4 μ M Hep1 bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und wie in 2.3.14 analysiert.

2.3.16 Kopplung rekombinanter Proteine an CNBr-aktivierte Sepharose

Zur Herstellung von Antigen-Affinitätssäulen zur Reinigung von Antikörpern wurden fünf mg des entsprechenden Antigens zunächst über eine PD10-Säule (Amersham Biosciences) in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3, 0,5 M NaCl umgepuffert.

0,4 g einer CNBr-Sepharose-Matrix wurden für 45 min bei RT in 1 mM HCl schwellen gelassen. Das entstandene Gel wurde anschließend mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen und in eine BioRad[®]-Minisäule überführt. Die umgepufferte Antigenlösung wurde ebenfalls in diese Säule gegeben. Nach Inkubation für 1 h bei RT im Überkopfschüttler wurde die Lösung abgelassen und die Säule anschließend mit 6 ml 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3, 0,5 M NaCl gewaschen. Um noch verbleibende aktive Gruppen der CNBr-Matrix zu blockieren wurden 6 ml 0,2 M Ethanolamin auf die Säule gegeben. Nach Ablassen von 2 ml wurde die Säule verschlossen und weitere 2 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Säule drei Mal einem Zyklus von Waschschrritten unterzogen. Jeder Zyklus bestand aus folgenden Schritten: Zunächst wurden 6 ml 0,1 M Natriumacetat pH 4,5, 0,5 M NaCl durch die Säule laufen gelassen, danach 6 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl. Nach Beendigung der Waschschrritte wurde die Säule in 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Fraktionierung von Hefezellen

Die Fraktionierung von Hefezellen erfolgte nach Meisinger *et al.* (Meisinger et al., 2000). Zunächst wurden Hefezellen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 wachsen gelassen. Die Zellen aus dieser Kultur wurden wie in 2.4.2 beschrieben aufgeschlossen und die Mitochondrien isoliert. Der Überstand nach Sedimentation der Mitochondrien wurde für 1 h bei 100.000×g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment dieser Zentrifugation enthält Mikrosomen, der Überstand die cytosolische Fraktion. Beide Fraktionen wurden in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Das Mitochondriensediment wurde auf einen Saccharose-Stufengradienten mit den Stufen 15%, 23%, 32% und 60% (w/v) Saccharose in 10 mM MOPS/KOH pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF geladen. Nach einstündiger Zentrifugation bei 134.000×g und 4°C wurde die Bande zwischen der 32% und der 60% Saccharose-Stufe gesammelt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden mit zwei Volumina SH-Puffer verdünnt und sedimentiert (Zentrifugation für 10 min bei 17.400×g, 4°C). Schließlich wurden die Mitochondrien auf 10 mg/ml eingestellt, in Aliquots zu 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

SH-Puffer

0,6 M Sorbitol

20 mM HEPES pH 7,4

2.4.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Mitochondrien wurden Hefezellen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3300 Upm, JLA 8.1000-Rotor) geerntet und mit Wasser gewaschen. Nun wurden die Zellen in 2 ml Puffer 1 pro g Feuchtwicht (FG) resuspendiert und 10 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Die Zellen wurden in 6,6 ml Puffer 2 pro g FG resuspendiert und 30 bis 60 min bei 30°C geschüttelt. Nach 30 min. wurde zum ersten Mal die Sphäroblastierung überprüft. Dazu wurden je 25 µl Suspension in 1 ml 1,2 M Sorbitol bzw. Wasser gegeben und OD₆₀₀ gemessen. Die Sphäroblastierung war ausreichend, wenn die OD₆₀₀ der wässrigen Lösung etwa 10 -20% der Lösung in Sorbitol hatte. Nun wurden die Sphäroblasten geerntet (5 min Zentrifugation bei 2500 Upm, 2°C, JA10-Rotor). Das Sediment wurde sorgfältig in 6,6 ml Homogenisierungspuffer pro g FG resuspendiert und die Suspension zehnmal gedouct. Danach wurde der Douncer mit 6,6 ml

Homogenisierungspuffer pro g FG ausgewaschen. Unaufgeschlossene Zellen wurden durch zwei Zentrifugationsschritte für 5 min bei 3300 Upm, 2°C, JA10-Rotor entfernt. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde dann für 12 min bei 10.000 Upm, 2°C im JA10-Rotor zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in 30 ml SH-Puffer resuspendiert und 5 min bei 4000 Upm, 2°C im JA20-Rotor zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 12 min bei 12.000 Upm, 2°C im JA20-Rotor zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in wenig SH-Puffer aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Schließlich wurden die Mitochondrien auf 10 mg/ml eingestellt, in Aliquots zu 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1:

100 mM Tris
10 mM DTT (frisch zugeben)
pH nicht eingestellt

Puffer2:

1,2 M Sorbitol
20 mM KH₂PO₄ pH 7,4
6 mg Zymolyase/g Zellen(FG) (frisch zugegeben)

Homogenisierungspuffer:

0,6 M Sorbitol
10 mM Tris pH 7,4
1 mM EDTA
1 mM PMSF
0,2% BSA (ohne Fettsäuren)

2.4.3 Subfraktionierung von Mitochondrien

Zur Erzeugung von Mitoplasten wurde die äußere mitochondriale Membran durch hypotonisches Schwellen geöffnet. Hierzu wurden Mitochondrien 1:10 in eiskaltem 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurden Mitochondrien 1:10 in eiskaltem 20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol verdünnt.

Um zugängliche Proteine zu verdauen, wurde Proteinase K zu 50 µg/ml zugesetzt und auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde nach 30 min mit PMSF gestoppt.

Um lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Proteinen zu trennen, wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt. Mitochondrien wurden sedimentiert und in einer 0,1 M Na₂CO₃-Lösung zu einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die integralen Membranproteine durch eine Zentrifugation (220000×g; 2°C; 30 min) sedimentiert und in SDS-Auftragspuffer gelöst. Die mit Carbonat extrahierbaren Proteine befanden sich im Überstand. Dieser wurde mit Trichloressigsäure gefällt und das Präzipitat ebenfalls in SDS-Auftragspuffer gelöst.

Um lösliche von peripher mit der Membran assoziierten Proteinen zu trennen, wurde eine Salzextraktion durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien in 20 mM Hepes pH 7,4 mit ansteigenden Konzentrationen an NaCl resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die membranassoziierten Proteine von den löslichen Proteinen mittels Zentrifugation getrennt.

2.4.4 *In-vitro*-Proteinimport in isolierte Mitochondrien

Die zu importierenden Proteine wurden wie in 2.3.1 beschrieben synthetisiert. Für die Importreaktion wurden 400 µg Mitochondrien in SI-Puffer mit 2 mM NADH, 2 mM ATP, 0,1 mg/ml Kreatinkinase und 10 mM Keratinphosphat für 3 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden zwei bis vier Volumenprozent an ³⁵S-markiertem Vorläuferprotein zugegeben und weiter bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots entnommen und die Reaktion durch 1:10-Verdünnung in eiskaltem SH-Puffer gestoppt. Ein Aliquot wurde dann für 15 min auf Eis mit 0,1 mg/ml Proteinase K behandelt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und mit SH-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Phosphorimager (Fuji Bas3000, *Aida Image Analyzer 3.4.3* Auswertungssoftware).

2xSI Puffer (1 mg/ml BSA):

1,2M Sorbitol

150 mM KCl

20 mM Mg-acetat

4 mM KH₂PO₄

5 mM EDTA

5 mM MnCl₂

1 mg/ml BSA (Fettsäure-frei)

100 mM HEPES KOH pH 7,4

2.4.5 Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Zum Quervernetzen mitochondrialer Proteine wurden Mitochondrien in SI-Puffer ohne BSA resuspendiert. Die ATP-Level in den Mitochondrien wurden wie in 2.3.6 beschrieben manipuliert. Das Quervernetzungsreagenz DSG wurde aus einer 100-fach konzentrierten Lösung in DMSO zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 mM Glycin pH 8,0 gestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

2.4.6 Bestimmung des Aggregationszustands mitochondrialer Proteine

Um den Aggregationszustand von Proteinen in Mitochondrien zu bestimmen, wurden isolierte Mitochondrien in Proteolysepuffer (siehe 2.4.7) für 30 min bei 4°C solubilisiert. Anschließend wurden die Proben in zwei Teile geteilt. Mit einem Teil wurde eine TCA-Fällung durchgeführt, der andere Teil wurde für 10 min bei 22.000×g, 4°C zentrifugiert. Die Proteine des Überstandes wurden mit TCA präzipitiert. Das Sediment wurde direkt in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

2.4.7 Limitierte Proteolyse mitochondrialer Proteine

Zur limitierten Proteolyse wurden Mitochondrien bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in Proteolyse-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 4°C solubilisiert. Anschließend wurden die Proben in zwei Teile geteilt. Zu einem Teil wurden 0,5 µg Trypsin gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TCA gestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

Proteolyse-Puffer

20 mM HEPES/KOH pH 7,4

100 mM KCl

10 mM MgCl₂

1% Triton X-100

2.4.8 Bestimmung der Aktivität von MDH und SDH in Mitochondrien

Die Aktivitäten von MDH (Malat-Dehydrogenase) und SDH (Succinat-Dehydrogenase) wurden photometrisch bestimmt. Bei der von MDH katalysierten Reaktion dient NAD⁺ als Elektronenakzeptor. Das gebildete NADH kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Dazu wurden 80 µg Mitochondrien in 1 M Glycin/NaOH pH 10,0, 85 mM Malat und 2,44 mM NAD⁺ bei 30°C inkubiert und die Extinktionsänderung gemessen. Aus den erhaltenen Daten lässt sich die Aktivität der MDH mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm (6220 M⁻¹cm⁻¹) berechnen.

Bei der von SDH katalysierten Reaktion wurde der natürliche Elektronenakzeptor FAD in der Reaktion durch PMS ersetzt. Dieses kann die erhaltenen Elektronen auf den Farbstoff DCPIP übertragen. Aus der Extinktionsänderung bei 600 nm lässt sich mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von DCPIP bei 600 nm (21 mM⁻¹cm⁻¹) die Aktivität berechnen. Für die Reaktionen wurden 40 µg Mitochondrien in 50 mM Tris pH7,4, 20 mM Succinat, 70 µM

DCPIP, 0,39 mM PMS, 1 mM Natriumcyanid, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 bei 30°C inkubiert.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Verwendete Antikörper

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit einer kurzen Beschreibung und einer Referenz angegeben.

Antikörper	Antigen	Referenz
α Hsp70	Ssc1 aus <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
α Hep1	Hep1 aus <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
α AAC	AAC2 aus <i>N. crassa</i>	(Klingenberg, 1973)
α Tim50	N-terminales Peptid von Tim50 aus <i>S. cerevisiae</i> : QKETKDDKPKSILTDC	(Mokranjac et al., 2003a)
α Tim44	Tim44 ₆₈₋₃₄₅ -his ₆ aus <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
α Mge1	His ₆ -Mge1 Δ 43 aus <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
α Ssq1	GST-Ssq1 ₅₄₈₋₆₅₇ aus <i>S. cerevisiae</i>	(Lutz et al., 2001)
α Ssc3	C-terminales Peptid von Ssc3 aus <i>S. cerevisiae</i> : QLYKNSDNPETKNGRENK	(Baumann et al., 2000)
α Ssc1 C _{pep}	C-terminales Peptid von Ssc1 aus <i>S. cerevisiae</i> : NNNNNNNGNNAESGETKQ	

Tabelle 2.3: verwendete Antikörper

2.5.2 Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Zur Erzeugung polyklonaler Antiseren wurden in Bakterien exprimierte rekombinante Proteine eingesetzt. Gereinigte rekombinante Proteine wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen geladen, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Ponceau S angefärbt. Für jede Injektion wurden 4 Banden (200 μ g Protein) ausgeschnitten und die Nitrozellulose in 300 μ l DMSO aufgelöst. Die Antigenlösung wurde für die Erstinjektion mit 300 μ l „TiterMax“ (CytRX) versetzt. Für die nachfolgenden Injektionen, die ab der zweiten Injektion im Abstand von etwa vier Wochen erfolgten, wurden 300 μ l Antigenlösung mit 300 μ l Freudschen Adjuvans (inkomplett) (Sigma) gemischt. Das Antigen wurde subkutan nahe der Lymphknoten in der Achselregion der Kaninchen gespritzt. Zu Beginn der Immunisierung

wurde das Antigen im Abstand von zwei Wochen zweimal gespritzt bevor dem Kaninchen zum ersten Mal Blut abgenommen wurde.

Zehn Tage nach jeder Injektion wurden aus der Ohrvene des Kaninchens 20-25 ml Blut entnommen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Gerinnung wurde das Serum durch zwei Zentrifugationsschritte ($3000\times g$, 5 min, RT und $27200\times g$, 15 min, RT) gewonnen. Das Komplementsystem wurde durch Inkubation für 20-30 min bei 56°C inaktiviert und das Serum bei -20°C gelagert.

2.5.3 Reinigung von Antikörpern

Die antigenspezifischen Antikörper wurden mit Hilfe einer Antigensäule aus dem Serum aufgereinigt. Die Affinitätsreinigung erfolgte in modifizierter Form nach Harlow und Lane (Harlow and Lane, 1988).

Zu Beginn der Antikörperreinigung wurde die Affinitätssäule mit folgenden Puffern gewaschen: **I:** 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, **II:** 10 ml 100 mM Glycin-HCl, pH 2,5, **III:** 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, **IV:** 10 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5 und **V:** 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Dann wurde das Antiserum (6 ml) mit 24 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, verdünnt und mit 1 mM PMSF versetzt. Das verdünnte Antiserum wurde dreimal auf die vorbereitete Affinitätssäule geladen. Anschließend wurde diese mit 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, und 10 ml 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5, gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von zunächst 10 ml 100 mM Zitronensäure-NaOH, pH 4,0, dann 10 ml 100 mM Glycin-HCl, pH 2,5, und anschließend 10 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5. Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen in vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen, die 200 μl 1 M Tris-HCl, pH 8,8 (für die Ziträt- und Glycinelution), bzw. 100 μl 1 M Glycin, pH 2,5 (für die Phosphatelution), enthielten. Dadurch wurde die Neutralisierung der Eluate erreicht. Die Fraktionen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zum Abschluss wurde die Affinitätssäule mit 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen und in 0,05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Proteine, die auf Nitrozellulosemembran transferiert worden waren, wurden mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer 1 h in TBS (154 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Danach wurde die Blockierlösung entfernt und der Primärantikörper für 1-2 h bei RT oder

über Nacht bei 4°C zugegeben. In Abhängigkeit vom Titer des Antikörpers wurde dieser 1:50 bis 1:10.000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS, 10 min in TBS/0,05% (v/v) Triton X-100 und erneut 10 min in TBS gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper aus der Ziege verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Diese sekundären Antikörper wurden 1:10.000 in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membranen 1 h mit dieser Lösung inkubiert.

Zum Nachweis von Proteinen mit Histidin-Anhang wurden ein monoklonaler α -His Antikörper (Dianova) verwendet. Dieser wurde 1:1000 3% BSA in TBS verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-Antikörper 1:10.000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS eingesetzt.

Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem nachgewiesen. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und die Signale auf Röntgenfilmen nachgewiesen. Die Lumineszenz-Lösung wurde durch Mischen gleicher Volumina an Lösung 1 und Lösung 2 hergestellt.

Lösung 1:

3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5,
300 μ l Luminol (440 mg/10 ml DMSO),
133 μ l p-Kumarinsäure (150 mg/10 ml DMSO)
H₂O ad 30 ml

Lösung 2

3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5
18 μ l H₂O₂ (30%)
H₂O ad 30 ml

2.5.5 Immunpräzipitationsexperimente

Zunächst wurden die ATP-Level in Mitochondrien wie unter 2.3.6 beschrieben manipuliert. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert und bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in IP-Puffer mit 1% Digitonin für 1 h bei 4°C solubilisiert. Während dieser Zeit wurden je 50 μ l Protein A Sepharose CL4B (Amersham Biosciences) dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Matrix mit 50 bis 100 μ l eines affinitätsgereinigten Antikörpers oder 3 bis 5 μ l eines Antiserums in 1 ml TBS für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Matrix dreimal mit TBS gewaschen und mit IP-Puffer äquilibriert. Die solubilisierten Mitochondrien wurden nach einer Zentrifugation (90720 \times g, 4°C, 20 Minuten) zu der Matrix gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler

inkubiert. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit IP-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert.

IP-Puffer:

20 mM Tris HCl pH 7,4

80 mM KCl

5 mM MgCl₂

10% Glycerol

2.6 Nährmedien

2.6.1 Medien für *S. cerevisiae*

Alle angegebenen Medien wurden in Milli-Q-Wasser angesetzt und autoklaviert. Falls Nährmedienplatten hergestellt werden sollten, wurden 2% AgarAgar (Serva) zugesetzt.

YP-Medium (Vollmedium)

1% Bacto Pepton

1% Hefeextrakt

pH 5,5 (mit KOH eingestellt)

für YPD-Medium wurden 2% Glukose zugesetzt, für YPG-Medium 2% Glycerol

S-Medium (Selektivmedium)

0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base (ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren)

0,5% (w/v) Ammoniumsulfat

2% (w/v) Glukose

Die folgenden Selektionsmarker wurden entsprechend dem zu erstellenden Medium zugegeben:

20 mg/l Adeninsulfat

20 mg/l Uracil

20 mg/l L-Tryptophan

20 mg/l L-Histidin

30 mg/l L-Leucin

30 mg/l L-Lysin

Laktatmedium

3 g Hefeextrakt

1 g KH_2PO_4
1 g NH_4Cl
0.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.5 g NaCl
0.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3 mg FeCl_3
22 ml Milchsäure
 H_2O ad 1 Liter

2.6.2 Medium für *E. coli*

LB-Medium

1% Bacto Trypton
1% NaCl
0,5% Hefeextrakt

2.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Firma	Material
Agfa, München:	Fixier und Entwickler für Röntgenfilme
Amersham Biosciences (GE Healthcare), München:	Protein A Sepharose CL4B, CNBr aktivierte Sepharose, Bacto Pepton, 7-Methyl- Guanosintriphosphat (7mGpppG)
BioRad, München:	Bradford-Reagenz, HRP-gekoppelte Antikörper aus Ziege, Minisäulen
Biozym, Heidelberg:	SP6-Polymerase
Dianova:	Anti-His-Antikörper
Difco, Detroit, USA:	Yeast Nitrogen Base
Fuji:	Super RX Röntgenfilm
Fluka:	Trichloressigsäure
Gerbu, Gaiberg:	IPTG
Lancaster:	5-FOA
MP Biomedicals:	^{35}S -Methionin, ^{32}P -ATP
Merck Biosciences, Darmstadt:	pETDuet-Vektor, Ni-NTA-Agarose

New England Biolabs, Schwalbach:	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, Restriktionsenzyme, T4-DNA- Ligase, Amylose-Resin
PeQlab, Heidelberg:	Agarosegeleextraktionskit, Proteinmarker
Pierce, Rochester, USA:	Quervernetzungsreagentien
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Retikulocytenlysat, TNT-Lysat, <i>Pure-Yield</i> [®] Plasmid <i>Midiprep</i> System
Roche, Penzberg:	ATP, ADP, Proteinase K, Oligomycin
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembran, Filterpapier
Serva Electrophoresis, Heidelberg:	Acrylamid, Bis-Acrylamid, AgarAgar, Agarose, Ponceau S, TEMED, Trypton, BSA, Coomassie Brilliant blue
Sigma-Aldrich, München :	Apyrase, APS, D-Sorbitol, Kodak Biomax XR Röntgenfilme, Imidazol

Weitere Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.8 Geräte

Firma	Geräte
Agfa-Gevaert, München:	Entwicklermaschine Cumix 60
Amersham Biosciences (GE Healthcare), München:	Spannungsgeräte, peristaltische Pumpen, Photometer Ultraspec [®] 10
Beckman Instruments, München:	Kühlzentrifugen J2-21 und Avanti J-25, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich Rotoren und Zentrifugenröhrchen
Bender und Hobein, München:	Mixer zum Vortexen
Biometra, Göttingen:	TRIO-Thermoblock
BioRad, München:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler
Eppendorf, Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße

Fuji:	Phospho-Imager BAS-1500
Heraeus Christ, Osterode:	Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada:	DNAMAN 4.1 (Molekularbiologische Software)
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
MWG-Biotech AG, Ebersberg:	Primus 25 Personal Thermal Cyclers System für PCR
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen
Schütt, Göttingen:	"Bioclav"-Autoklav
Sigma, München:	Tisch-Kühlzentrifugen
Werkstatt des Instituts, München:	Semidry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopf-Schüttler, Neurospora-Mühlen

3 Ergebnisse

3.1 Die J-Proteine des mitochondrialen Importmotors

3.1.1 Tim14 ist das essenzielle J-Protein des Importmotors

MtHsp70 ist die zentrale Komponente des Importmotors der TIM23-Translokase. Es nutzt die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um entfaltete Proteine vollständig in die mitochondriale Matrix zu importieren (Neupert and Brunner, 2002). Hsp70-Systeme setzen sich normalerweise aus einem Hsp70-Chaperon, einem J-Domänen-Protein, welches die ATPase-Aktivität des Hsp70-Chaperons stimuliert, und einem Nukleotidaustauschfaktor zusammen. Für den Importmotor der TIM23-Translokase war zu Beginn dieser Arbeit jedoch kein J-Cochaperon bekannt. Deshalb sollte nach einer solchen neuen Komponente der TIM23-Translokase gesucht werden. In der Literatur wurden mehrere potentielle Kandidaten beschrieben, die bisher noch nicht charakterisiert wurden (Berthold et al., 1995; Blom et al., 1995; Moro et al., 1999). Handelt es sich bei einer dieser Komponenten um das fehlende J-Protein des Importmotors? Ein möglicher Kandidat für dieses Protein ist ein Quervernetzungsprodukt von Tim44 mit einer molekularen Masse von 15 bis 20 kDa (Moro et al., 1999). Dieses Protein wird vom offenen Leserahmen YLR008c kodiert und hat in seinem C-terminalen Teil einen Bereich, der starke Sequenzähnlichkeit zu J-Domänen zeigt (D'Silva et al., 2003; Mokranjac et al., 2003b; Truscott et al., 2003). Es ist ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran, dessen C-Terminus mit der J-Domäne in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Da gezeigt werden konnte, dass dieses Protein ein Teil der TIM23-Translokase ist und dass seine Depletion zu einem stark verringertem Import von TIM23-Substraten in Mitochondrien führt, wurde es Tim14 genannt (Mokranjac et al., 2003b). Wie alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Komponenten der TIM23-Translokase wird Tim14 von einem essenziellen Gen kodiert.

Der Importdefekt tritt nur bei TIM23-Substraten auf, die den Importmotor für ihre Translokation benötigen (Mokranjac et al., 2003b). Des Weiteren interagiert Tim 14 ATP-abhängig mit mtHsp70. Dies führte zu der Annahme, dass Tim14 Teil des Importmotors und somit das fehlende J-Protein des Importmotors ist. Um dieses Vermutung zu bestätigen, wurden die Komponenten des Importmotors gereinigt (Abbildung 3.1) und der Einfluss von Tim14 auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70 untersucht. MtHsp70 wurde mit radioaktiv markiertem ATP entweder alleine oder in Gegenwart des Nukleotidaustauschfaktors Mge1, in Gegenwart von Tim14 oder in Gegenwart von Mge1 und Tim14 bei 25°C inkubiert. Wie für

ein J-Protein erwartet, stimulierte Tim14 die ATPase-Aktivität von mtHsp70 (Abbildung 3.2 A). Die beobachtete, etwa fünffache, Stimulation durch Tim14 wurde durch Zugabe des Nukleotidaustauschfaktors Mge1 um den Faktor 5 weiter gesteigert. Somit ist Tim14 ein funktionelles J-Protein.

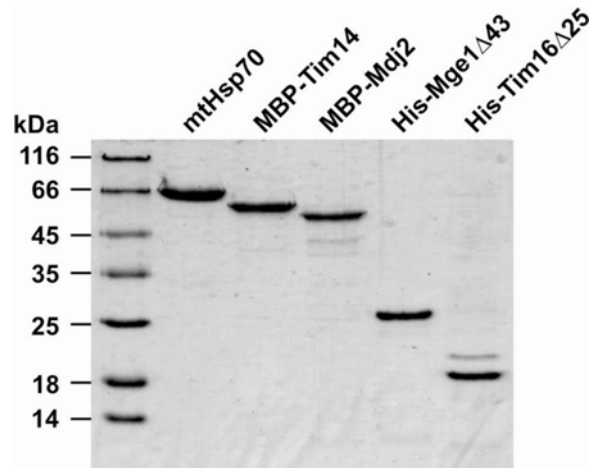


Abbildung 3.1: Reinigung der Komponenten des Importmotors. Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der gereinigten Proteine. MtHsp70 wurde aus *S. cerevisiae*, Tim14 und Mdj2 als MBP-Fusionsproteine aus *E. coli* und Mge1 und Tim16 mit Hilfe eines Histidin-Anhangs aus *E. coli* gereinigt.

Um zu überprüfen, ob die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 für Hefezellen essenziell ist, wurde eine Mutante hergestellt, in der das in J-Proteinen konservierte HPD-Motiv in ein QPD-Motiv geändert wurde. Eine solche Mutation verhindert die Stimulation von Hsp70-Proteinen durch J-Proteine (Mayer et al., 1999; Wall et al., 1994). Ein für diese Mutante kodierendes Plasmid wurde in einen diploiden Hefestamm transformiert, in dem ein Allel des *TIM14*-Gens deletiert ist. Die Transformanten wurden anschließend sporuliert und eine Tetradenanalyse durchgeführt. Nur jeweils zwei der vier Sporen waren lebensfähig (Abbildung 3.2 B). Eine Kopie des *TIM14*-Gens wurde im Ausgangsstamm gegen die *HIS3*-Kassette ausgetauscht. Deshalb sollten Sporen, in denen *TIM14* deletiert ist, auf Histidin-Mangelmedium wachsen können, wohingegen die Sporen, die noch über die chromosomale Kopie von *TIM14* verfügen, auf diesem Medium nicht wachsen können. Um zu überprüfen, ob es sich bei den lebensfähigen Sporen um Sporen handelt, die die chromosomale Kopie von *TIM14* enthalten, wurde das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium untersucht. Die Analyse zeigte, dass keine der untersuchten Sporen auf Histidin-Mangelmedium wachsen konnte (Daten nicht gezeigt). Alle lebensfähigen Sporen enthielten somit eine chromosomale Kopie des *TIM14*-Gens. Tim14 benötigt also ein intaktes HPD-Motiv für seine Funktion.

Die Ergebnisse zeigen, dass Tim14 die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimulieren kann. Diese Funktion ist essenziell für Hefezellen. Mit Tim14 wurde somit ein funktionelles J-Domänen-Cochaperon des Importmotors der TIM23-Translokase identifiziert.

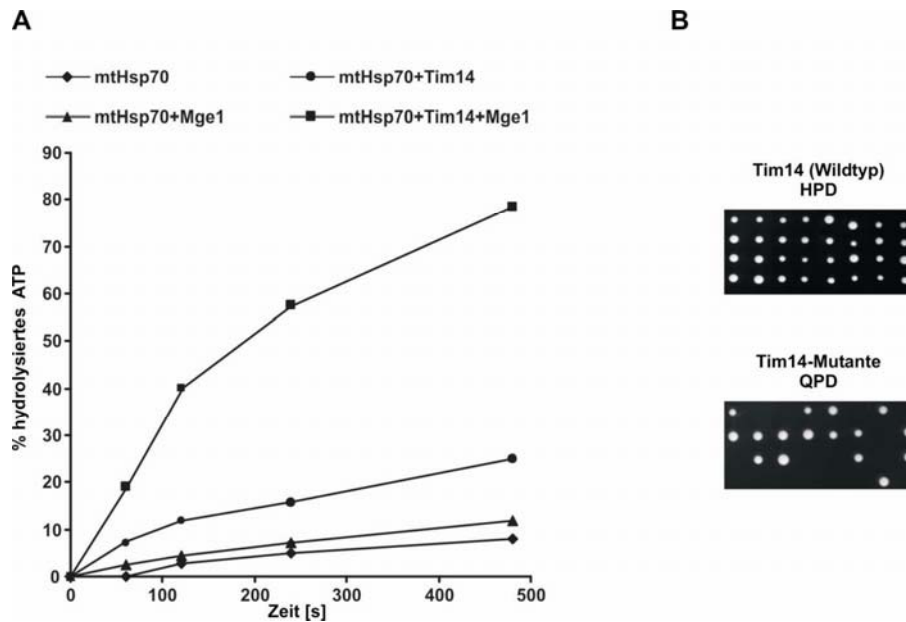


Abbildung 3.2: Die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 ist für Hefezellen essenziell. **A** Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14. MtHsp70 wurde in Gegenwart der angegebenen Cochaperone mit γ -³²P-ATP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Menge an hydrolysiertem ATP wurde mit einem Phosphorimager bestimmt. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 ist als Prozentsatz an hydrolysiertem ATP zum gegebenen Zeitpunkt dargestellt. **B** Tetradenanalyse einer Tim14-QPD-Mutante. Das konservierte HPD-Motiv von Tim14 wurde mittels *in vitro* Mutagenese in QPD geändert. Das erhaltene Plasmid wurde in einen diploiden Hefestamm transformiert, in dem eine chromosomale Kopie des *TIM14*-Gens deletiert ist. Die diploiden Zellen wurden sporuliert und das Wachstum der einzelnen Sporen aus acht Tetraden auf YPD-Medium untersucht.

3.1.2 Mdj2 ist ein weiteres J-Protein des Importmotors in *S. cerevisiae*

Das Genom von *S. cerevisiae* enthält ein Homolog von *TIM14*, *MDJ2* (Westermann and Neupert, 1997). Die Aminosäuresequenzen der von diesen Genen kodierten Proteine sind zu 55 % miteinander identisch. Wie Tim14 ist Mdj2 ein integrales Membranprotein mit einer J-Domäne, die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Allerdings zeigt die Deletion von *MDJ2* keinen Wachstumsphänotyp. Diese Beobachtung ist verwunderlich, da Mdj2 wie auch Tim14 ein Teil der TIM23-Translokase ist (Mokranjac et al., 2005). Jedoch sind Tim14 und Mdj2 nicht Teil des gleichen Komplexes. Warum ist die Deletion des einen J-Proteins der

TIM23-Translokase (Tim14) für *S. cerevisiae* letal ist, wohingegen die Deletion des anderen J-Proteins der TIM23-Translokase (Mdj2) keinen erkennbaren Phänotyp hervorruft?

Eine Möglichkeit wäre ein Unvermögen von Mdj2 die ATPase-Aktivität von mtHsp70 zu stimulieren. Um dies zu testen, wurde Mdj2 als MBP-Fusionsprotein aus *E. coli* gereinigt (Abbildung 3.1). Der Einfluss dieses Proteins auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wurde wie oben beschrieben untersucht.

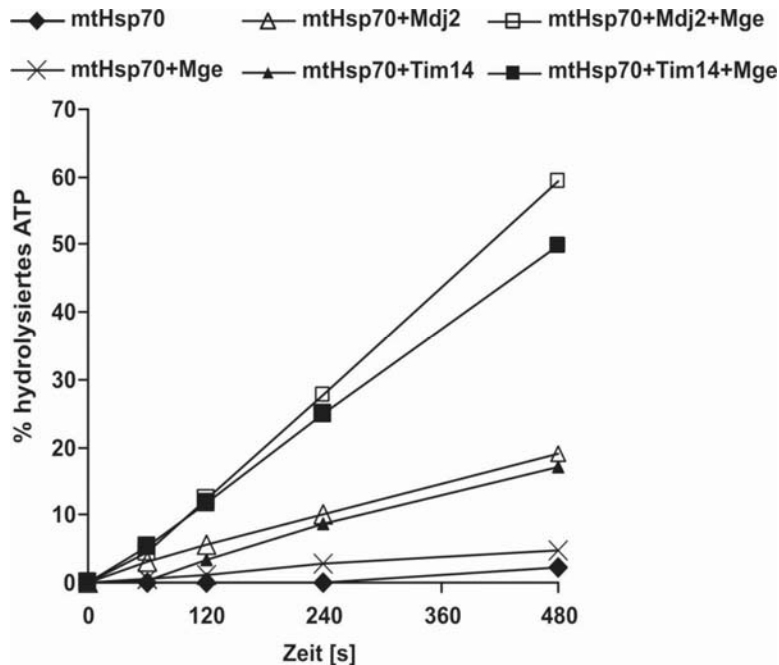


Abbildung 3.3 Mdj2 stimuliert die ATPase-Aktivität von mtHsp70. MtHsp70 wurde in Gegenwart verschiedener Cochaperone mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an hydrolysiertem ATP bestimmt. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 ist als Prozentsatz an hydrolysiertem ATP zum gegebenen Zeitpunkt dargestellt.

Mdj2 stimulierte die Hydrolyse von ATP durch mtHsp70 in gleichem Maß wie Tim14 (Abbildung 3.3). Wie im Falle von Tim14 konnte der stimulierende Effekt von Mdj2 durch Zugabe von Mge1 gesteigert werden. Mdj2 ist ein zweites funktionelles J-Cochaperon des Importmotors der TIM23-Translokase. Es unterscheidet sich von Tim14 nicht in der Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70.

3.1.3 Tim16, ein J-ähnliches Protein im Importmotor, reguliert die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 und Mdj2

Neben Tim14 und Mdj2 wurde eine weitere Komponente der TIM23-Translokase identifiziert, Tim16 (Frazier et al., 2004; Kozany et al., 2004). Dieses Protein ist ein peripheres Membranprotein, das an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es bildet eine Struktur, die der Struktur einer J-Domäne stark ähnelt (Mokranjac et al., 2006). Allerdings fehlt in Tim16 das konservierte HPD-Motiv der J-Proteine. Tim16 ist notwendig, um Tim14 an die TIM23-Translokase zu rekrutieren. Eine Verringerung der Tim16-Menge in Mitochondrien führt zu Importdefekten von TIM23-Substraten, die einen funktionellen Importmotor für ihre Translokation in Mitochondrien benötigen. Ebenso interagiert Tim16 ATP-abhängig mit mtHsp70.

Zunächst wurde untersucht, ob Tim16 die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimulieren kann (Abbildung 3.4 A). Dazu wurde eine Variante von Tim16, in der die ersten 25 Aminosäuren fehlen, mittels eines Histidin-Anhangs aus *E. coli* gereinigt. Dieses Protein war im Gegensatz zum vollständigen Tim16 in *E. coli* löslich. Mit diesem Protein und dem Kontrollprotein MBP-Tim14 wurde, wie oben beschrieben, ein ATPase-Assay durchgeführt. Wie aufgrund des Fehlens des HPD-Motivs vermutet wurde, konnte keine Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim16 beobachtet werden.

Tim16 bildet einen stabilen Komplex mit Tim14 und einen weniger stabilen Komplex mit Mdj2. Beeinflusst die Bindung von Tim16 an Tim14 oder Mdj2 deren Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70? Zunächst wurden Tim16-Tim14- und Tim16-Mdj2-Komplexe gebildet, indem steigende Mengen von Tim16 mit Tim14 oder Mdj2 inkubiert wurden. Anschließend wurde gemessen, ob die ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch die Zugabe dieser Komplexe stimuliert wird (Abbildung 3.4 B). Ein Überschuss von Tim16 führte zu einer verringerten Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14. Im Gegensatz wurde die Aktivität durch Mdj2 in Gegenwart großer Mengen an Tim16 verstärkt stimuliert.

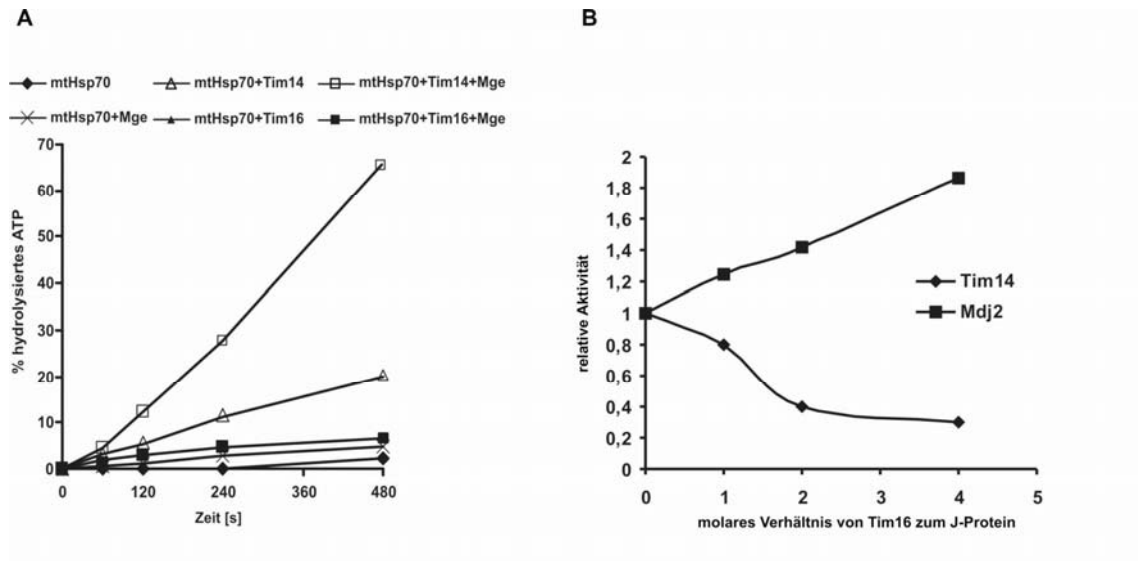


Abbildung 3.4: Einfluss von Tim16 auf die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70. A Stimulierung der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 oder Tim16. MtHsp70 wurde in Gegenwart verschiedener Cochaperone mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an hydrolysiertem ATP bestimmt. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 ist als Prozentsatz an hydrolysiertem ATP zum gegebenen Zeitpunkt dargestellt. **B** Einfluss von Tim16 auf die Stimulation von mtHsp70 durch Tim14 und Mdj2. Zunächst wurden steigende Mengen von Tim16 Δ 25 entweder mit MBP-Tim14 oder MBP-Mdj2 für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden mtHsp70, Mge1 und radioaktiv markiertes ATP zugegeben und weitere 8 Minuten bei 25°C inkubiert und die relative ATPase-Aktivität ermittelt. Als Bezugspunkt diente die Aktivität in Abwesenheit von Tim16.

Diese Ergebnisse schließen für Tim16 eine Funktion als J-Cochaperon des Importmotors aus. Da Tim16 *in vitro* die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 hemmt und die Stimulation durch Mdj2 verstärkt, scheint es eher eine Funktion als Modulator der J-Cochaperone des Importmotors zu haben.

3.2 Hep1, ein Chaperon für mitochondriale Hsp70-Proteine

3.2.1 Identifizierung eines 17 kDa-Proteins, das mit mtHsp70 interagiert

Mit Tim14, Mdj2 und Tim16 wurden drei neue Interaktionspartner von mtHsp70 gefunden. Diese Proteine wurden wegen ihrer Interaktionen mit Komponenten der TIM23-Translokase identifiziert. Neben seiner zentralen Funktion im Importmotor der TIM23-Translokase erfüllt mtHsp70 noch weitere wichtige Funktionen in der mitochondrialen Matrix. Es interagiert nicht nur mit der TIM23-Translokase, sondern auch mit anderen Partnerproteinen. Um weitere Interaktionspartner von mtHsp70 zu identifizieren, wurde mtHsp70 aus Hefemitochondrien mit Hilfe eines C-terminalen Histidin-Anhangs gereinigt. Dazu wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 solubilisiert und das Solubilisat wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Nach ausführlichem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung untersucht. Die im Vergleich zum nicht markierten Wildtypstamm spezifisch eluierten Proteine wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Unter den gewählten Bedingungen einer ATP-Depletion wurden die bekannten mtHsp70-Interaktionspartner Tim44 und Mge1 im Eluat gefunden (Abbildung 3.5 A). Zusätzlich konnte ein Protein mit einer molekularen Masse von 17 kDa identifiziert werden, das vom offenen Leserahmen YNL310c kodiert wird. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurde dieses Protein Hep1, für Hsp70 eskortierendes Protein, genannt.

Um die Spezifität der Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 zu überprüfen, wurden die Reinigungen aus dem Stamm mit der Histidin-markierten Variante von mtHsp70 und aus einem Wildtypstamm mit Immunoblotting untersucht (Abbildung 3.5 B). Hep1 wurde nur zusammen mit dem markierten mtHsp70 an die Ni-NTA-Säule gebunden. Dagegen wurde das reichlich vorhandene mitochondriale Protein AAC nicht an die Säule gebunden. Diese Ergebnisse bestätigen die spezifische Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70.

Homologe von Hep1 finden sich in allen untersuchten eukaryotischen Organismen. Alle diese Homologe verfügen über eine putative N-terminale mitochondriale Signalsequenz, haben aber keine Transmembrandomäne. Ein Sequenzvergleich der Hep1-Proteine aus mehreren Spezies zeigte, dass der zentrale Bereich von Hep1 konserviert ist (Abbildung 3.5 C). Besonders auffällig sind zwei konservierte C-X-X-C-Motive.

Das *HEP1*-Gen enthält in seiner Promotorregion ein Hitzeschockelement (HSE) und eine HSE-ähnliche Sequenz (Abbildung 3.5 D), wie sie bei den mitochondrialen Chaperoninen und *MDJ1* gefunden wird.

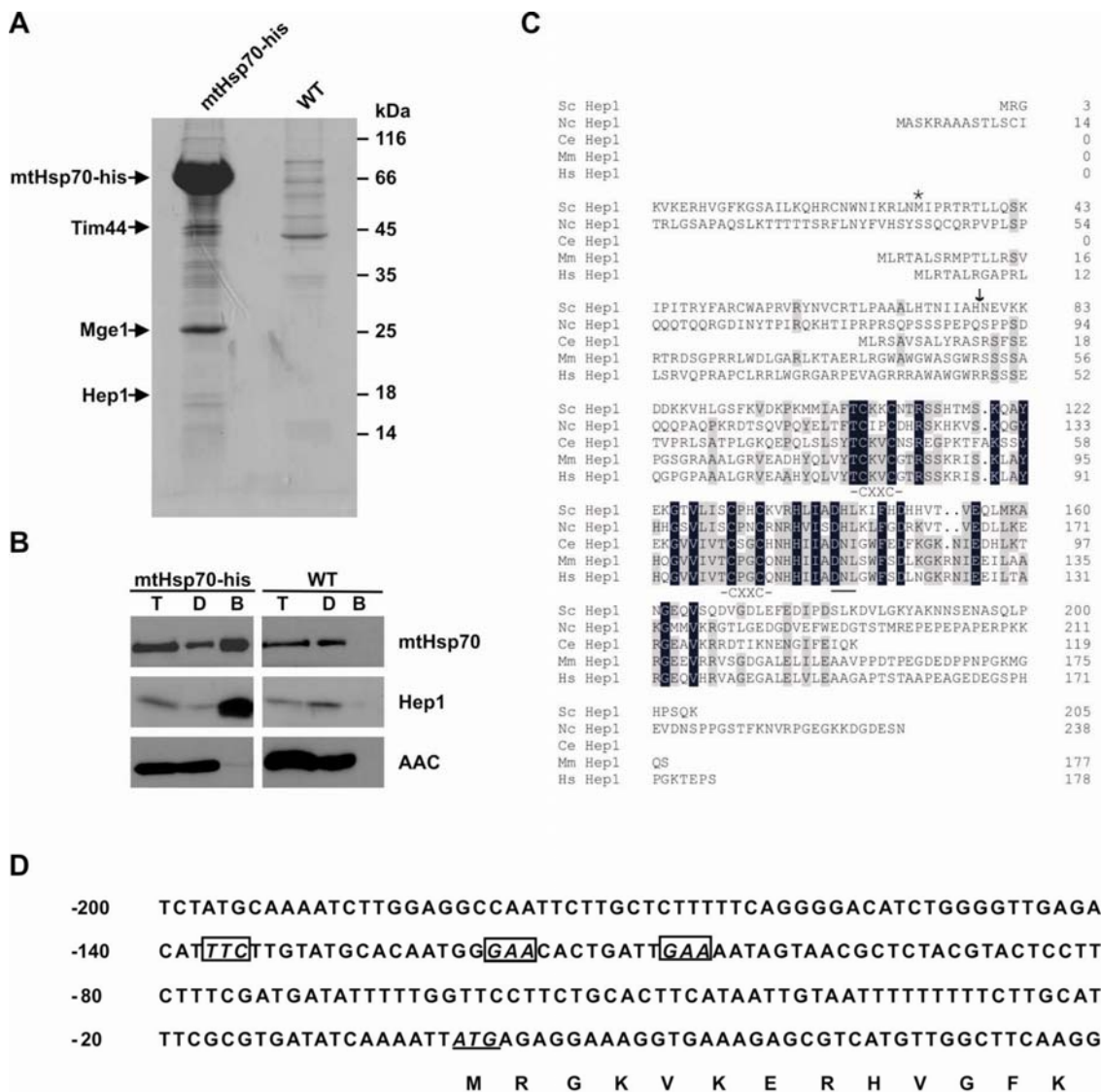


Abbildung 3.5 Identifikation von Hep1. **A und B** Koisolierung von Hep1 mit *his*-markiertem mtHsp70. Mitochondrien eines Wildtyp-Hefestamms und eines Stammes, der *his*-markiertes mtHsp70 exprimiert, wurden mit Triton X-100 lysiert. **A** Das Lysat wurde über eine Ni-NTA-Säule gegeben. Das gebundene Material wurde eluiert und mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht. Tim44, Mge1 und Hep1 wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. **B** Das Lysat wurde mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Anschließend wurde die Matrix isoliert. Proben aus dem Lysat (T, total), dem nicht gebundenen Material (D, Durchfluss) und dem gebundenen Material (B, gebunden) wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration gegen die angegebenen Proteine analysiert. **C** Sequenzvergleich der Hep1-Proteine aus *S. cerevisiae* (Sc), *Neurospora crassa* (Nc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Mus musculus* (Mm) und *Homo sapiens* (Hs). Der Stern bezeichnet ein alternatives Startmethionin. Der Pfeil zeigt den mittels Edman-Abbau gefundenen N-Terminus des reifen Proteins in *S. cerevisiae*. **D** Darstellung der Promotorregion des *HEP1*-Gens. Das Startcodon ist unterstrichen. Die Elemente des Hitzeschockelements sind umrandet.

3.2.2 Subzelluläre und submitochondriale Lokalisierung von Hep1

Zur Bestimmung der Topologie von Hep1 wurden Import- und Lokalisierungsexperimente durchgeführt.

Zunächst wurde ein ^{35}S -markiertes Vorläuferprotein von Hep1 *in vitro* synthetisiert. Dieses Protein wurde mit isolierten Mitochondrien inkubiert (Abbildung 3.6 A). In Gegenwart des Membranpotentials $\Delta\Psi$ wurde dieses Protein in die Mitochondrien importiert und prozessiert. Das reife Protein hat eine molekulare Masse von 17 kDa. Es ist sowohl in Mitochondrien als auch in Mitoplasten vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt.

Um die mitochondriale Lokalisation von Hep1 zu bestätigen, wurden Hefezellen aufgeschlossen und mittels differentieller Zentrifugation aufgetrennt. Hep1 wurde ausschließlich in der die Mitochondrien enthaltenen Fraktion gefunden (Abbildung 3.6 B).

Zur Bestimmung der submitochondrialen Lokalisation von Hep1 wurden Mitochondrien, Mitoplasten und mit Triton X-100 lysierte Mitochondrien mit Proteinase K behandelt (Abbildung 3.6 C, linke Seite). Hep1 war wie in den Importexperimenten sowohl in Mitochondrien als auch in Mitoplasten vor proteolytischem Abbau geschützt. Ähnlich verhielten sich die mitochondrialen Matrixproteine Mge1 und Tim44 und das Innenmembranprotein AAC. AAC ist in Mitoplasten jedoch teilweise für Proteinase K zugänglich, was sich durch die leichte Veränderung der molekularen Masse zeigt. Diese wird durch Abbau des Teils von AAC hervorgerufen, der sich im Intermembranraum befindet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Hep1 sich entweder in der mitochondrialen Matrix oder in der Innenmembran der Mitochondrien befindet.

Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Mitochondrien mit Natriumcarbonat extrahiert (Abbildung 3.6 C, rechte Seite). Hep1 konnte im Gegensatz zu den Membranproteinen Tom70 und AAC extrahiert werden. Es ist also kein integrales Membranprotein.

Zur Untersuchung der Membranassoziation von Hep1 wurden Mitochondrien in Gegenwart von steigenden Mengen KCl mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation sedimentiert. Hep1 befand sich bereits bei der geringsten Konzentration an KCl im Überstand. Das gleiche Verhalten konnte für das Matrixprotein Mge1 festgestellt werden. Hep1 ist ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix.

Diese Ergebnisse bestätigen die erwartete Lokalisation eines Interaktionspartners von mtHsp70 in der mitochondrialen Matrix.

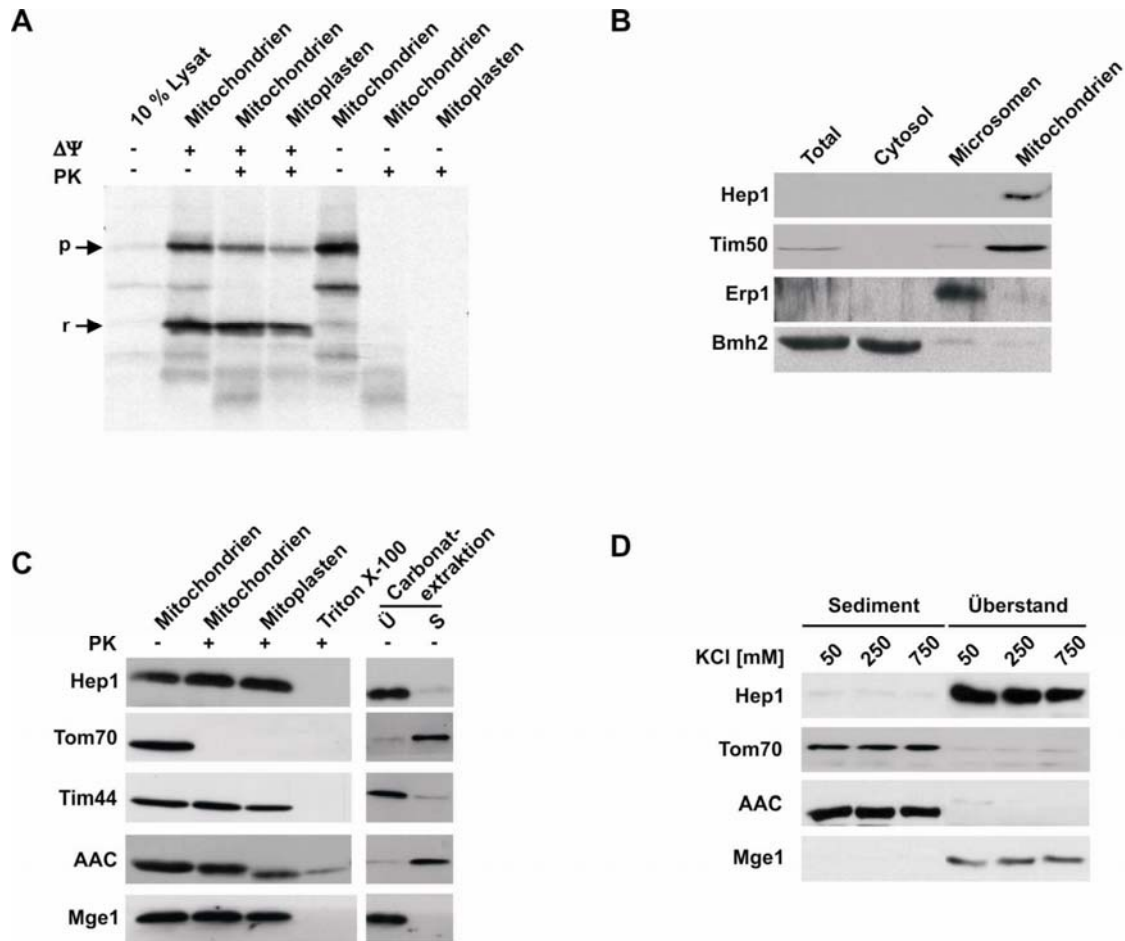


Abbildung 3.6 Lokalisierung von Hep1. **A** Import von Hep1 in Mitochondrien. ^{35}S -markiertes Hep1 wurde in Retikulozyten-Lysat hergestellt und mit Mitochondrien in Anwesenheit oder Abwesenheit eines Membranpotentials ($\Delta\Psi$) inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, ein Aliquot in Mitoplasten überführt und mit Proteinase K (PK) behandelt. Die Proben wurden mit SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht. p, Präprotein; r, reifes Protein. **B** Subzelluläre Lokalisierung von Hep1. Ein Extrakt aus Wildtypzellen von *S. cerevisiae* wurde mittels differentieller Zentrifugation aufgetrennt. Fraktionen, die dem Cytosol, den Microsomen und den Mitochondrien entsprechen, wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Bmh2 ist ein Markerprotein des Cytosols, Erp1 ein Markerprotein der Microsomen und Tim50 ein Markerprotein der Mitochondrien. **C** Submitochondriale Lokalisierung von Hep1. PK wurde zu intakten Mitochondrien, Mitoplasten und zu mit Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien gegeben. Die Membranassoziation von Hep1 wurde mit Hilfe der Carbonatextraktion untersucht (Ü, Überstand; S, Sediment). Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Das Verhalten von Hep1 wurde mit verschiedenen Markerproteinen der einzelnen Subkompartimente verglichen. **D** Salzextraktion mitochondrialer Membranen. Mitochondrien wurden mit Puffern extrahiert, die ansteigende Konzentrationen von KCl (50 mM, 250 mM und 750 mM) enthielten. Die Membranfraktion (Sediment) und die lösliche Fraktion (Überstand) wurden durch Zentrifugation getrennt.

3.2.3 Ssc3 interagiert nicht mit Hep1

Aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit zwischen mtHsp70 und Ssc3 (85% identische Aminosäuren) ist es möglich, dass Hep1 nicht nur mit mtHsp70, sondern auch mit Ssc3 interagiert. Deshalb wurde ein Hefestamm hergestellt, der ein Plasmid trägt, in dem die für Ssc3 kodierende Sequenz unter der Kontrolle des *SSC1*-Promotors kodiert ist. In diesem Konstrukt wurde ein Histidin-Anhang an den C-Terminus von Ssc3 fusioniert, um das Protein aus den Mitochondrien isolieren zu können. Die Überexpression von Ssc3 ist notwendig, da die endogene Expression von Ssc3 so gering ist, dass das Protein nicht detektiert werden kann. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Ssc3 und Hep1 wurden die Mitochondrien dieses Stammes mit Triton X-100 solubilisiert und das Solubilisat über eine Ni-NTA-Säule gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting untersucht (Abbildung 3.7). Zusammen mit Ssc3 wurde Mge1 an die Säule gebunden. Jedoch konnten weder Tim44 noch Hep1 im gebundenen Material detektiert werden. Hep1 interagiert nicht mit Ssc3.

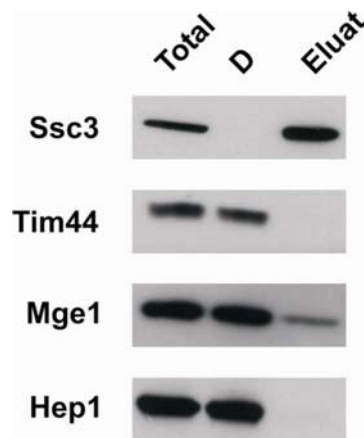


Abbildung 3.7: Ssc3 interagiert nicht mit Hep1. Mitochondrien eines Hefestammes, der eine Variante von Ssc3 mit Histidin-Anhang überexprimiert, wurden mit Triton X-100 solubilisiert. Das Solubilisat wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen und die gebundenen Proteine eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine untersucht. D, Durchfluss.

3.2.4 Die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 ist ATP-abhängig

Um die Funktionsweise von Hep1 zu verstehen, wurde die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 charakterisiert. Dazu wurden die ATP-Mengen in Mitochondrien manipuliert, indem entweder ATP und ein ATP-regenerierendes System zu den Mitochondrien gegeben wurde oder die ATP-Mengen durch Zugabe von Apyrase und Oligomycin verringert wurden.

Mit den so behandelten Mitochondrien wurden dann Ko-Immunopräzipitations- und Quervernetzungsexperimente durchgeführt.

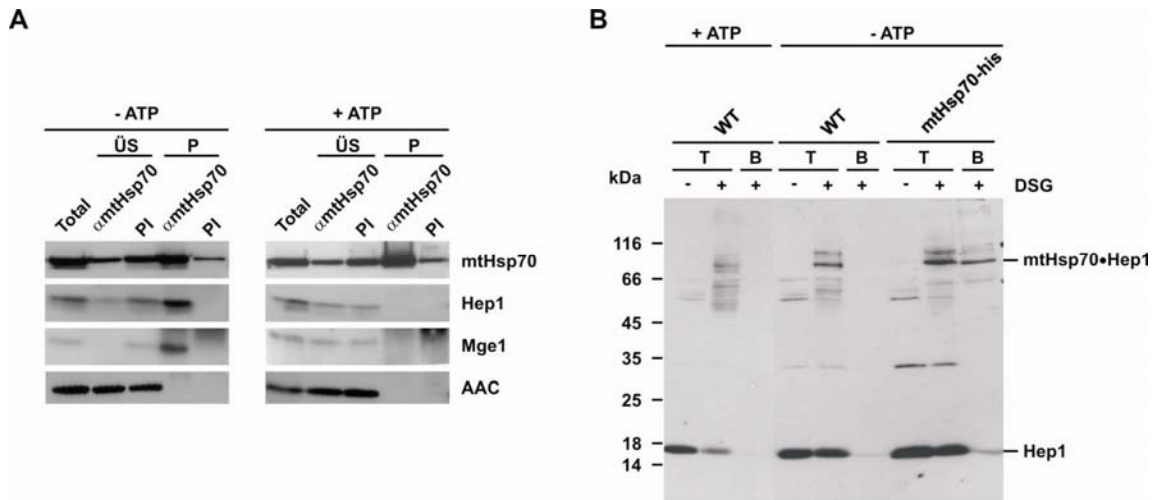


Abbildung 3.8: Die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 ist ATP-abhängig. **A** Ko-Immunopräzipitation von Hep1 mit mtHsp70. Wildtypmitochondrien wurden entweder mit Apyrase und Oligomycin (-ATP) oder mit ATP und einem ATP-regenerierendem System (+ATP) behandelt. Dann wurden die Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und das Solubilisat mit Antikörpern gegen mtHsp70 oder mit Präimmenserum (PI) inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine analysiert. **B** Hep1 kann mit mtHsp70 quervernetzt werden. Wildtypmitochondrien und Mitochondrien eines Stammes, der eine Histidin-markierte Variante von mtHsp70 exprimiert, wurden zunächst wie in **A** behandelt und dann mit DSG quervernetzt. Proben mit und ohne Quervernetzungsreagenz wurden mittels SDS-PAGE untersucht (T, Total). Ein anderer Teil wurde solubilisiert und mit Ni-NTA-Agarose versetzt. Das gebundene Material (B, gebunden) wurde eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen Hep1 untersucht.

In den Ko-Immunopräzipitationsexperimenten konnte Hep1 nur dann zusammen mit mtHsp70 gefällt werden, wenn die ATP-Menge in den Mitochondrien zuvor verringert worden war (Abbildung 3.8 A). Die Abwesenheit von AAC im Präzipitat belegt die Spezifität dieser Interaktion. Wie vorher beschrieben, konnte Mge1 ebenso nur mit mtHsp70-Antikörpern gefällt werden, wenn die ATP-Menge zuvor reduziert wurde.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Analyse der Quervernetzungsprodukte von Hep1 (Abbildung 3.8 B). Hierzu wurden zuerst die ATP-Mengen in Wildtypmitochondrien manipuliert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit dem Quervernetzungsreagenz Disuccimidylglutarat (DSG) behandelt. Es konnte ein Quervernetzungsprodukt von Hep1 mit einer molekularen Masse von etwa 90 kDa detektiert werden. Die Größe dieses Produktes entspricht der erwarteten molekularen Masse eines Quervernetzungsproduktes zwischen Hep1

und mtHsp70. Die Intensität dieser Bande war stark verringert, wenn die ATP-Menge in Mitochondrien erhöht war. Mit Hilfe eines Stammes, der eine Variante von mtHsp70 mit Histidin-Anhang exprimiert, konnte dieses Produkt als mit mtHsp70 quervernetztes Hep1 identifiziert werden. Dazu wurden die ATP-Mengen in den Mitochondrien dieses Stammes verringert und anschließend eine Quervernetzungsreaktion mit DSG durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Mitochondrien solubilisiert und das Solubilisat mit Ni-NTA-Agarose versetzt. Das Quervernetzungsprodukt konnte nur aus dem Solubilisat der Mitochondrien des Stammes mit der Histidin-markierten Variante von mtHsp70 an die Ni-NTA-Agarose binden, jedoch nicht aus dem Solubilisat von Wildtypmitochondrien. Hep1 bindet also spezifisch an mtHsp70, wenn die ATP-Menge in Mitochondrien gering ist.

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von Adeninnukleotiden auf die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 wurde die Interaktion zwischen den gereinigten Proteinen untersucht. Hierzu wurde mtHsp70 mit Hep1 inkubiert oder aber mit ADP oder ATP vorinkubiert, bevor Hep1 zugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben mit DSG quervernetzt. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen, die in Mitochondrien erhalten wurden, konnte eine Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 nur dann festgestellt werden, wenn mtHsp70 entweder kein Nukleotid oder aber ADP gebunden hatte (Abbildung 3.9 A). Im Gegensatz dazu wurde keine Interaktion festgestellt, wenn mtHsp70 mit ATP vorinkubiert wurde.

Erfolgt die Bindung von ATP an mtHsp70 kompetitiv zur Bindung von Hep1 an mtHsp70? Zur Klärung dieser Frage wurde gereinigtes nukleotidfreies mtHsp70 zunächst mit gereinigtem Hep1 inkubiert. Dann wurde zu einem Teil der Probe ATP zugegeben. Anschließend erfolgte die Quervernetzung mit DSG. Hep1 wurde durch die Zugabe von ATP von mtHsp70 gelöst (Abbildung 3.9 B).

Hep1 bindet demnach an die nukleotidfreie und die ADP-gebundene Form von mtHsp70. Diese Bindung löst sich, sobald mtHsp70 ATP bindet.

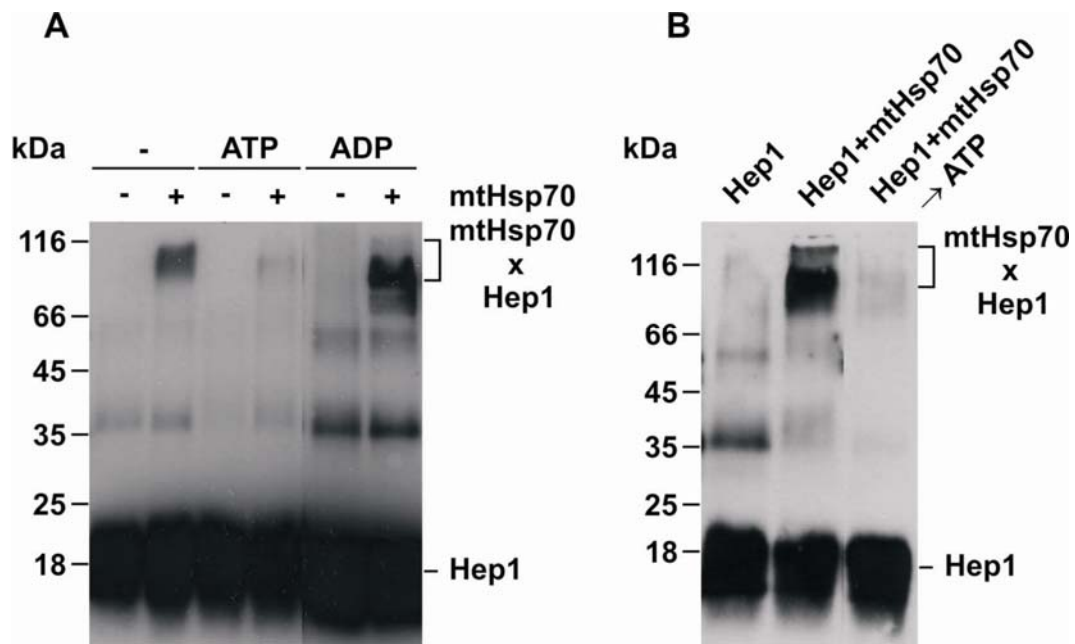


Abbildung 3.9: Hep1 interagiert mit nukleotidfreiem mtHsp70 und mit der ADP-gebundenen Form von mtHsp70. **A** Quervernetzung von Hep1 mit mtHsp70 in Gegenwart verschiedener Nukleotide. Hep1 wurde entweder mit mtHsp70 alleine oder in Gegenwart von ATP oder ADP inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit DSG quervernetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit einem Antikörper gegen Hep1 untersucht. **B** Durch Bindung von ATP an mtHsp70 wird Hep1 freigesetzt. mtHsp70 wurde zunächst mit Hep1 inkubiert. Anschließend wurde ein Teil mit ATP und ein anderer Teil ohne Nukleotid weiter inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie in **A** weiterbehandelt.

3.2.5 Die ATPase-Domäne von mtHsp70 ist notwendig für die Interaktion mit Hep1

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun bestimmt werden, welche der beiden Domänen von mtHsp70, die Peptidbindungsdomäne oder die ATPase-Domäne, für die Interaktion mit Hep1 notwendig ist. Dazu wurde zunächst die Interaktion von Hep1 mit den Temperatur-sensitiven Mutanten von mtHsp70 untersucht. *Ssc1-2* hat eine Punktmutation in der PBD und *ssc1-3* hat eine Punktmutation in der ATPase-Domäne. Die Experimente wurden bei permissiver Temperatur durchgeführt. In den isolierten Mitochondrien dieser Mutanten, wurde zunächst die ATP-Menge verringert, um die Interaktion zwischen mtHsp70 und Hep1 zu ermöglichen. Anschließend wurden die Mitochondrien solubilisiert und mtHsp70 wurde mit Antikörpern gefällt. Zum Vergleich wurde das gleiche Experiment mit Wildtypmitochondrien durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen konnte kein Unterschied in den Interaktionen von Wildtyp-mtHsp70 und *ssc1-2* mit den untersuchten Partnerproteinen festgestellt werden (Abbildung 3.10 A). Das Interaktionsmuster von *ssc1-3* unterschied sich

dagegen deutlich von dem des Wildtyp-mtHsp70. Wie in der Literatur beschrieben (Schmidt et al., 2001) wurde in dieser Mutante keine Interaktion mit Mge1 detektiert. Auch Hep1 interagiert nicht mit *ssc1-3*. Für die Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 ist eine intakte ATPase-Domäne des mtHsp70 von essenzieller Bedeutung.

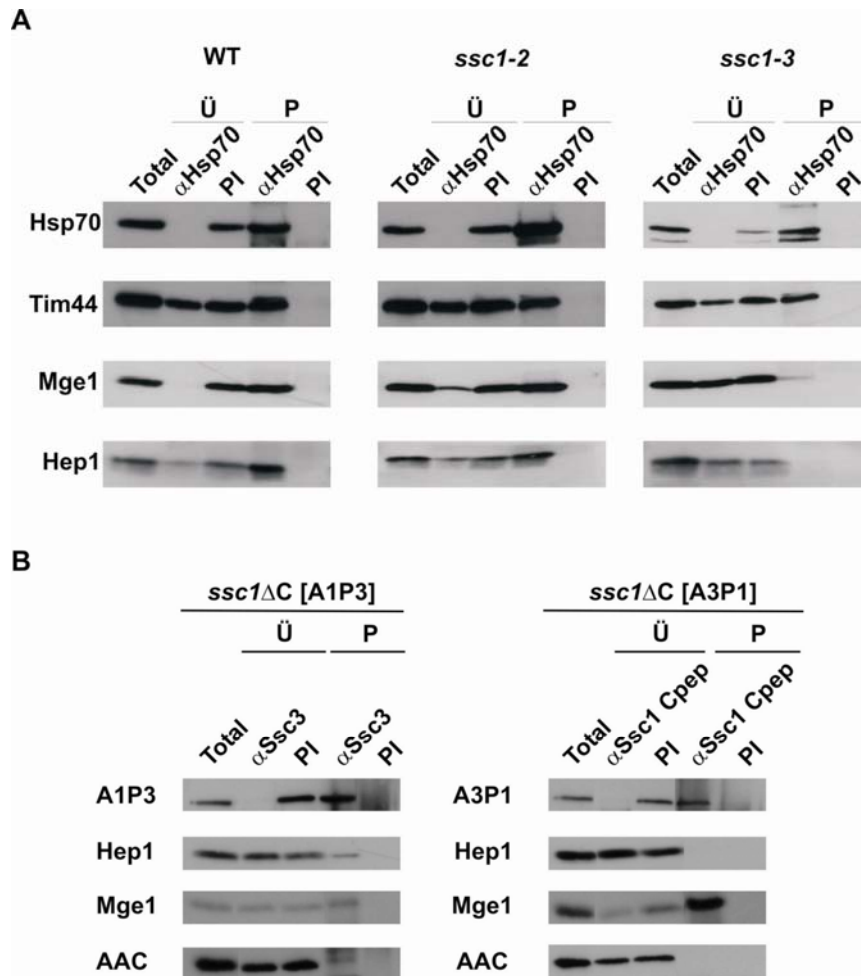


Abbildung 3.10: Die ATPase-Domäne von mtHsp70 ist notwendig für dessen Interaktion mit Hep1. **A** Ko-Immunfällung von Hep1 mit mtHsp70 aus den Temperatur-sensitiven Mutanten *ssc1-2* und *ssc1-3*. In Mitochondrien aus Wildtypzellen oder aus *ssc1-2* bzw. *ssc1-3*-Zellen wurde die ATP-Menge verringert. Anschließend wurden die Mitochondrien solubilisiert und das Solubilisat mit Antikörpern gegen mtHsp70 oder Präimmunsereum (PI) inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden mit SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine analysiert. **B** Ko-Immunfällung von Hep1 mit den Chimären A1P3 (linke Seite) und A3P1 (recht Seite). In Mitochondrien eines Hefestammes, der eine C-terminale verkürzte Variante von mtHsp70 sowie entweder die Chimäre A1P3 oder die Chimäre A3P1 exprimiert, wurde die ATP-Menge verringert. Anschließend wurden die Mitochondrien solubilisiert und das Solubilisat entweder mit Antikörpern gegen Ssc3 (zur Fällung von A1P3) oder gegen den C-Terminus von mtHsp70 (zur Fällung von A3P1) inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden wie in **A** analysiert.

Da Ssc3 nicht in der Lage ist mit Hep1 zu interagieren, konnte die Interaktion zwischen mtHsp70 und Hep1 auch in Chimären aus mtHsp70 und Ssc3 untersucht werden. Dazu wurden chimäre Proteine hergestellt, die entweder aus der ATPase-Domäne von mtHsp70 und der PBD von Ssc3 bestanden (A1P3), oder aus der ATPase-Domäne von Ssc3 und der PBD von mtHsp70 (A3P1). Diese Chimären wurden in einem Hefestamm exprimiert, in dessen chromosomaler Kopie von mtHsp70 die C-terminalen 21 Aminosäurereste deletiert wurden. Dies war notwendig, um die Chimäre A3P1 mit Hilfe eines Antikörpers gegen den C-Terminus von mtHsp70 spezifisch erkennen und fällen zu können. In diesen Mitochondrien wurde nun die Interaktion zwischen den Chimären und Hep1 mit Hilfe von Ko-Immundefällungen untersucht. Die A3P1-Chimäre interagiert nicht mit Hep1, sehr wohl aber mit Mge1 (Abbildung 3.10 B). Im Gegensatz dazu konnte eine Interaktion zwischen der A1P3-Chimäre und Hep1 detektiert werden. Diese Daten bestätigen, dass die ATPase-Domäne von mtHsp70 für die Interaktion mit Hep1 notwendig ist. Allerdings scheint die Interaktion zwischen der A1P3-Chimäre und Hep1 schwächer zu sein, als die Interaktion zwischen mtHsp70 und Hep1. Ein Einfluss der PBD von mtHsp70 auf die Bindung von Hep1 kann also nicht ausgeschlossen werden.

3.2.6 Weder die isolierte ATPase-Domäne noch die PBD von mtHsp70 interagieren mit Hep1

Die in den vorangegangenen Versuchen erhaltenen Daten zeigen, dass die ATPase-Domäne von mtHsp70 für die Interaktion mit Hep1 notwendig ist. Aber ist sie ausreichend, um diese Interaktion zu gewährleisten? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Varianten der isolierten Domänen von mtHsp70 mit Histidin-Anhang in Wildtypmitochondrien exprimiert und ihre Interaktion mit Hep1 getestet. Dazu wurde zunächst die ATP-Menge in diesen Mitochondrien verringert. Anschließend wurden die Mitochondrien solubilisiert und das Solubilisat mit Ni-NTA-Matrix inkubiert. Nach Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine eluiert. Weder die isolierte ATPase-Domäne noch die isolierte PBD konnten mit Hep1 interagieren (Abbildung 3.11). Da im Solubilisat der Mitochondrien auch vollständiges mtHsp70 enthalten ist, ist es möglich, dass dieses mit den isolierten Domänen um die Bindung an Hep1 konkurriert. Falls das vollständige mtHsp70 eine sehr viel höhere Affinität gegenüber Hep1 hat als die isolierten Domänen, könnte somit eine schwache Interaktion nicht mehr zu detektieren sein. Deshalb wurde die Interaktion zwischen Hep1 und den Domänen von mtHsp70 zusätzlich mit gereinigten Komponenten untersucht. Auch hier war keine Bindung von Hep1 an eine der Domänen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Hep1 interagiert nur mit vollständigem mtHsp70 und mit diesem nur in seiner nukleotidfreien oder ADP-gebundenen Form.

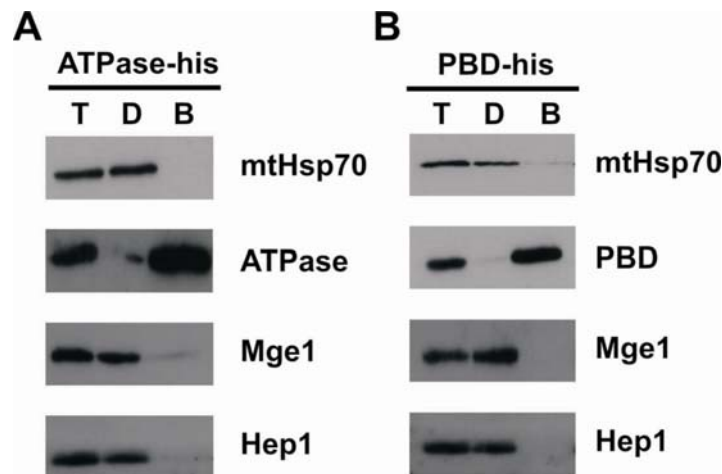


Abbildung 3.11: Weder die isolierte ATPase-Domäne noch die isolierte PBD von mtHsp70 interagieren mit Hep1. **A** Isolierung der Histidin-markierten ATPase-Domäne von mtHsp70. In Mitochondrien, die eine Histidin-markierte Variante der ATPase-Domäne von mtHsp70 exprimieren, wurde die ATP-Menge verringert. Anschließend wurden die Mitochondrien solubilisiert und das Solubilisat mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer mit 300 mM Imidazol eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine untersucht. T, Gesamtprotein; D, Durchfluss; B, gebundenes Protein. **B** Isolierung der Histidin-markierten PBD von mtHsp70. In Mitochondrien, die eine Histidin-markierte Variante der PBD von mtHsp70 exprimieren, wurden wie in **A** behandelt.

3.2.7 Hep1 hat keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70

Die ATP-abhängige Interaktion zwischen Hep1 und mtHsp70 ließ es als möglich erscheinen, dass Hep1, wie viele andere Interaktionspartner von Hsp70-Proteinen, den ATPase-Zyklus der Hsp70-Proteine beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde der Einfluss von Hep1 auf die ATPase-Aktivität und die Austauschrate von Nukleotiden von mtHsp70 *in vitro* untersucht. Der Einfluss von Hep1 auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wurde wie für die J-Proteine des Importmotors beschrieben gemessen. Die Zugabe von Hep1 führte weder zu einer Veränderung der ATPase-Aktivität von mtHsp70 noch zu einer Änderung der Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 oder Tim14 und Mge1 (Abbildung 3.12 A).

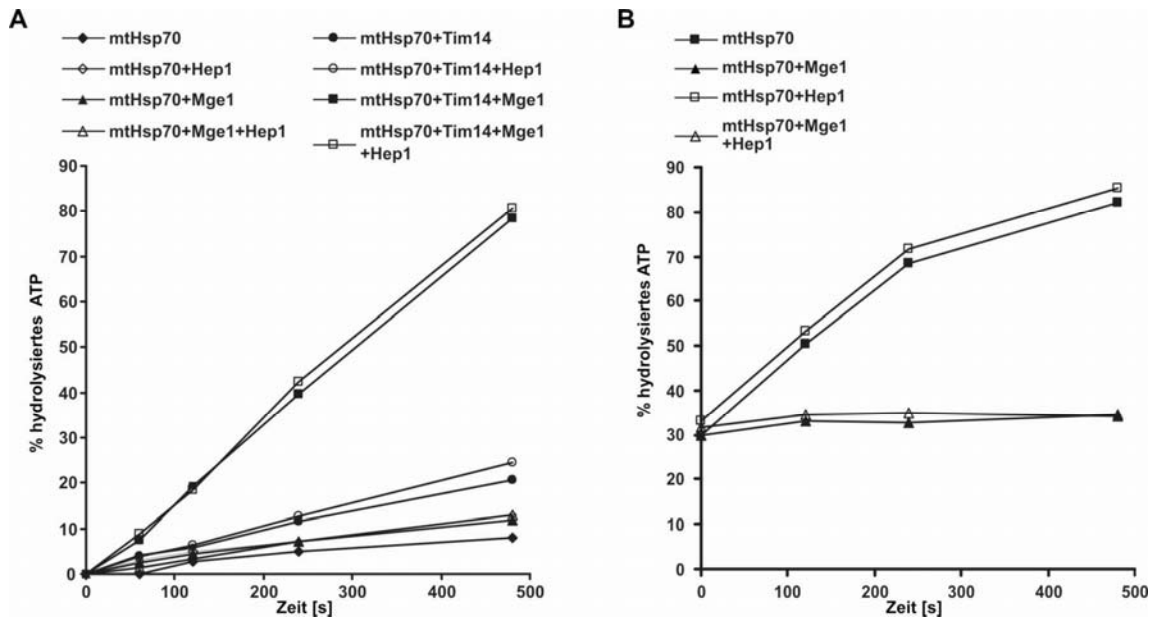


Abbildung 3.12 Einfluss von Hep1 auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70. **A** MtHsp70 wurde in Gegenwart verschiedener Cochaperone und Hep1 mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an hydrolysiertem ATP bestimmt. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 ist als Prozentsatz an hydrolysiertem ATP zum gegebenen Zeitpunkt dargestellt. **B** Nuklotidaustauschfaktor-Assay. Ein Komplex aus ^{32}P -markiertem ATP und mtHsp70 wurde in Gegenwart eines Überschusses an nicht markiertem ATP mit Mge1, Hep1 oder Mge1 und Hep1 inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an hydrolysiertem ATP bestimmt.

Um eine mögliche Funktion von Hep1 beim Nuklotidaustausch zu untersuchen, wurde zunächst ein Komplex aus radioaktiv-markiertem ATP und mtHsp70 gebildet. Dieser Komplex wurde dann in Gegenwart eines Überschusses von nicht markiertem ATP mit Mge1, Hep1 oder Mge1 und Hep1 inkubiert. Wenn die Nukleotidaustauschrate von mtHsp70 nicht stimuliert wird, ist der Austausch von ADP gegen ATP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATPase-Reaktion von mtHsp70. Wird aber der Austausch stimuliert, ohne das gleichzeitig die Hydrolyserate erhöht wird, erweist sich die Hydrolyse von ATP geschwindigkeitsbestimmend. In dem ausgeführten Experiment sollte die Anwesenheit eines Nukleotidaustauschfaktors die Hydrolyserate des markierten ATP reduzieren, da dieses gegen nicht markiertes ATP ausgetauscht wird, ehe es hydrolysiert werden kann. Im Gegensatz zu Mge1, dem bekannten Nukleotidaustauschfaktor von mtHsp70, beeinflusste die Zugabe von Hep1 die Hydrolyse des markierten ATPs nicht (Abbildung 3.12 B). Ebenso hatte Hep1 keinen Einfluss auf die Aktivität von Mge1.

3.2.8 Hefezellen, in denen das *HEP1*-Gen deletiert ist, zeigen einen Temperatur-sensitiven Wachstumsphänotyp

Da Hep1 keinen direkten Einfluss auf den ATPase-Zyklus von mtHsp70 zu haben scheint, wurden *S. cerevisiae*-Zellen untersucht, in denen das *HEP1*-Gen deletiert wurde, um die Funktion von Hep1 bestimmen zu können. Obwohl die Deletion von *HEP1* als letal für Hefezellen beschrieben worden war (Giaever et al., 2002), konnte ein *hep1*-Deletionsstamm ($\Delta hep1$, erhalten von der Euroscarf-Stammsammlung) auf Nährmedienplatten mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPD) wachsen (Abbildung 3.13). Allerdings zeigte der $\Delta hep1$ -Stamm auf fermentierbarem Medium einen deutlich Temperatur-sensitiven Wachstumsphänotyp. Auf nicht fermentierbarem Medium (YPG) konnte kein Wachstum festgestellt werden.

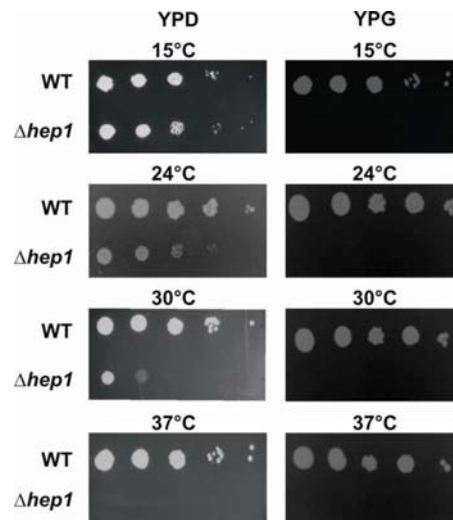


Abbildung 3.13 Zellen, in denen *HEP1* deletiert ist, sind nur eingeschränkt lebensfähig. Serielle 1:10-Verdünnungsreihen von Zellen eines Wildtyp-Stammes (WT) oder eines Stammes, in dem das *HEP1*-Gen deletiert wurde ($\Delta hep1$), wurden auf YPD- und YPG-Platten getüpfelt. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für zwei bis fünf Tage inkubiert.

3.2.9 Mitochondriale Hsp70-Proteine aggregieren in Mitochondrien aus $\Delta hep1$ -Zellen

Da Hep1 mit mtHsp70 interagiert, wurden die $\Delta hep1$ -Zellen zunächst auf Defekte untersucht, die durch die Deletion von anderen mtHsp70-Interaktionspartnern auftreten. So führt zum Beispiel die Deletion von *MDJ1* zur verstärkten Aggregation mitochondrialer Proteine. Der beobachtete Wachstumsphänotyp lässt ein Problem in der Proteinfaltung vermuten, da solche Defekte bei höheren Temperaturen stärker sind als bei niedrigeren Temperaturen.

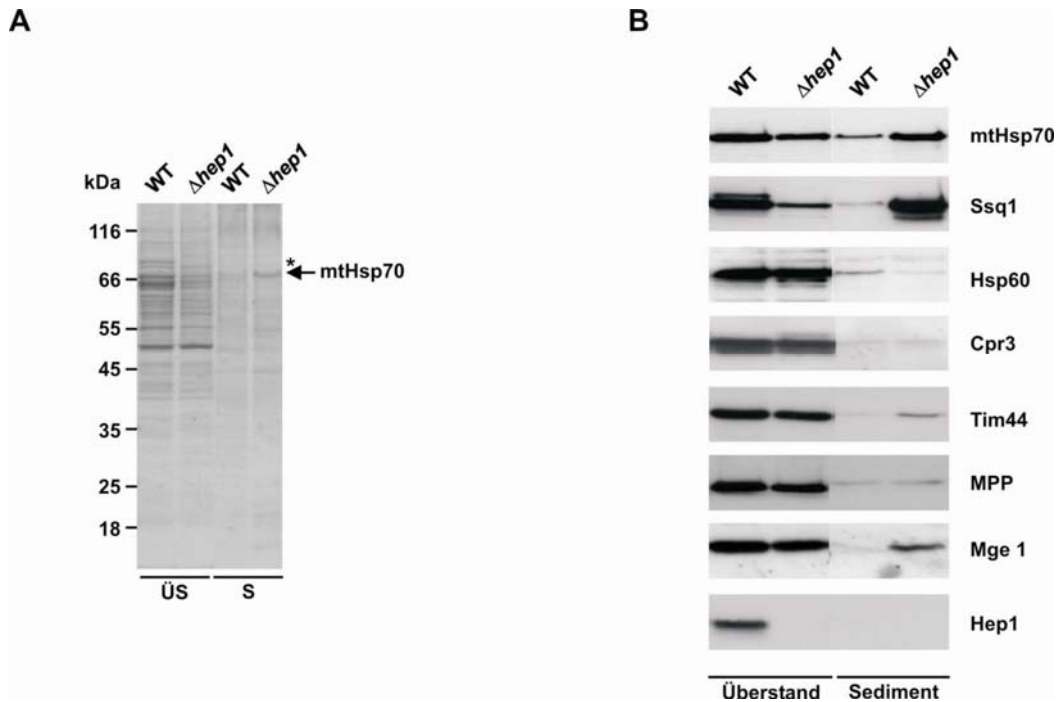


Abbildung 3.14 Die Deletion des *HEP1*-Gens führt zur Aggregation von Hsp70-Proteinen in Mitochondrien. A und B Aggregation von Hsp70-Proteinen in Mitochondrien, denen Hep1 fehlt. Isolierte Mitochondrien eines Wildtypstammes und eines $\Delta hep1$ -Stammes wurden mit 1% Digitonin lysiert. Aggregierte Proteine (Sediment, S) wurden mittels Zentrifugation von löslichen Proteinen (Überstand, ÜS) getrennt. Aus dem Überstand wurden die Proteine mit TCA ausgefällt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung **A** oder Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine **B** analysiert.

Um den Aggregationszustand der Proteine in den Mitochondrien des $\Delta hep1$ -Stammes zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien aus diesem Stamm mit Digitonin solubilisiert. Anschließend wurden die aggregierten Proteine von den löslichen Proteinen durch Zentrifugation getrennt. Zur Kontrolle wurde die Aggregation von Proteinen in Mitochondrien aus einem Wildtypstamm bestimmt. Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen sowohl im Sediment aus den Mitochondrien des Wildtypstammes als auch im Sediment aus den Mitochondrien des $\Delta hep1$ -Stammes einige Proteine gefunden wurden (Abbildung 3.14 A). Dabei handelt es sich um Proteine, die entweder von Digitonin nicht solubilisiert wurden oder aber um Proteine, die unter den gewählten Bedingungen aggregieren. Zusätzlich zu diesem Hintergrund konnte im Sediment aus den Mitochondrien des $\Delta hep1$ -Stammes eine prominente Proteinbande detektiert werden. Mit Hilfe von Massenspektrometrie wurde dieses Protein als mtHsp70 identifiziert.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und um zu untersuchen, ob nur mtHsp70 in den Mitochondrien des $\Delta hep1$ -Stammes zur Aggregation neigt, wurden die Proben zusätzlich mittels Immunoblotting analysiert (Abbildung 3.14 B). Dabei zeigte sich, dass in der Tat etwa die Hälfte des mtHsp70s in den Mitochondrien des $\Delta hep1$ -Stammes aggregiert ist. Eine noch stärkere Aggregation konnte für Ssq1, ein weiteres mitochondriales Hsp70-Protein, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu aggregierten andere Matrixproteine kaum oder gar nicht. Bemerkenswert ist hier besonders, dass Hsp60 und Cyclophilin (Cpr3), zwei andere Chaperone der mitochondrialen Matrix, nicht aggregieren.

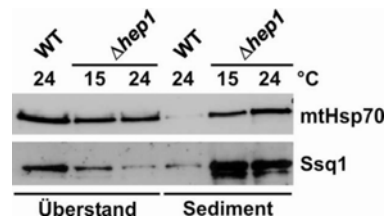


Abbildung 3.15: Die Aggregation von Hsp70-Proteinen in $\Delta hep1$ -Mitochondrien hängt von der Wachstumstemperatur ab. Wiltyp- und $\Delta hep1$ -Zellen wurden bei 15°C und 24°C angezogen. Anschließend wurden die Mitochondrien aus diesen Zellen isoliert und die Löslichkeit von mtHsp70 und Ssq1 mittels SDS-PAGE und Immunoblotting untersucht.

Eine wichtige Folge der Deletion von *HEP1* ist somit die Aggregation mitochondrialer Hsp70-Proteine. Da das Wachstum von $\Delta hep1$ -Zellen bei höheren Temperaturen stärker beeinträchtigt ist als bei niedrigeren Temperaturen, wurde das Aggregationsverhalten der mitochondrialen Hsp70-Proteine in Mitochondrien aus $\Delta hep1$ -Zellen untersucht, die entweder bei 15°C oder bei 24°C angezogen wurden (Abbildung 3.15). In der Tat konnte bei höherer Temperatur eine verstärkte Aggregation sowohl von mtHsp70 als auch von Ssq1 festgestellt werden. Die Menge beider Proteine in der löslichen Fraktion war bei 24°C geringer als bei 15°C. Während die Menge an mtHsp70 im aggregierten Material bei 24°C im Vergleich zu 15°C zunahm, wurde für Ssq1 in der aggregierten Fraktion bei 24°C eine Abnahme der Proteinmenge festgestellt. Diese Abnahme könnte durch erhöhten proteolytischen Abbau von Ssq1 als Folge seiner Fehlfaltung hervorgerufen worden sein.

Da sowohl mtHsp70 als auch Ssq1 in Abwesenheit von Hep1 aggregieren, wurde auch das Aggregationsverhalten von Ssc3, dem dritten Mitglied der Hsp70-Familie in den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, untersucht. Zunächst wurde die Aggregation dieses Proteins in einem Stamm untersucht, der Ssc3 unter der Kontrolle des *SSC1*-Promotors exprimiert, ansonsten aber dem Wildtyphintergrund entspricht, also Hep1 enthält. Dieser Stamm wurde

gewählt, da Ssc3 nicht mit Hep1 interagieren kann (siehe 3.2.3). Etwa die Hälfte des überexprimierten Ssc3 war in diesem Stamm aggregiert (Abbildung 3.16).

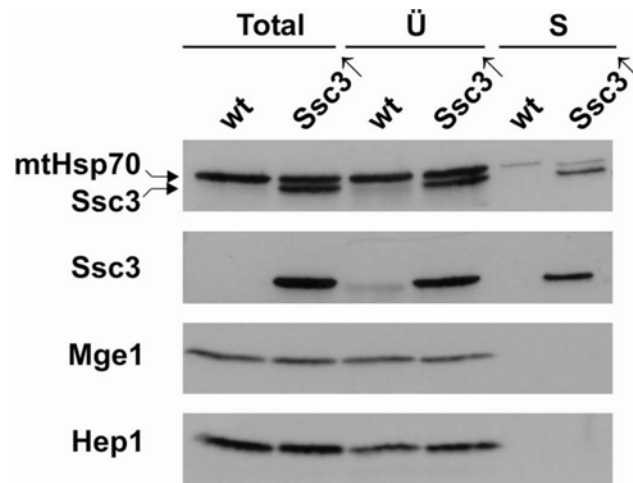


Abbildung 3.16: Ssc3 aggregiert bei Überexpression in Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien eines Wildtypstammes (WT) und eines Wildtypstammes, der mit einem Ssc3-Überexpressionsplasmid transformiert war (Ssc3 \uparrow), wurden mit 1% Digitonin lysiert. Aggregierte Proteinen (Sediment, S) wurden mittels Zentrifugation von löslichen Proteinen (Überstand, ÜS) getrennt. Aus dem Überstand wurden die Proteine mit TCA ausgefällt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine analysiert.

Die Interaktion zwischen Hep1 und mitochondrialen Hsp70-Proteinen ist notwendig, um deren Aggregation zu verhindern. Ist diese Interaktion nicht möglich, da entweder *HEP1* deletiert ist oder falls das Hsp70-Protein nicht mit Hep1 interagieren kann, kommt es während des Wachstums der Zellen *in vivo* zur Aggregation der mitochondrialen Hsp70-Proteine. Dabei scheinen nur die Hsp70-Proteine betroffen zu sein, da keine anderen Proteine in den Aggregaten nachgewiesen wurden. Jedoch lässt sich die Aggregation anderer Proteine nicht ausschließen.

Falls es in $\Delta hep1$ -Mitochondrien zu einer erhöhten Aggregation von Proteinen kommen sollte, könnte mtHsp70 in den Aggregaten gefunden werden, da es an aggregierte Proteine bindet. Um zu unterscheiden, ob mtHsp70 aufgrund eines Faltungsfehlers in mtHsp70 aggregiert oder ob es an aggregierte Proteine gebunden ist, wurde die Konformation von mtHsp70 in $\Delta hep1$ -Mitochondrien untersucht. Hierzu wurde eine limitierte Proteolyse durchgeführt, da fehlgefaltete Proteine meist für proteolytischen Verdau zugänglich sind als Proteine in ihrer nativen Konformation. Mitochondrien aus Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Zellen wurden mit Triton X-100 solubilisiert. Das Solubilisat wurde in zwei Teile aufgeteilt und ein Teil mit Trypsin behandelt. Zu Vergleichszwecken wurde das gleiche Experiment mit

Mitochondrien aus den Temperatur-sensitiven mtHsp70-Mutanten *ssc1-2* und *ssc1-3* durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen war mtHsp70 aus Wildtypmitochondrien gegenüber der Protease stabil, wohingegen mtHsp70 aus $\Delta hep1$ -Mitochondrien eine erhöhte Sensitivität zeigte (Abbildung 3.17). Bei der limitierten Proteolyse konnte in $\Delta hep1$ -Mitochondrien mit einem polyklonalen Antikörper gegen mtHsp70 ein etwa 35 kDa großes Fragment von mtHsp70 detektiert werden. Das gleiche Fragment wurde in *ssc1-3*-Mitochondrien gefunden. In dieser Mutante ist die ATPase-Domäne durch eine Punktmutation destabilisiert. Das Fragment konnte ebenso mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von mtHsp70 dekoriert werden. MtHsp70 zeigt in $\Delta hep1$ -Mitochondrien eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen, wobei die ATPase-Domäne abgebaut wird, wohingegen die PBD stabil zu sein scheint.

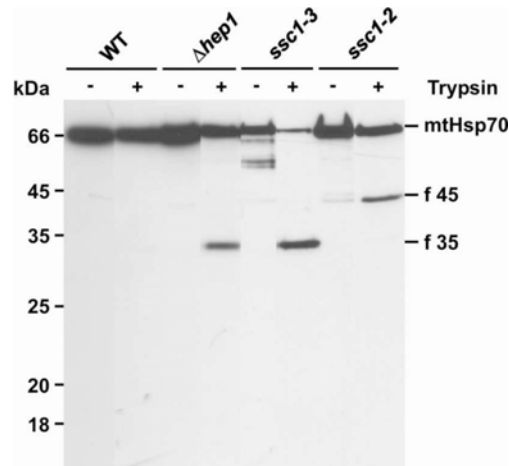


Abbildung 3.17: mtHsp70 zeigt in Abwesenheit von Hep1 eine erhöhte Proteasesensitivität. Isolierte Mitochondrien eines Wildtyp-Stammes, eines $\Delta hep1$ -Stammes oder aus den Temperatur-sensitiven Stämmen *ssc1-2* und *ssc1-3* wurden mit 1% Triton X-100 solubilisiert. Der Extrakt wurde auf Eis für 5 min mit Trypsin behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine analysiert. f 45, N-terminales Fragment; f 35, C-terminales Fragment

3.2.10 Mitochondriale Hsp70-Proteine sind in $\Delta hep1$ -Zellen nicht funktionell

Die Aggregation mitochondrialer Hsp70-Proteine in Abwesenheit von Hep1 wird also durch eine Fehlfaltung der Hsp70-Proteine hervorgerufen. Diese Fehlfaltung kann zu einer Beeinträchtigung der Prozesse in Mitochondrien führen, an denen die Hsp70-Proteine beteiligt sind. Da mtHsp70 die zentrale Komponente des Importmotors der TIM23-Translokase ist, sollte eine Beeinträchtigung der Funktion von mtHsp70 zu einem verringerten Import von TIM23-Substraten führen. Der Import von TIM22-Substraten sollte nicht beeinflusst sein. Zur Untersuchung des Imports wurden Mitochondrien aus Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Zellen mit radioaktiv markierten Präproteinen inkubiert (Abbildung 3.18 A). Es wurde ein verringerter Import der TIM23-Substrate pF₁β (β-Untereinheit der F₁F₀-ATPase) und pJac1 festgestellt. Der Import des TIM22-Substrates ATP/ADP-Carrier (AAC) erfolgte in $\Delta hep1$ -Mitochondrien mit der gleichen Effizienz wie in Wildtypmitochondrien. Die Ergebnisse belegen einen spezifischen Defekt des Imports von TIM23-Substraten in $\Delta hep1$ -Mitochondrien.

Um auszuschließen, dass die Deletion von *HEP1* den Aufbau der TIM23-Translokase stört, wurden Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Sämtliche bekannten Komponenten der TIM23-Translokase wurden in $\Delta hep1$ -Mitochondrien im TIM23-Komplex gefunden (Sichting et al., 2005). Ebenso ist Hep1 nicht Teil der TIM23-Translokase in Wildtypmitochondrien (Sichting et al., 2005). Hep1 scheint die TIM23-Translokase nicht direkt zu beeinflussen. Der beobachtete Importdefekt lässt somit auf eine Funktionsstörung von mtHsp70 schließen.

Zur Untersuchung der Funktion von Ssq1 wurde die Aktivität von Enzymen gemessen, die einen Eisen-Schwefel-Cluster enthalten. Bereits bei der Analyse der mit Coomassie gefärbten SDS-Gele fiel das Fehlen einer Proteinbande mit einer molekularen Masse von etwa 85 kDa sowohl in der löslichen als auch in der nicht löslichen Fraktion der $\Delta hep1$ -Mitochondrien auf (Abbildung 3.14 A, Stern). Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte dieses Protein als Aconitase identifiziert werden. Die verminderte Menge an Aconitase in $\Delta hep1$ -Mitochondrien wurde durch Immunoblotting von $\Delta hep1$ -Mitochondrien mit einem Antikörper gegen Aconitase bestätigt (Abbildung 3.18 B).

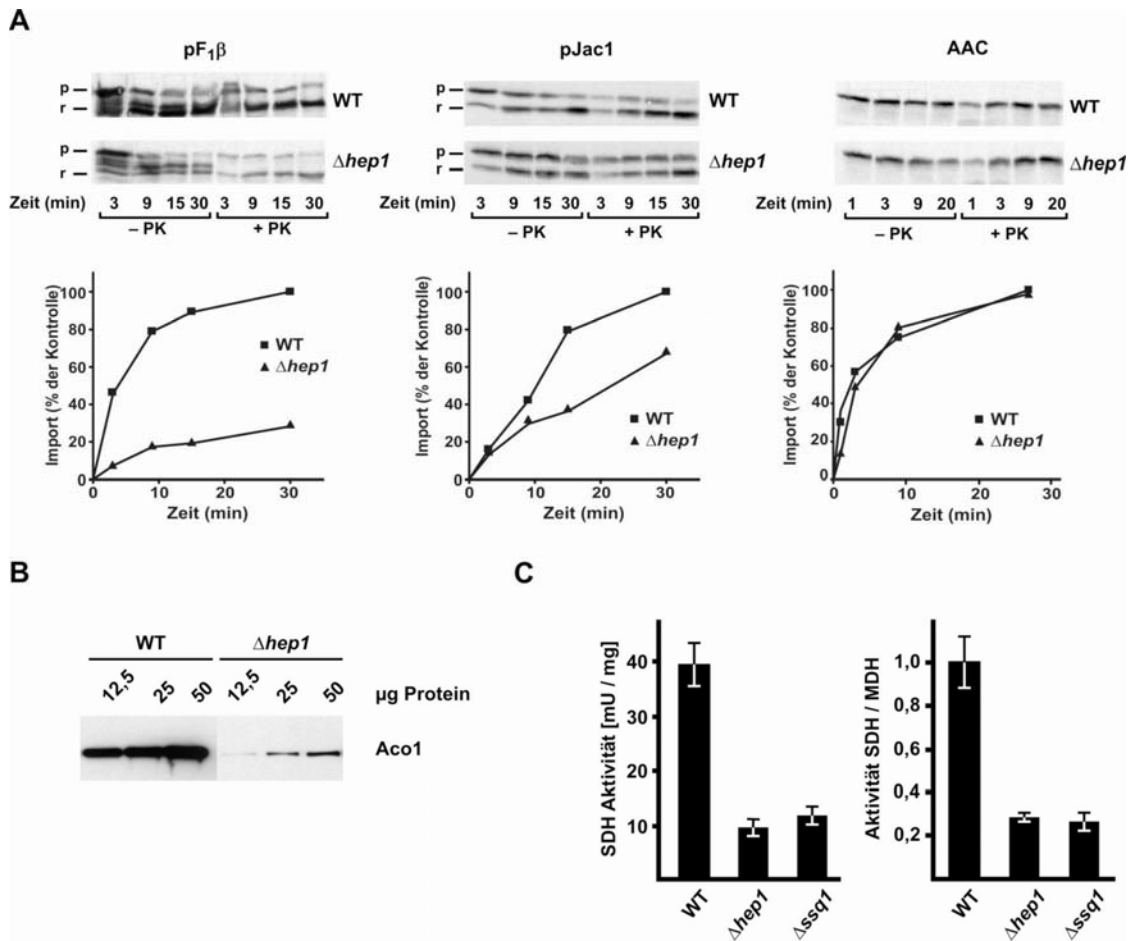


Abbildung 3.18: Die Deletion von *HEP1* führt zu einer Beeinträchtigung des Imports von TIM23-Substraten und der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen. **A** Import in Wildtyp- und *Δhep1*-Mitochondrien. Die TIM23-Substrate pF₁β und pJac1 sowie das TIM22-Substrat AAC wurden mit Mitochondrien aus Wildtyp- und *Δhep1*-Zellen inkubiert. Nach Behandlung mit Proteinase K wurden die Mitochondrien reisoliert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht. Die Banden der reifen Proteine wurden quantifiziert und der Import in Wildtypmitochondrien zu 100% gesetzt. (p, Präprotein; r, reifes Protein). **B** Wildtyp und *Δhep1*-Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen Aconitase (Aco1) untersucht. **C** Die Aktivitäten von Succinat-Dehydrogenase (SDH) und Malat-Dehydrogenase (MDH) wurden in Wildtyp- *Δhep1*- und *Δssq1*-Mitochondrien gemessen. Die SDH-Aktivität ist entweder pro mg Mitochondrien (linke Seite) oder bezogen auf die MDH-Aktivität angegeben. Dabei wurde die in Wildtypmitochondrien erhaltene Aktivität als 1 gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten an.

Da Aconitase einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält, lassen diese Daten auf einen Defekt in der Biogenese solcher Proteine in *Δhep1*-Mitochondrien schliessen. Auch die Aktivität von Succinat-Dehydrogenase (SDH), einem weiteren Protein mit einem Eisen-Schwefel-Cluster in der mitochondrialen Matrix, war deutlich reduziert (Abbildung 3.18 C). Zur Kontrolle wurde die Aktivität von Malat-Dehydrogenase (MDH) gemessen. Dieses Enzym enthält keinen

Eisen-Schwefel-Cluster. Demzufolge sollte seine Aktivität durch einen Defekt von Ssq1 nicht betroffen sein. Die Messung der MDH-Aktivität ermöglicht eine genaue Bestimmung der Menge an eingesetzten Mitochondrien und somit die Normierung der SDH-Aktivität. Auch die so normierten SDH-Aktivitäten sind in $\Delta hep1$ -Mitochondrien stark verringert.

Die Deletion von *HEP1* führt also zur Fehlfaltung und somit zur Selbstaggregation der mitochondrialen Hsp70-Proteine. Diese Aggregation ist mit einem Verlust der Funktionalität der Hsp70-Proteine verbunden, was Defekte im Proteinimport in Mitochondrien und in der Synthese von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern zur Folge hat.

3.2.11 Hep1 ist ausreichend, um die Aggregation von mtHsp70 zu verhindern und es in einem funktionellen Zustand zu halten

Reicht Hep1 aus, um die Selbstaggregation von mtHsp70 zu verhindern? Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Reihe von Experimenten mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob mtHsp70 *in vitro* Oligomere bildet. Dazu wurde das gereinigte, nukleotidfreie mtHsp70 für 10 min bei 30°C inkubiert und dann mit Glutaraldehyd quervernetzt. Unter diesen Bedingungen ist eine starke Tendenz zur Oligomerisierung von mtHsp70 zu beobachten (Abbildung 3.19 A). An der verschmierten Bande des Monomers ist außerdem zu erkennen, dass die nukleotidfreie Form von mtHsp70 keine stabile Konformation einnimmt. Die unscharfe Bande wurde durch die Modifikation der Lysinseitenketten durch das zur Quervernetzung eingesetzte Glutaraldehyd verursacht. Im nukleotidfreien mtHsp70 scheint das Glutaraldehyd Zugang zu vielen Lysinen zu haben, da sich das Laufverhalten von mtHsp70 nach der Quervernetzung stark von dem des nicht modifizierten mtHsp70 unterschied. Durch Zugabe von ADP oder ATP vor der Quervernetzung änderte sich sowohl die Faltung als auch das Oligomerisierungsverhalten von mtHsp70. So konnte nach der Zugabe der beiden Nukleotide eine starke Bande auf Höhe des Monomers von mtHsp70 erkannt werden. Das zeigt eine kompaktere Faltung von mtHsp70 an, da das Glutaraldehyd nun nicht mehr alle Lysinseitenketten modifizieren kann. Zusätzlich ließen sich spezifische interne Quervernetzungsprodukte erkennen. Auch die Menge an oligomerisiertem mtHsp70 war stark reduziert. So lassen sich bei Zugabe von ADP noch Dimere und Trimere detektieren, jedoch kaum noch höhere Oligomere. Noch stärker war der Einfluß von ATP. Nach Inkubation mit ATP konnten keine Oligomere von mtHsp70 detektiert werden.

Hep1 verhindert die Oligomerisierung von nukleotidfreiem mtHsp70. Wenn mtHsp70 vor der Quervernetzung mit Hep1 inkubiert wurde, wurde fast ausschließlich monomeres mtHsp70

und keine höheren Oligomere gefunden. Der Mechanismus, mit dem Hep1 die Oligomerisierung von mtHsp70 verhindert, scheint sich vom Mechanismus der Nukleotidbindung zu unterscheiden. So sind die Lysinseitenketten des monomeren mtHsp70 nach Inkubation mit Hep1 für das Glutaraldehyd immer noch stark zugänglich, wie die unscharfe Bande des Monomers zeigte. Allerdings erschien die Bande des Monomers etwas höher als die von mtHsp70, das nicht mit Hep1 behandelt wurde. Mittels Immunoblotting wurde gezeigt, dass diese Veränderung des Laufverhaltens durch Quervernetzung von mtHsp70 und Hep1 hervorgerufen wurde (Daten nicht gezeigt). Wenn Nukleotide zugegeben wurden, konnte kein zusätzlicher Effekt von Hep1 beobachtet werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde mtHsp70 zunächst durch Inkubation für 10 min bei 30°C oligomerisiert, bevor ATP, ADP oder Hep1 zugegeben wurden. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 30°C erfolgte die Quervernetzung mit Glutaraldehyd. Unter den gewählten Bedingungen konnte keiner der zugegebenen Effektoren die Oligomere von mtHsp70 auflösen (Abbildung 3.19 B). Das gleiche Ergebnis wurde nach vierstündiger Inkubation von oligomerisiertem mtHsp70 mit den verschiedenen Effektoren erzielt (Daten nicht gezeigt).

Hep1 und ATP können also auf unterschiedliche Weise die Aggregation von mtHsp70 verhindern. Sie sind jedoch nicht in der Lage bereits oligomerisiertes mtHsp70 wieder in monomeres mtHsp70 zu überführen.

Zur Überprüfung der Spezifität von Hep1 wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss eines ungefalteten Proteins (reduziertes und carboxymethyliertes Lactalbumin, RCMLA) und eines gefalteten Proteins von vergleichbarer Größe und vergleichbarem pI (Lysozym) auf die Oligomerisierung von mtHsp70 untersucht (Abbildung 3.19 C). Weder RCMLA noch Lysozym verhinderten die Oligomerisierung von mtHsp70. Ebenso wurde getestet, ob Hep1 die Oligomerisierung nicht mitochondrialer Hsp70-Proteine unterdrücken kann (Abbildung 3.19 D). BiP, ein Hsp70-Protein aus dem ER, zeigte ein vergleichbares Oligomerisierungsverhalten wie mtHsp70. Wie auch für mtHsp70 beobachtet, verhinderte ATP die Oligomerisierung. Jedoch hatte Hep1 keinen Einfluss auf die Oligomerisierung von BiP. DnaK, das häufigste Hsp70-Protein in *E. coli*, zeigte eine geringe Tendenz zur Oligomerisierung. So konnten unter den gewählten Bedingungen zwar Dimere detektiert werden, der Großteil des Proteins befand sich allerdings in der monomeren Form. Dieses Monomer scheint außerdem eine stabile Konformation zu haben, da die Modifikation durch Glutaraldehyd nicht zu einer unscharfen Bande führte. In Gegenwart von ATP konnte nur noch monomeres DnaK beobachtet werden. Hep1 hatte keinen Einfluss auf die Dimerbildung von DnaK.

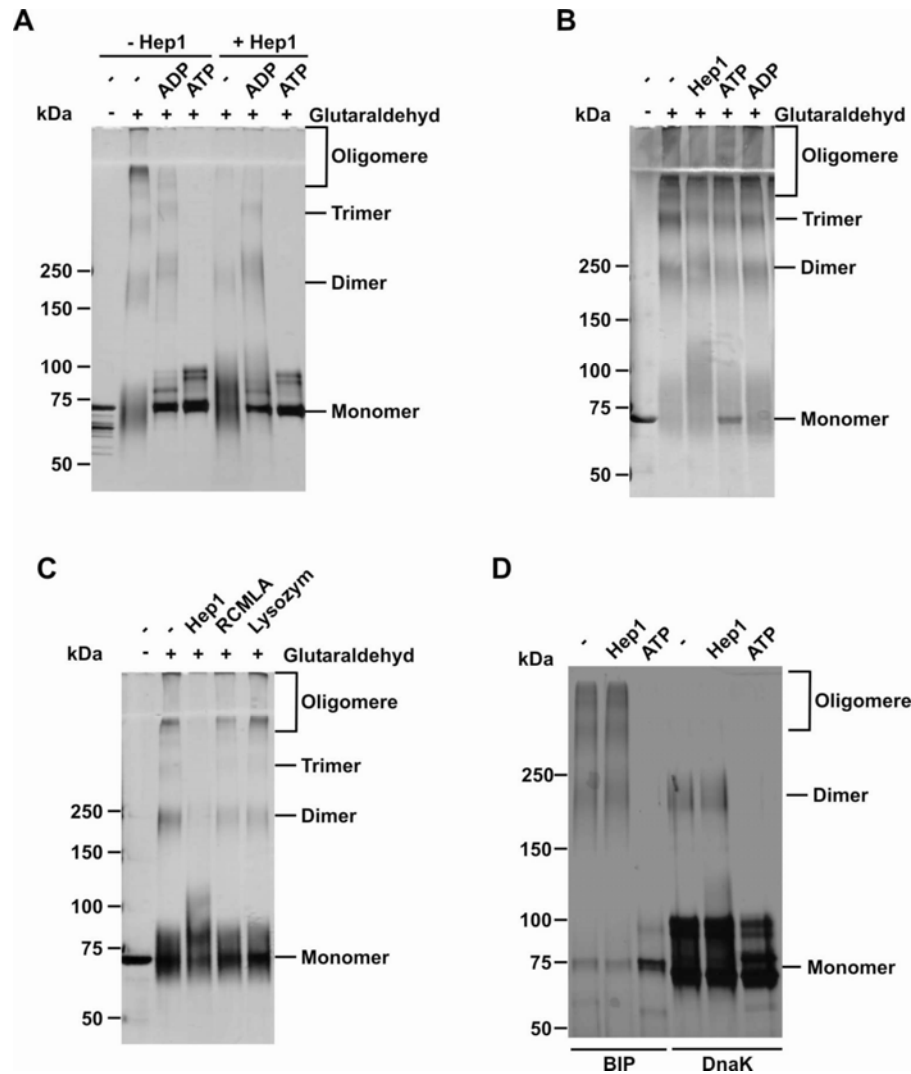


Abbildung 3.19: Hep1 ist ausreichend um die Aggregation von mtHsp70 zu verhindern. **A** MtHsp70 wurde für 10 min alleine oder in Gegenwart der angegebenen Nukleotide oder Hep1 inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem SDS-Gradientengel und Silberfärbung. **B** Die Selbstaggregation von mtHsp70 ist irreversibel. Zunächst wurde mtHsp70 für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Effektoren zugegeben und für weitere 10 min bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Proben wie in **A** weiterbehandelt. **C und D** Die Verhinderung der Selbstaggregation von mtHsp70 ist eine spezifische Funktion von Hep1. **C** MtHsp70 wurde für 10 min alleine oder in Gegenwart der von Hep1, RCMLA oder Lysozym inkubiert. Die Proben wurden wie in **A** weiterbehandelt. **D** BiP und DnaK wurden, wie für mtHsp70 in **A** beschrieben, untersucht.

Aus diesen Experimenten lässt sich folgern, dass mtHsp70 in seiner nukleotidfreien Form eine starke Tendenz zur Oligomerisierung hat. Hep1 verhindert diese Oligomerisierung durch Bindung an mtHsp70. Die Unterdrückung der Oligomerisierung ist eine spezifische Funktion von Hep1. Hep1 kann nur die Oligomerisierung mitochondrialer Hsp70-Proteine verhindern.

Schließlich wurde die ATPase-Aktivität der mtHsp70-Oligomere bestimmt. Dazu wurde mtHsp70 zunächst alleine oder in Gegenwart von Hep1 bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität der so behandelten Proben gemessen und mit der Aktivität von unbehandeltem mtHsp70 verglichen (Abbildung 3.20). Wenn mtHsp70 ohne Hep1 bei 30°C inkubiert wurde, konnten nach dieser Inkubation nur noch etwa 20% der Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu war kein Unterschied zwischen der Aktivität von unbehandeltem mtHsp70 und mtHsp70, das zusammen mit Hep1 bei 30°C vorinkubiert wurde, zu beobachten. Oligomerisiertes mtHsp70 ist also nicht funktionell. Hep1 verhindert die Oligomerisierung von mtHsp70 und hält mtHsp70 somit im funktionellen Zustand.

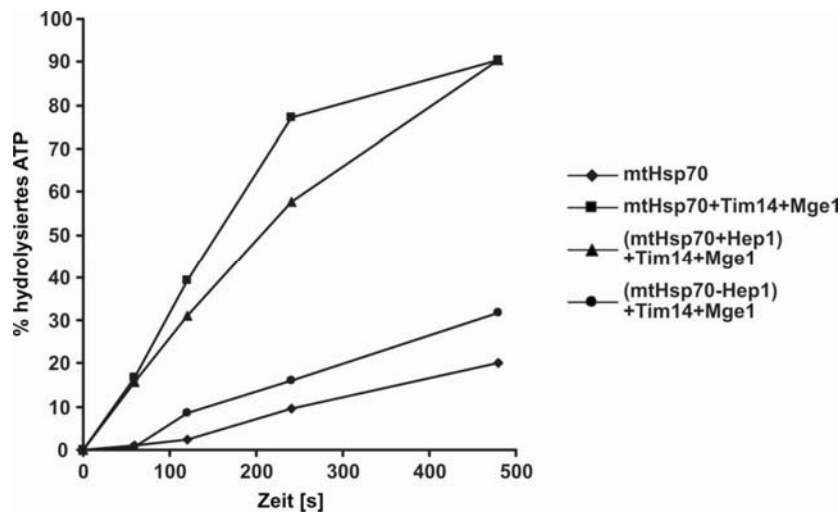


Abbildung 3.20: Hep1 hält mtHsp70 im funktionellen Zustand. MtHsp70 wurde für 30 min mit Hep1 (mtHsp70+Hep1) oder ohne Hep1 (mtHsp70-Hep1) bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität von mtHsp70 in Gegenwart von Tim14 und Mge1 in den Proben wie in Abbildung 3.12 beschrieben untersucht. Zum Vergleich wurde die ATPase-Aktivität von nicht behandeltem mtHsp70 bestimmt.

3.2.12 Hep1 verhindert die Aggregation von mtHsp70 in *E. coli*

Da sich die Bedingungen des in 3.2.11 verwendeten rekonstituierten Systems von *in vivo* Bedingungen unterscheiden, wurde die Funktion von Hep1 auch in einer lebenden Zelle untersucht. Dazu wurden *E. coli*-Zellen mit Plasmiden transformiert, die entweder die kodierende Sequenz des reifen mtHsp70s alleine oder diese Sequenz zusammen mit der für ein reifes Hep1 mit Histidin-Anhang kodierenden Sequenz enthielten. Nach Expression der Proteine wurde die Löslichkeit von mtHsp70 und Hep1 in Gesamtzelllysaten untersucht (Abbildung 3.21 A). Wurde mtHsp70 alleine exprimiert, wurde es nur in der unlöslichen Fraktion gefunden. Im Gegensatz dazu war es komplett löslich, wenn zusätzlich Hep1 in den *E. coli*-Zellen exprimiert wurde.

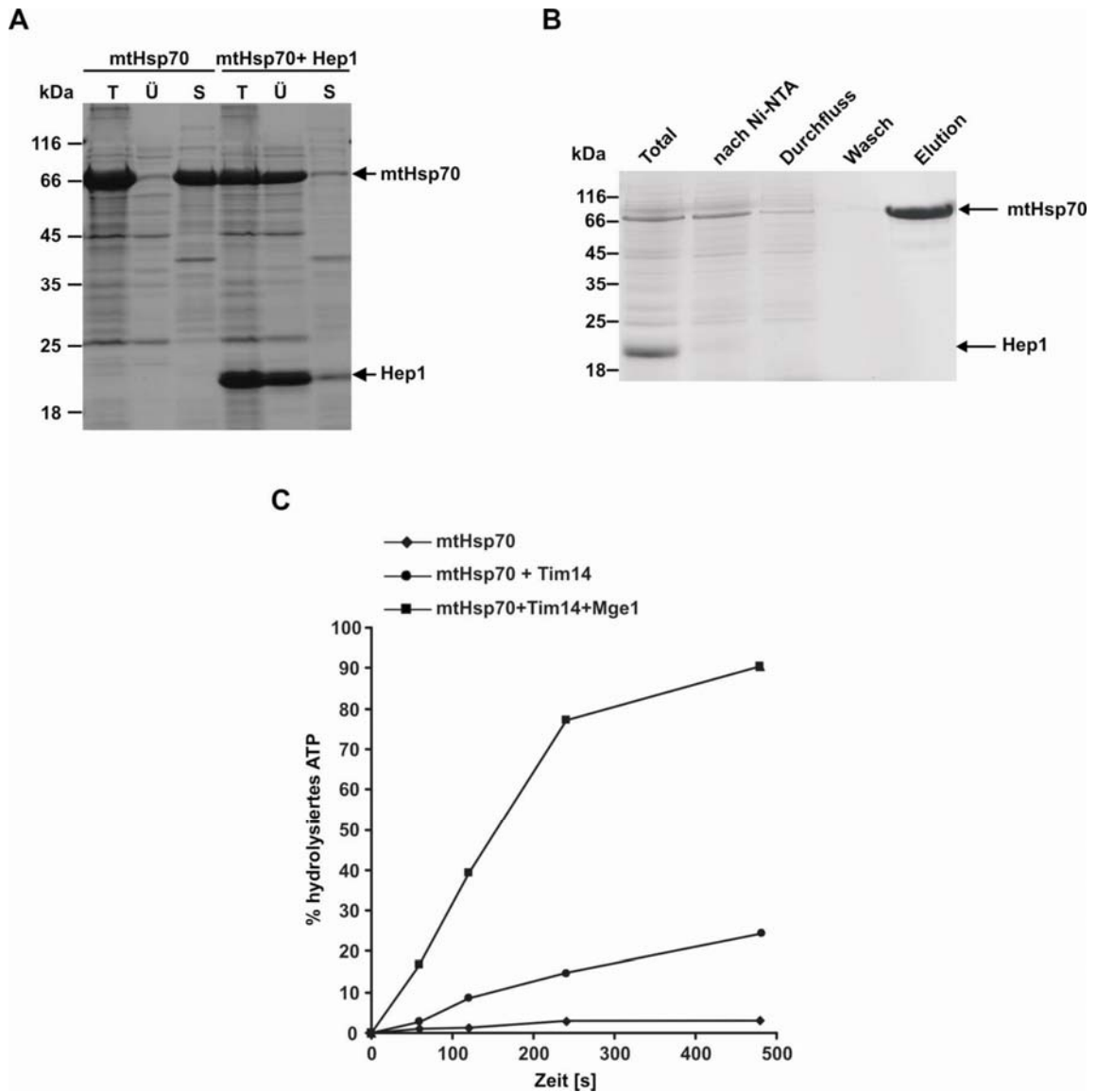


Abbildung 3.21: Hep1 verhindert die Aggregation von mtHsp70 in *E. coli*-Zellen. **A** Reifes mtHsp70 wurde entweder allein oder zusammen mit reifem Hep1 mit Histidin-Anhang in *E. coli*-Zellen exprimiert. Nach der Induktion der Expression wurden die Zellen aufgeschossen und in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde direkt mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht (total, T). Im anderen Teil wurden lösliche Proteine (Überstand, Ü) von unlöslichen Proteinen (Sediment, S) durch Zentrifugation getrennt und anschließend mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. **B** Reinigung von mtHsp70 aus *E. coli* mit Hilfe einer Mge1-Affinitätssäule. Nach Induktion der Expression wurden die Zellen aufgeschossen. Das Lysat (Total) wurde zunächst über eine Ni-NTA-Säule gegeben, um Hep1 zu entfernen (nach Ni-NTA). Anschließend wurde das Lysat über eine Mge1-Affinitätssäule gegeben. Proben aus dem Durchfluss, dem Waschschrift (Wasch) und der Elution wurden zusammen mit Proben der beiden vorangegangenen Schritte mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht. **C** Die ATPase-Aktivität von dem aus *E. coli* gereinigten mtHsp70 wurde wie in Abbildung 3.2 beschrieben untersucht.

Um die Funktionalität dieses löslichen mtHsp70s zu bestimmen, wurde es mit Hilfe einer Mge1-Affinitätssäule gereinigt (Abbildung 3.21 B). Das Prinzip dieser Reinigung beruht auf der ATP-abhängigen Interaktion zwischen mtHsp70 und seinem Nukleotidaustauschfaktor Mge1. In Abwesenheit von ATP bindet mtHsp70 stabil an Mge1. Diese Bindung kann aber durch Zugabe von ATP gelöst werden (Horst et al., 1997). Mit diesem Reinigungsverfahren konnte mtHsp70 aus *E. coli* mit einer Reinheit von über 95% gewonnen werden.

Anschließend wurde die Stimulation der ATPase-Aktivität des isolierten Proteins durch Tim14 untersucht (Abbildung 3.21 C). Wie bei dem aus *S. cerevisiae* gereinigtem mtHsp70 konnte eine etwa 5fache höhere ATPase-Aktivität in Gegenwart von Tim14 gemessen werden (vgl. Abbildung 3.2 A). Diese Stimulation wurde auf das 25fache gesteigert, wenn neben Tim14 auch Mge1 zugegeben wurde.

Hep1 verhindert somit die Aggregation von mtHsp70 auch in einer bakteriellen Zelle und hält es im funktionellen Zustand.

3.2.13 Nur vollständiges mtHsp70 hat die Tendenz zu aggregieren

Verursacht in Abwesenheit von Hep1 eine einzelne Domäne die Aggregation von mtHsp70 oder hat nur das gesamte Protein die Tendenz zur Aggregation? Um diese Frage zu beantworten, wurden die beiden Domänen von mtHsp70 in $\Delta hep1$ -Mitochondrien exprimiert. Nach Solubilisierung dieser Mitochondrien wurden die löslichen von den aggregierten Proteinen getrennt. Zur Kontrolle wurde das Experiment auch mit Mitochondrien aus Hefestämmen durchgeführt, die entweder mit dem leeren Vektor transformiert waren oder vollständiges mtHsp70 zusätzlich von diesem Vektor exprimierten. Weder die ATPase-Domäne noch die PBD wurden im aggregierten Material gefunden (Abbildung 3.22). Nur vollständiges mtHsp70 hat die Tendenz in $\Delta hep1$ -Mitochondrien zu aggregieren.

Weitere Evidenz für diesen Befund wurde aus der Untersuchung des Aggregationsverhaltens von chimären Proteinen erhalten, in denen Maus-Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) entweder an den C-Terminus der ATPase-Domäne oder an den N-Terminus der PBD fusioniert wurde. Die erhaltenen Chimären ähneln somit der Domänenstruktur in mtHsp70. Wenn also eine Extension der Domänen mit einer weiteren gefalteten Domäne zur Aggregation führt, sollten diese Chimären in $\Delta hep1$ -Mitochondrien nach deren Solubilisierung im Sediment der Zentrifugation zu finden sein. Jedoch waren beide Konstrukte vollständig löslich (Abbildung 3.23).

Diese Daten lassen vermuten, dass die Aggregation von mtHsp70 in Abwesenheit von Hep1 die Folge einer Konformationsänderung ist, die nur im vollständigen mtHsp70 erfolgt.

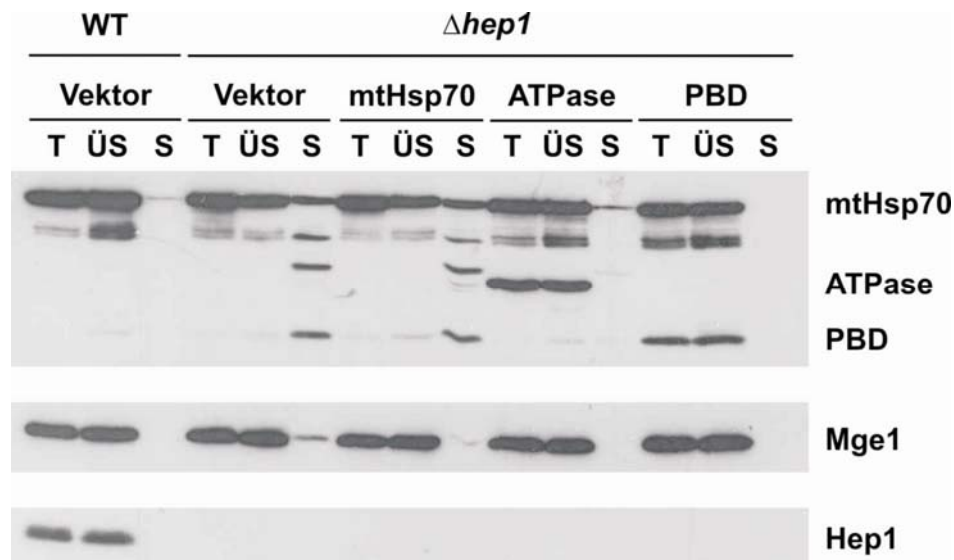


Abbildung 3.22: Nur vollständiges mtHsp70 aggregiert in $\Delta hep1$ -Mitochondrien. $\Delta hep1$ -Mitochondrien, in denen entweder die ATPase-Domäne oder die PBD von mtHsp70 exprimiert wurde, wurden mit Triton X-100 solubilisiert. Eine Hälfte der Probe wurde gleich mittels SDS-PAGE und Immunoblotting untersucht (T, Total), die andere Hälfte wurde zentrifugiert. Die Überstände (ÜS) und Sedimente (S) dieser Zentrifugation wurden wie die Total-Proben analysiert. Zum Vergleich wurde das Experiment auch mit $\Delta hep1$ -Mitochondrien, in denen vollständiges mtHsp70 exprimiert wurde, sowie mit $\Delta hep1$ -Mitochondrien und Wildtypmitochondrien durchgeführt.

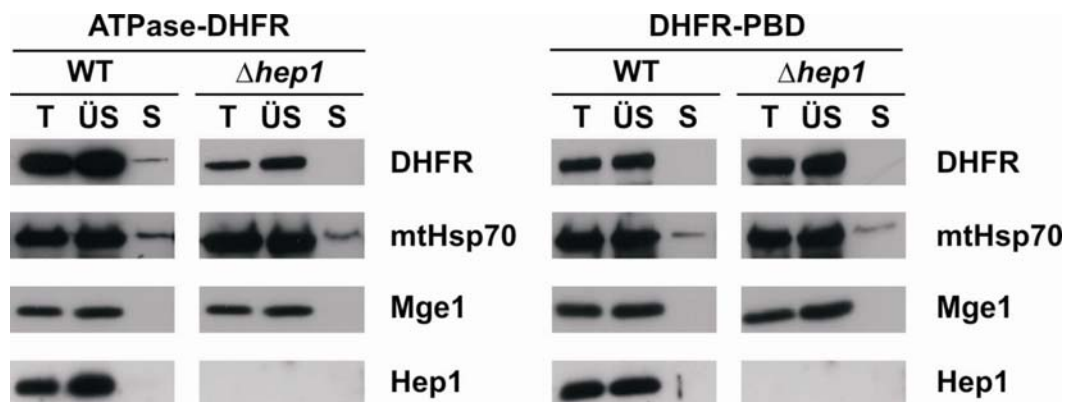


Abbildung 3.23: Weder eine ATPase-DHFR-Chimäre noch eine DHFR-PBD-Chimäre aggregieren in Abwesenheit von Hep1. Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Mitochondrien, in denen entweder eine Chimäre aus der ATPase-Domäne von mtHsp70 und DHFR oder eine Chimäre aus DHFR und der PBD von mtHsp70 exprimiert wurde, wurden wie in Abbildung 3.22 behandelt und analysiert.

3.2.14 DnaK ist ein lösliches Protein in Mitochondrien von $\Delta hep1$ -Zellen

Bereits die *in vitro*-Experimente zur Oligomerisierung von mtHsp70 zeigten, dass dieses Protein in seiner nukleotidfreien Form eine starke Tendenz zur Aggregation hat. Im Gegensatz dazu scheint DnaK, der nächste nicht mitochondriale Verwandte von mtHsp70, keine Oligomere zu bilden (Abbildung 3.19). Die *in vivo*-Situation unterscheidet sich aber von den Bedingungen dieser Experimente. Zum einen werden Proteine beim Import in die Mitochondrien entfaltet und müssen nach dem Import wieder gefaltet werden, zum anderen herrschen in der mitochondrialen Matrix andere Bedingungen als im Reaktionsgefäß. Um auszuschließen, dass diese Unterschiede die Löslichkeit von Hsp70-Proteinen in Mitochondrien beeinflussen, wurde DnaK mit einem C-terminalen Histidinanhang in $\Delta hep1$ -Mitochondrien exprimiert und seine Löslichkeit in diesen Mitochondrien untersucht. Der Histidinanhang ermöglichte die spezifische Detektion von DnaK. DnaK war sowohl in Wildtypmitochondrien als auch in $\Delta hep1$ -Mitochondrien löslich (Abbildung 3.24).

Die Aggregation von mtHsp70 in $\Delta hep1$ -Mitochondrien wird also weder durch die Translokation dieses Proteins in die Mitochondrien noch durch die Bedingungen in der mitochondrialen Matrix verursacht. Vielmehr scheint sie eine spezifische Eigenschaft des Proteins zu sein.

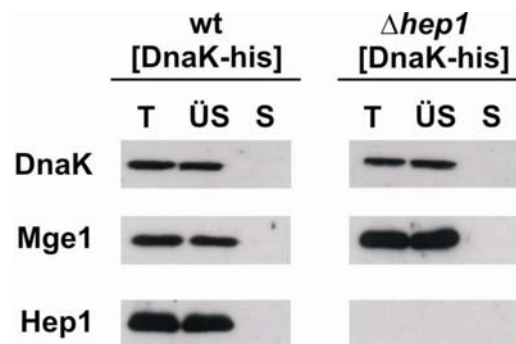


Abbildung 3.24: DnaK ist in $\Delta hep1$ -Mitochondrien löslich. Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Mitochondrien, in denen DnaK exprimiert wurde, wurden wie in Abbildung 3.22 behandelt und analysiert.

3.2.15 Durch Austauschen eines kurzen Abschnitts von mtHsp70 gegen den entsprechenden Bereich von DnaK entsteht ein lösliches Hsp70-Protein

Obwohl sich DnaK und mtHsp70 auf der Ebene der Primärsequenz sehr ähnlich sind, hat mtHsp70 im Gegensatz zu DnaK eine Tendenz zur Aggregation. Was unterscheidet diese beiden Proteine? Beim Vergleich der Sequenzen mitochondrialer Hsp70-Proteine aus

verschiedenen Spezies mit DnaK aus *E. coli* konnte ein Bereich in der ATPase-Domäne identifiziert werden, in dem DnaK einen Einschub von vier Aminosäuren hat (Abbildung 3.25). Auch die diesen Einschub flankierenden Aminosäuren in DnaK unterscheiden sich von denen der mitochondrialen Hsp70-Proteine.

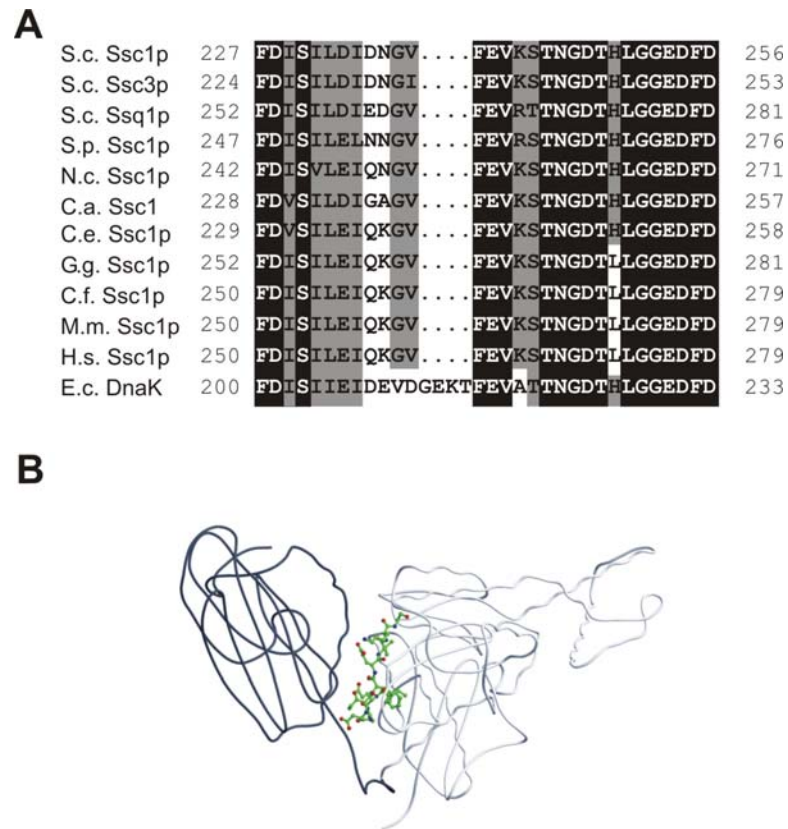


Abbildung 3.25: DnaK unterscheidet sich in einem Sequenzabschnitt der ATPase-Domäne von mitochondrialen Hsp70-Proteinen. **A** Sequenzvergleich der mitochondrialen Hsp70-Proteine aus *S. cerevisiae* (S.c.), *S. pombe* (S.p.), *N. crassa* (N.c.), *C. albicans* (C.a.), *C. elegans* (C.e.), *G. gallus* (G.g.), *C. familiaris* (C.f.), *M. musculus* (M.m.), *H. sapiens* (H.s.) und DnaK aus *E. coli* (E.c.). **B** Kristallstruktur von Hsc70 aus *Bos taurus* (bHsc70). Die Region in der sich DnaK von den mitochondrialen Hsp70-Proteinen unterscheidet ist durch Einfügen der Seitenketten der Polypeptidkette gekennzeichnet.

Dieser Bereich ist deshalb von besonderem Interesse, da er an der Interaktion zwischen der ATPase-Domäne und der PBD beteiligt zu sein scheint. In der Kristallstruktur von bHsc70, einem Hsp70-Protein im Cytosol von Rinderzellen, interagieren diese Aminosäuren der ATPase-Domäne mit Aminosäuren der PBD (Jiang et al., 2005). Vermutlich ist dieser Bereich der ATPase-Domäne für die Interdomänenkommunikation zwischen der ATPase-Domäne und der PBD wichtig. Da die Interdomänenkommunikation in mtHsp70 eine

Voraussetzung für die Aggregation von mtHsp70 zu sein scheint, könnte dieser Einschub DnaK stabilisieren und somit die Aggregation von DnaK in Abwesenheit von Hep1 verhindern. Deshalb wurde der Einschub zusammen mit den flankierenden Aminosäuren in mtHsp70 eingefügt. Die erhaltene Mutante wurde SscK_{ins} genannt (Ssc1 mit einer Insertion aus DnaK).

Um zu überprüfen, ob diese Veränderung von mtHsp70 zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins in Abwesenheit von Hep1 führt, wurde SscK_{ins} unter der Kontrolle des *SSC1*-Promotors in Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Zellen exprimiert. Um SscK_{ins} spezifisch detektieren zu können, wurde ein Histidinanhang an den C-Terminus von SscK_{ins} fusioniert. Die Löslichkeit dieses Proteins in Mitochondrien wurde wie oben beschrieben untersucht. SscK_{ins} war sowohl in Wildtyp- als auch in $\Delta hep1$ -Mitochondrien löslich (Abbildung 3.26 A).

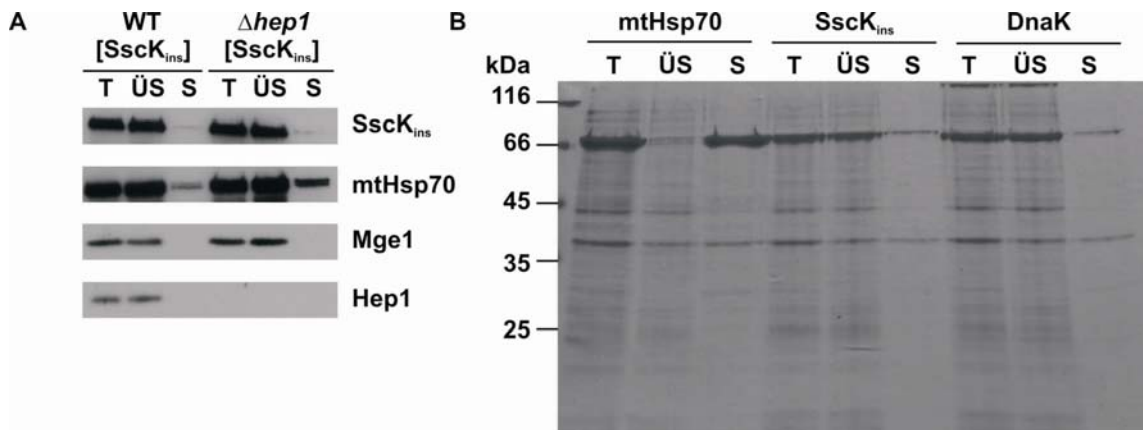


Abbildung 3.26: SscK_{ins} ist in Abwesenheit von Hep1 löslich. **A** Mitochondrien aus Wildtyp- und $\Delta hep1$ -Zellen, die SscK_{ins} exprimieren, wurden mit Triton X-100 solubilisiert. Eine Hälfte der Probe wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine untersucht (T, Total), die andere Hälfte wurde zentrifugiert. Die Überstände (ÜS) und Sedimente (S) dieser Zentrifugation wurden wie die Total-Proben analysiert. **B** MtHsp70, SscK_{ins} und DnaK wurden in *E. coli*-Zellen exprimiert. Nach der Induktion der Expression wurden die Zellen aufgeschlossen und geteilt. Ein Teil wurde direkt mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht (total, T). Im anderen Teil wurden lösliche Proteine (Überstand, Ü) von unlöslichen Proteinen (Sediment, S) durch Zentrifugation getrennt und anschließend mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung untersucht.

Auch in *E. coli*-Zellen hängt die Löslichkeit von mtHsp70 von Hep1 ab. Zur Analyse der Löslichkeit von SscK_{ins} in diesem System wurde SscK_{ins} in *E. coli*-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurden mtHsp70 und DnaK exprimiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und das lösliche Material vom aggregierten Material durch Zentrifugation

getrennt. Im Gegensatz zu mtHsp70 wurde der Großteil von SscK_{ins} in der löslichen Fraktion gefunden (Abbildung 3.26 B).

Durch das Einfügen der zusätzlichen vier Aminosäuren aus DnaK erhöht sich die Löslichkeit von mtHsp70. Darüber hinaus scheint das chimäre Protein SscK_{ins} im Gegensatz zu mtHsp70 in Abwesenheit von Hep1 löslich zu sein.

3.2.16 SscK_{ins} kann die Deletion von SSC1 teilweise komplementieren

Da durch die veränderte Sequenz von SscK_{ins} die Funktion des Proteins beeinträchtigt worden sein könnte, wurde nun untersucht, ob SscK_{ins} ein funktionelles Hsp70-Protein ist. Dazu wurde die Komplementation einer *ssc1*-Deletion durch SscK_{ins} getestet. Ein Plasmid, das für eine Variante von SscK_{ins} mit C-terminalen Histidin-Anhang unter der Kontrolle des SSC1-Promotors kodiert, wurde in einen Hefestamm transformiert, dessen chromosomale Kopie des *SSC1*-Gens deletiert war. Dieser Stamm enthielt außerdem ein Plasmid, das für mtHsp70 kodiert und über einen *URA3*-Marker verfügt. Durch Selektion auf 5-Fluor-Orotsäure-haltigen Platten konnte ein Stamm erhalten werden, der an Stelle von mtHsp70 nur noch SscK_{ins} exprimiert. Das Wachstum dieses Stammes wurde mit dem Wachstum des Ausgangsstammes verglichen. Hefezellen, die an Stelle von mtHsp70 SscK_{ins} exprimieren, zeigten einen Temperatur-sensitiven Phänotyp auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Abbildung 3.27). Sie sind nicht in der Lage, auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. SscK_{ins} kann demnach die Funktion von mtHsp70 übernehmen, jedoch nicht vollständig.

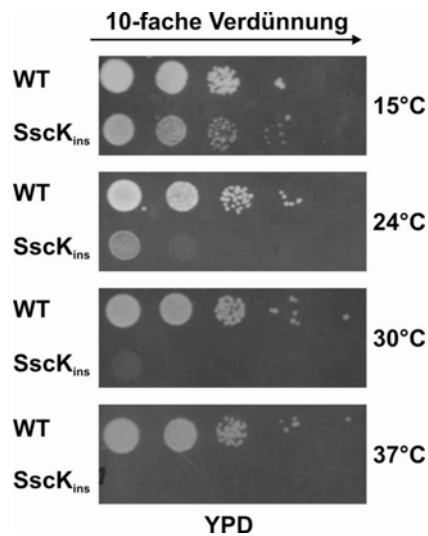


Abbildung 3.27: SscK_{ins} kann die Deletion von SSCI komplementieren. Hefezellen, in denen die chromosomale Kopie des *SSCI*-Gens deletiert war, wurden entweder mit Wildtyp mtHsp70 (WT) oder der SscK_{ins}-Mutante (SscK_{ins}) komplementiert. Serielle 1:10-Verdünnungsreihen dieser Zellen wurden auf YPD-Platten getüpfelt. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für zwei bis fünf Tage inkubiert.

3.2.17 SscK_{ins} zeigt eine veränderte Interaktion mit Hep1 und Mdj1

Warum kann SscK_{ins} mtHsp70 nur teilweise ersetzen? Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst das Interaktionsmuster von SscK_{ins} mit dem von mtHsp70 verglichen. Dazu wurden Mitochondrien aus Hefestämmen isoliert, die entweder mtHsp70 mit Histidin-Anhang oder SscK_{ins} exprimieren. Zur Kontrolle wurden ebenso Mitochondrien eines Stammes verwendet, der nicht markiertes mtHsp70 exprimiert. Nach Verringerung oder Erhöhung der ATP-Mengen in diesen Mitochondrien und Solubilisierung mit Triton X-100 wurden die Solubilisate mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Anschließend wurde die Säule ausführlich gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Bezüglich der Interaktionen mit Tim44 und Mge1 konnte kein Unterschied zwischen mtHsp70 und SscK_{ins} festgestellt werden (Abbildung 3.28). Beide Proteine interagierten mit Tim44, wenn die ATP-Menge in Mitochondrien gering war. Mge1 konnte mit beiden Proteinen unter hohen und niedrigen ATP-Bedingungen gereinigt werden. Dabei scheint die Interaktion stärker zu sein, wenn die ATP-Mengen verringert wurden. Allerdings unterscheiden sich mtHsp70 und SscK_{ins} stark in ihrer Interaktion mit Hep1. MtHsp70 interagiert mit Hep1, wenn die ATP-Mengen in den Mitochondrien gering sind. Im Gegensatz dazu konnte keinerlei Interaktion zwischen SscK_{ins} und Hep1 festgestellt werden. Auch für die Interaktion mit Mdj1 lassen sich Unterschiede zwischen mtHsp70 und SscK_{ins} feststellen. Während Mdj1 zusammen mit mtHsp70 sowohl bei hoher als auch bei niedriger ATP-Menge aufgereinigt wurde, konnte eine stark

beeinträchtigte Interaktion zwischen SscK_{ins} und Mdj1 bei niedriger ATP-Menge festgestellt werden.

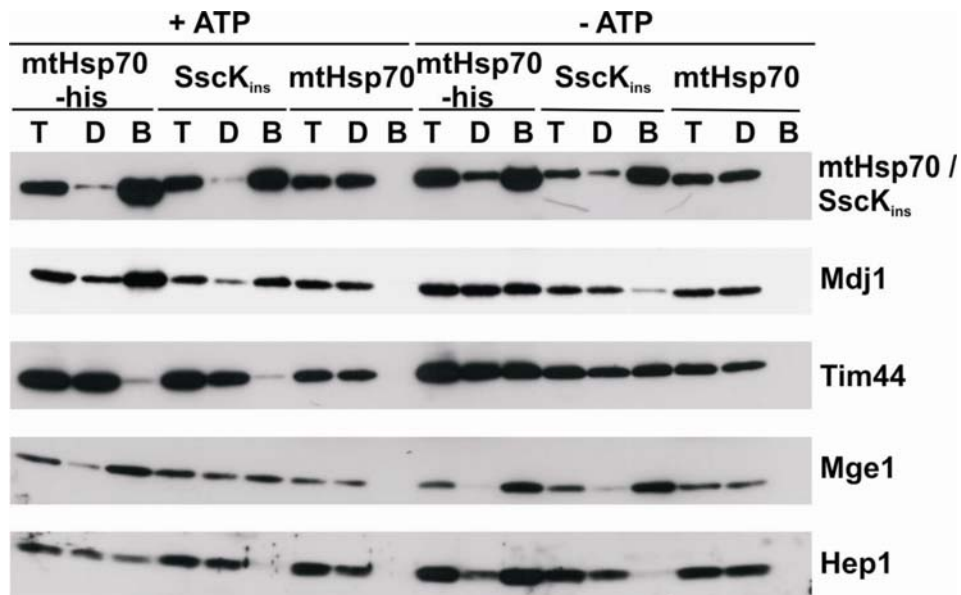


Abbildung 3.28: SscK_{ins} unterscheidet sich in seinen Interaktionen mit Hep1 und Mdj1 von mtHsp70. In isolierten Mitochondrien aus Hefestämmen, die entweder mtHsp70 mit Histidin-Anhang, SscK_{ins} mit Histidin-Anhang oder nicht markiertes mtHsp70 exprimieren, wurden die ATP-Mengen manipuliert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 solubilisiert und das Solubilisat mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden nach ausführlichem Waschen mit SDS-Probenpuffer mit 300 mM Imidazol eluiert. Die Proben aus dem Solubilisat (T, total), dem Durchfluss (D) und dem gebundenen Material (B) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting gegen die angegebenen Proteine untersucht.

3.2.18 Die ATPase-Aktivität von SscK_{ins} wird durch Tim14 stimuliert, aber nicht durch Mdj1

Hat die veränderte Interaktion zwischen SscK_{ins} und Mdj1 einen Einfluss auf die Stimulation der ATPase-Aktivität von SscK_{ins} durch Mdj1? Zur Beantwortung dieser Frage wurde SscK_{ins} gereinigt und seine ATPase-Aktivität in Gegenwart verschiedener Cochaperone gemessen. Zum Vergleich wurde auch die Aktivität von mtHsp70 unter den gleichen Bedingungen bestimmt. Die intrinsische ATPase-Aktivität von SscK_{ins} scheint höher zu sein als die von mtHsp70 (Abbildung 3.29). Wie für mtHsp70 wurde für SscK_{ins} eine leichte Stimulation der ATPase-Aktivität in Gegenwart des Nukleotidaustauschfaktors Mge1 beobachtet. Diese Stimulation der ATPase-Aktivität beider Hsp70-Proteine konnte durch Zugabe von Tim14 gesteigert werden (Abbildung 3.29 A). Weiterhin wurde mtHsp70 durch die Zugabe von Mdj1 stimuliert. Dagegen unterschied sich die Hydrolyserate von ATP durch SscK_{ins} in

Gegenwart von Mdj1 und Mge1 nicht von der Hydrolyserate in Gegenwart von Mge1 allein (Abbildung 3.29 B). SscK_{ins} ist also eine aktive ATPase. Tim14 kann diese ATPase-Aktivität stimulieren. Im Gegensatz zu mtHsp70 ist SscK_{ins} aber nicht mehr von Mdj1 stimulierbar.

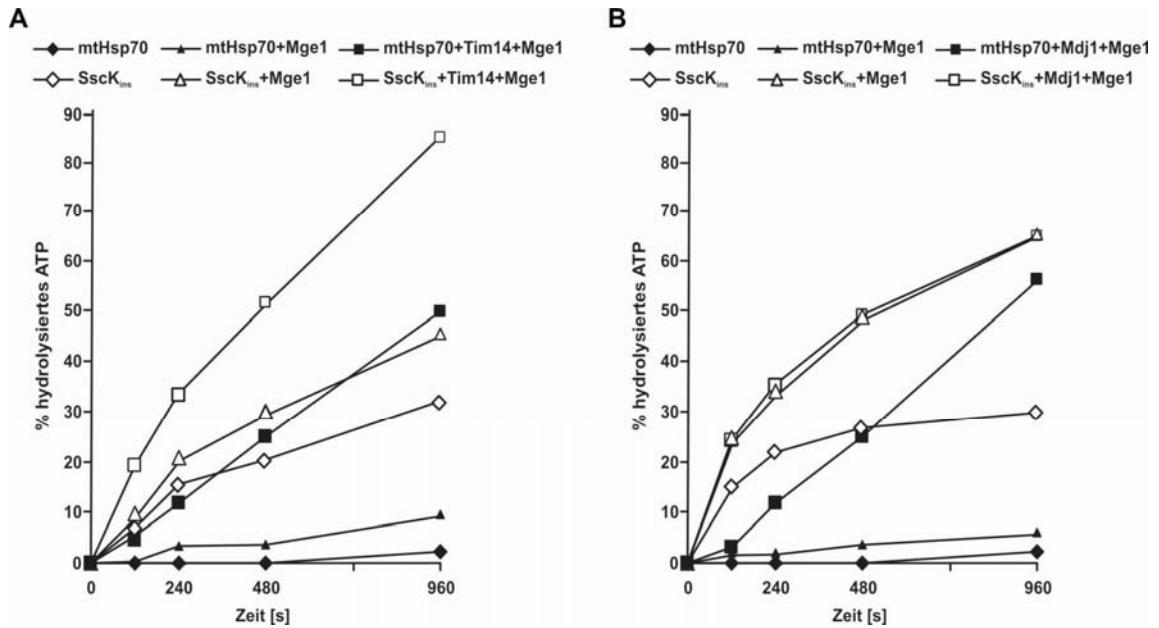


Abbildung 3.29: Stimulierung der ATPase-Aktivität von SscK_{ins} durch Tim14 und Mdj1. Die ATPase-Aktivitäten von mtHsp70 und SscK_{ins} wurden ohne Cochaperone in Gegenwart von Mge1 und in Gegenwart von Tim14 und Mge1 (A) oder Mdj1 und Mge1 (B) wie beschrieben bestimmt.

4 Diskussion

4.1 Die J-Proteine des Importmotors der TIM23-Proteintranslokase

Der Importmotor der TIM23-Translokase in Mitochondrien nutzt die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um entfaltete Proteine in die mitochondriale Matrix zu importieren. Dabei ist mtHsp70 das ATP-verbrauchende Protein. Es interagiert mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Miao et al., 1997; Westermann et al., 1995), und mit Tim44, das mtHsp70 an die TIM23-Translokase rekrutiert (Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Jedoch war zu Beginn dieser Arbeit kein Vertreter der J-Domänen-Proteinfamilie bekannt, der Teil des mitochondrialen Importmotors war.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Tim14 das J-Protein des Importmotors identifiziert werden (Mokranjac et al., 2003b). Es ist ein Transmembranprotein der inneren mitochondrialen Membran und hat eine klassische J-Domäne mit dem konservierten HPD-Motiv auf der Matrixseite. Wie mtHsp70 wird auch Tim14 von Tim44 an die TIM23-Translokase rekrutiert (Mokranjac et al., 2003b). Tim14 ist ein funktionelles J-Domänen-Protein, das die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimuliert. Diese Funktion ist essenziell für das Wachstum von Hefezellen, wie anhand einer QPD-Mutante von Tim14 gezeigt werden konnte. In dieser Mutante wurde das konservierte HPD-Motiv der J-Domäne gegen ein QPD-Motiv ausgetauscht. Dieser Aminosäureaustausch verhindert die Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsp70-Proteinen durch J-Proteine (Mayer et al., 1999; Wall et al., 1994). Hefezellen, die diese Mutante anstelle des Wildtyp-*TIM14*-Gens exprimieren, sind nicht lebensfähig.

Mit der Identifikation von Tim14 wurde die evolutionäre Konservierung zwischen dem DnaK-DnaJ-GrpE-System aus *E. coli* und dem Importmotor der TIM23-Translokase deutlich. Beide Systeme bestehen aus einem Hsp70-Protein, einem Nukleotidaustauschfaktor und einem J-Protein. Jedoch unterscheiden sich die J-Proteine in ihren Funktionen. In *E. coli* übernimmt DnaJ zwei Funktionen: Zum einen stimuliert seine N-terminale J-Domäne die ATPase-Aktivität von DnaK (Liberek et al., 1991), zum anderen bindet es mit seinem C-terminalen Sequenzbereich ungefaltete Proteine (Szabo et al., 1996; Wall et al., 1995) und präsentiert sie DnaK, vermutlich mittels einer Interaktion zwischen DnaJ und der PBD von DnaK (Suh et al., 1998). Im Importmotor der TIM23-Translokase wird die Stimulation der ATPase-Aktivität des mtHsp70s von Tim14 übernommen. Da der Teil von Tim14, der sich in der mitochondrialen Matrix befindet aus der J-Domäne besteht, ist es sehr unwahrscheinlich,

dass Tim14 ebenso an der Präsentation des Präproteins beteiligt ist. Tim44 könnte die Funktion des C-Terminus von DnaJ übernommen haben, weil sowohl ungefaltete Proteine (Blom et al., 1993; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994) als auch die PBD von mtHsp70 binden kann (Moro et al., 2002). Im Importmotor der TIM23-Translokase könnten also die Funktionen von DnaJ auf zwei Proteine, nämlich Tim14 und Tim44, verteilt sein.

Im Gegensatz zu anderen bekannten Hsp70-Systemen verfügt der Importmotor der TIM23-Translokase nicht nur über einen Nukleotidaustauschfaktor und ein J-Protein. Auch ein J-ähnliches Protein, Tim16, ist Teil dieses Systems. Tim16 wird für die Rekrutierung von Tim14 an die TIM23-Translokase benötigt (Frazier et al., 2004; Kozany et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tim16 selbst nicht die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimuliert, aber die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 reguliert. So verringert sich die ATPase-Aktivität von mtHsp70 in Gegenwart von Tim14 durch steigende Mengen von Tim16. Ein stabiler Komplex aus Tim16 und Tim14 zeigt keine Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 (Mokranjac et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Tim16 und Tim14 ein Tetramer aus zwei Heterodimeren bilden, in dem Tim16 die Flexibilität von Tim14 einschränkt und somit eine Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 verhindert (Mokranjac et al., 2006).

Diese Daten führen zu folgendem Modell der Funktion des Importmotors (Abbildung 4.1): Beim Importmotor der TIM23-Translokase handelt es sich um ein spezielles Hsp70-System, in dem sowohl mtHsp70 als auch das stimulierende J-Protein Tim14 durch Tim44 in räumliche Nähe und vermutlich in die optimale Orientierung zueinander gebracht werden. Um eine Verschwendung von ATP durch die Stimulation von mtHsp70 in Abwesenheit eines zu transportierenden Präproteins zu verhindern, wird Tim14 durch Tim16 gehemmt. Wird ein Protein über die TIM23-Translokase importiert, wird es nach dem Austritt aus dem Kanal der TIM23-Translokase vom Tim44-mtHsp70-Komplex gebunden. Diese Bindung führt zu Konformationsänderungen im gesamten Importmotor, wodurch die Tim16-Tim14-Interaktionen geändert werden. Damit erhöht sich die Flexibilität von Tim14. Tim14 kann nun die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimulieren und somit den Import des Präproteins fördern. Sobald das Präprotein die Translokase verlassen hat, wird Tim14 wieder von Tim16 inhibiert.

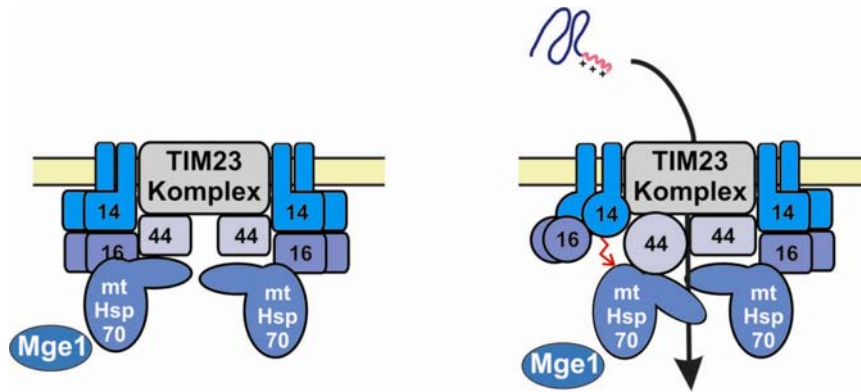


Abbildung 4.1: Modell der Funktion des Importmotors der TIM23-Translokase. Im Importmotor werden mtHsp70, das stimulierende J-Protein Tim14 und das regulierende J-ähnliche Protein Tim16 von Tim44 in räumlicher Nähe zueinander und zur TIM23-Translokase gehalten. Wird kein Protein importiert, so maskiert Tim16 Tim14 und verhindert somit die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 (linke Seite). Während der Proteintranslokation wird das Präprotein vom Tim44-mtHsp70-Komplex gebunden. Diese Bindung führt zu Konformationsänderungen im gesamten Importmotor. Dadurch wird das HPD-Motiv von Tim14 nicht mehr von Tim16 blockiert und kann die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimulieren (rechte Seite).

Der Importmotor der TIM23-Translokase ist also ein sehr komplexes Hsp70-System und zeigt neben den bekannten Regulatoren, nämlich Nukleotidaustauschfaktoren und J-Proteinen, noch eine weitere Ebene der Regulation. In diesem System wird auch die Stimulation von mtHsp70 durch Tim14 reguliert. Diese Regulation ist notwendig, da zur Gewährleistung eines optimalen Proteinimports das J-Protein Tim14 im Importmotor permanent in räumlicher Nähe des Hsp70-Proteins gehalten wird. Mittels der Regulation von Tim14 durch Tim16 wird nun ein unnützer ATP-Verbrauch in Abwesenheit eines Substrats verhindert.

Eine Besonderheit von *S. cerevisiae* ist die Anwesenheit eines weiteren J-Proteins im Importmotor, Mdj2. Obwohl die Deletion des für dieses Protein kodierenden Gens im Gegensatz zur Deletion des essenziellen *TIM14* keinen erkennbaren Phänotypen in *S. cerevisiae* hervorruft, kann Mdj2 bei Überexpression die Funktion von Tim14 übernehmen (Mokranjac et al., 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es ein funktionelles J-Protein des Importmotors ist und sich in der Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 nicht von Tim14 unterscheidet. Trotzdem wird in Wildtypzellen offensichtlich Tim14 als J-Protein des Importmotors benötigt. Dies kann zum einen am niedrigen Expressionslevel von Mdj2 liegen. Zum anderen formt Mdj2 einen weniger stabilen Komplex mit Tim16 (Mokranjac et al., 2005). *In-vitro*-Experimente aus dieser Arbeit zeigten außerdem, dass sich die Mechanismen der Regulation der Stimulation der ATPase-Aktivität von Tim14 und Mdj2 durch Tim16 unterscheiden. Während Tim16 inhibierend auf Tim14 wirkt, verstärkt es die Wirkung von Mdj2.

Tim16 bildet zwei unterschiedliche Komplexe in der TIM23-Translokase aus: einen mit Tim14 und einen anderen mit Mdj2 (Mokranjac et al., 2005). Obwohl die Deletion von Mdj2 keinen erkennbaren Phänotyp zeigt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mdj2 eine spezialisierte Funktion hat. Diese ist aber nicht essenziell für das Wachstum von Hefezellen unter den getesteten Bedingungen. So könnte Mdj2 Teil einer spezialisierten TIM23-Translokase sein, die eine bestimmte Klasse von Proteinen importiert. Außerdem wurde berichtet, dass die Funktion von Mdj2 teilweise mit der Funktion von Mdj1, dem J-Protein, das mtHsp70 bei der Faltung von Proteinen in der mitochondrialen Matrix unterstützt, überlappt (Westermann and Neupert, 1997).

4.2 Hep1 ein Chaperon für mitochondriale Hsp70-Chaperone

Neben den J-Proteinen des Importmotors der TIM23-Translokase wurde in dieser Arbeit ein weiterer Interaktionspartner von mtHsp70 identifiziert und charakterisiert, Hep1. Dabei handelt es sich um eine neue Art eines Interaktionspartners von Hsp70-Proteinen. Hep1 ist ein Chaperon für mitochondriale Hsp70-Chaperone. In Abwesenheit von Hep1 aggregieren mitochondriale Hsp70-Protein. Diese Aggregation führt zum Verlust der Funktion der Hsp70-Proteine. Dies erklärt die vielfältigen Defekte in den Mitochondrien aus $\Delta hep1$ -Zellen. In dieser Arbeit und in weiteren Studien wurde gezeigt, dass in diesen Mitochondrien neben dem Proteinimport (Burri et al., 2004; Sanjuan Szklarz et al., 2005; Yamamoto et al., 2005) und der mitochondrialen Morphologie (Sanjuan Szklarz et al., 2005) auch die Biogenese von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern betroffen ist (Sanjuan Szklarz et al., 2005).

Aufgrund des Importdefektes von TIM23-Substraten in Folge einer Verringerung der Hep1-Menge wurde eine Funktion dieses Proteins im Importmotor der TIM23-Translokase vorgeschlagen und das Protein Zim17 (Zink-Finger-Motiv) (Burri et al., 2004) oder Tim15 (Yamamoto et al., 2005) genannt. Es wurde postuliert, dass Hep1 die Funktion des C-terminalen Teils von DnaJ im Importmotor übernimmt (Burri et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). Diese Annahme beruhte auf der Gegenwart von C-X-X-C-Motiven sowohl in der Zink-Finger-Domäne des C-terminalen Teils von DnaJ als auch im vorhergesagten Zink-Finger-Motiv in Hep1. Die C-X-X-C-Motive in der Zink-Finger-Domäne von DnaJ sind essenziell für dessen Bindung von ungefalteten Proteinen (Linke et al., 2003). Eine genaue Analyse der C-X-X-C-Motive in Hsp40-Proteinen, wie DnaJ, zeigte, dass neben den beiden Cysteinen auch zwei Glycine in diesen Proteinen konserviert sind (Bardwell et al., 1986; Martinez-Yamout et al., 2000). Ein solches C-X-X-C-X-G-X-G-Motiv ist in Hep1 nicht

vorhanden. Gegen eine Rolle von Hep1 als funktionelles Homolog des C-terminalen Teils von DnaJ im Importmotor der TIM23-Translokase spricht weiterhin, dass Hep1 kein Teil der TIM23-Translokase ist und auch seine Deletion die Zusammensetzung der Translokase nicht stört (Sichting et al., 2005). Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit, im Gegensatz zu der beschriebenden Bindung von Präproteinen an Hep1 (Burri et al., 2004), keine Bindung von Hep1 an ungefaltete Proteine gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings verhindert Hep1 die Aggregation von mtHsp70 sowohl in Mitochondrien, als auch in einem rekonstituierten System aus gereinigten Komponenten und bei heterologer Expression beider Proteine in *E. coli*-Zellen. Mit Hilfe einer Temperatur-sensitiven Mutante von Hep1 konnte gezeigt werden, dass nach Inaktivierung von Hep1 die Aggregation von mtHsp70 erfolgt, bevor es zu einem Defekt des Proteinimports kommt (Sanjuan Szklarz et al., 2005). Schließlich kommt es in Abwesenheit von Hep1 nicht nur zur Aggregation von mtHsp70, sondern auch zur Aggregation des strukturell verwandten aber funktionell unterschiedlichen Ssq1. Deshalb sind neben dem Proteinimport auch viele andere Prozesse wie die Biogenese zum Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen und die Aufrechterhaltung der Morphologie der Mitochondrien betroffen. Aus diesen Gründen scheint es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Defekte in den Prozessen, die auf Hsp70-Proteine angewiesen sind, durch die auf Grund der Aggregation verringerte Menge an funktionellen mitochondrialen Hsp70-Proteinen hervorgerufen werden. Die primäre Funktion von Hep1 ist die Verhinderung der Aggregation mitochondrialer Hsp70-Proteine, obwohl eine Rolle von Hep1 im Importmotor der TIM23-Translokase nicht komplett ausgeschlossen werden kann.

Hep1 wurde aufgrund seiner Interaktion mit mtHsp70 identifiziert. Diese Interaktion ist durch das von mtHsp70 gebundene Nukleotid reguliert. Hep1 bindet nur an mtHsp70, wenn dieses ADP oder kein Nukleotid gebunden hat. Mit Hilfe eines rekonstituierten Systems aus gereinigten Proteinen konnte gezeigt werden, dass mtHsp70 nur in seiner nukleotidfreien Form eine starke Tendenz zur Aggregation zeigt. Diese Aggregation wird durch die Bindung von Hep1 effektiv verhindert. Jedoch kann Hep1 keine mtHsp70-Aggregate auflösen, sobald sich diese einmal gebildet haben. Die oligomere Form von mtHsp70 scheint somit keine physiologische Funktion zum Beispiel als Speicher von mtHsp70 zu haben, sondern vielmehr die Folge eines Fehlprozesses zu sein, der unter normalen Bedingungen von Hep1 verhindert wird. Diese Vermutung wird durch den Verlust der ATPase-Aktivität von mtHsp70-Oligomeren *in vitro* untermauert. Hep1 bindet also an eine bestimmte Konformation von mtHsp70, die zur Aggregation neigt, und verhindert somit die Oligomerisierung und damit den Funktionsverlust von mtHsp70.

Diese Konformation scheint spezifisch für mitochondriale Hsp70-Proteine zu sein, da DnaK aus *E. coli* in den Mitochondrien eines $\Delta hep1$ -Stammes nicht aggregiert. Zwar wurde über eine Oligomerisierung von DnaK (Schonfeld et al., 1995) und anderen Hsp70-Proteinen berichtet (Benaroudj et al., 1995; Blond-Elguindi et al., 1993; Freiden et al., 1992), wahrscheinlich unterscheiden sich aber die Mechanismen dieser Oligomerisierung von der in dieser Arbeit beobachteten Aggregation mitochondrialer Hsp70-Proteine. So wurde für einige dieser Hsp70-Proteine gezeigt, dass deren Oligomerisierung durch nicht gefaltete Proteine oder ATP rückgängig gemacht werden kann (Benaroudj et al., 1997; Blond-Elguindi et al., 1993) oder dass die Oligomere eine funktionelle Speicherform darstellen (Schonfeld et al., 1995). Ob es in anderen Hsp70-Systemen Proteine gibt, die die Funktion von Hep1 übernehmen, bleibt zu klären. Bei einer Suche in Datenbanken konnten anhand der Primärsequenz nur Homologe von Hep1 gefunden werden, die sich laut Vorhersagen in Mitochondrien befinden. Jedoch gibt es in anderen Kompartimenten der Zelle Proteine mit ähnlicher Funktion. Das 16 kDa Protein p16, ein Mitglied der Nm23/Nukleosid-Diphosphat-Kinase-Familie, ist zum Beispiel in der Lage, Oligomere des cytosolischen Hsc70 aufzulösen (Leung and Hightower, 1997).

Auch bei anderen Nukleotid-hydrolysierenden Proteinen gibt es die Notwendigkeit, die nukleotidfreien Form zu stabilisieren. Ein Beispiel hierfür sind Rab-Proteine. Diese Mitglieder der kleinen G-Proteinfamilie werden in ihrer nukleotidfreien Form durch eine transiente Interaktion mit dem Protein Dss4 stabilisiert (Collins et al., 1997; Esters et al., 2001; Nuoffer et al., 1997).

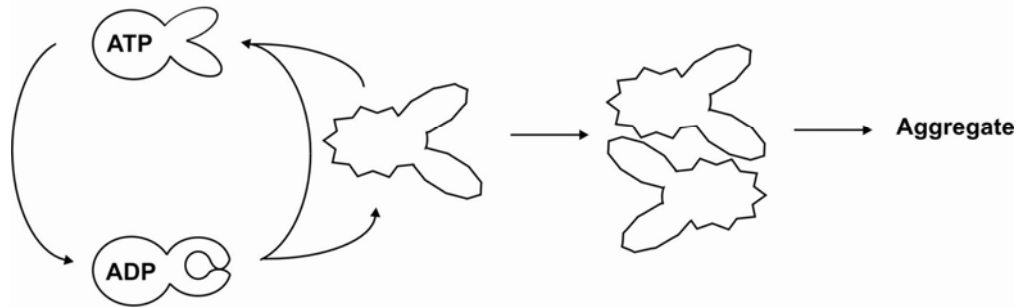
Für die Bindung von Hep1 an mtHsp70 ist die ATPase-Domäne von mtHsp70 notwendig. Allerdings interagiert diese Domäne alleine nicht mit Hep1, so dass die PBD von mtHsp70 an der Bindung von Hep1 an mtHsp70 beteiligt sein könnte. Da die ATPase-Domäne alleine nicht zur Aggregation in Abwesenheit von Hep1 neigt, ist es jedoch ebenso möglich, dass die isolierte ATPase-Domäne von mtHsp70 keine Konformation einnimmt, die von Hep1 erkannt wird.

Der genaue Mechanismus der Aggregation von mtHsp70 ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Weder die Translokation noch das Milieu in der mitochondrialen Matrix führen zur Aggregation von Hsp70-Proteinen. Stattdessen scheint die Tendenz zur Aggregation ein Charakteristikum mitochondrialer Hsp70-Proteine zu sein. Da weder die isolierte ATPase-Domäne noch die isolierte PBD in Abwesenheit von Hep1 aggregieren, ist die Interdomänenkommunikation zwischen ATPase-Domäne und PBD notwendige Voraussetzung für die Aggregation. Deshalb scheint die Aggregation mitochondrialer

Hsp70-Proteine in Abwesenheit von Hep1 die Folge einer Konformationsänderung zu sein, die als Seitenprodukt des normalen Reaktionszyklusses dieser Proteine auftritt. Hep1 bindet an solche Intermediate und verhindert deren Aggregation.

Neben ihrer Funktion bei der Bindung von Hep1 scheint die ATPase-Domäne auch an der Aggregation von mtHsp70 beteiligt zu sein. So zeigte die ATPase-Domäne von aggregiertem mtHsp70 eine gegenüber der ATPase-Domäne des gefalteten mtHsp70 erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen. Der Austausch eines kurzen Sequenzabschnitts in der ATPase-Domäne von mtHsp70 gegen den entsprechenden Abschnitt von DnaK macht aus dem resultierenden chimären Protein ein funktionelles Hsp70-Protein, dessen Löslichkeit nicht mehr von Hep1 abhängt. Dieser Bereich der ATPase-Domäne ist an der Interdomänenkommunikation zwischen der ATPase-Domäne und der PBD in Hsp70-Proteinen beteiligt (Jiang et al., 2005). Es ist möglich, dass der Einschub von vier Aminosäuren in der ATPase-Domäne von mtHsp70, der durch den Austausch der Sequenzabschnitte entsteht, den Linker genannten Bereich zwischen der ATPase-Domäne und der PBD stabilisiert. Dadurch könnte das gesamte Protein in seiner Struktur gefestigt werden und die Einnahme einer Konformation, die zur Aggregation neigt, verhindert werden. Fehlen diese stabilisierenden Interaktionen, so nimmt mtHsp70 in seiner nukleotidfreien Form möglicherweise eine Konformation ein, in der die Kontaktstellen zwischen der ATPase-Domäne und der PBD exponiert sind. Treffen nun zwei solche Konformationsisomere von mtHsp70 aufeinander, so ist eine nicht native intermolekulare Interaktion zwischen der ATPase-Domäne des einen mtHsp70-Proteins mit der PBD des anderen mtHsp70-Moleküls denkbar. Eine Kettenreaktion solcher Interaktionen könnte dann zur Ausbildung der Aggregate führen. Dieses Modell wird von der Beobachtung gestützt, dass die isolierten Domänen von mtHsp70 in Abwesenheit von Hep1 mit dem vollständigen mtHsp70 interagieren. Ist Hep1 jedoch anwesend, so kann keine Interaktion zwischen der isolierten ATPase-Domäne oder der PBD und dem vollständigen mtHsp70 beobachtet werden. Die Bindung von Hep1 an mtHsp70 verhindert entweder die Ausbildung dieser Konformation von mtHsp70 oder findet mit sehr viel höherer Affinität statt als die intermolekulare Bindung zwischen den mtHsp70-Molekülen. Hep1 hält mtHsp70 also in einer monomeren Konformation, die wieder in den normalen Reaktionszyklus eintreten kann. Dies kann durch Bindung von ATP oder anderer Interaktionspartner an mtHsp70 geschehen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ATP als auch Mge1 (Daten nicht gezeigt) Hep1 von mtHsp70 verdrängen.

ohne Hep1



mit Hep1

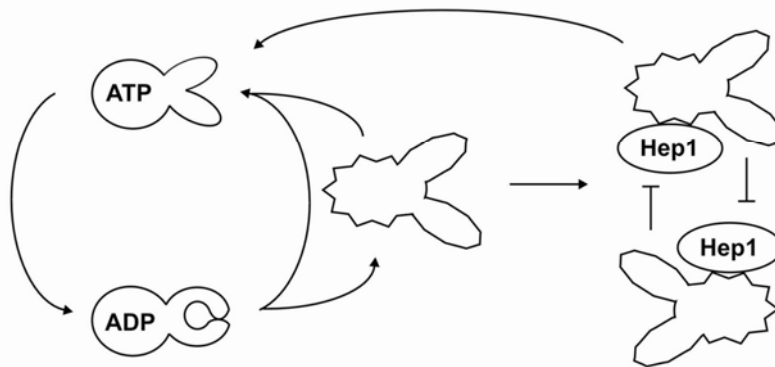


Abbildung 4.2: Modell der Funktion von Hep1. MtHsp70 nimmt während seines normalen Reaktionszyklus eine Konformation ein, die zur Aggregation neigt. Hep1 erkennt diese Konformation von mtHsp70 und hält sie in einem monomeren Zustand. Dadurch kann mtHsp70 wieder in seinen normalen Reaktionszyklus eintreten. In Abwesenheit von Hep1 kommt es dagegen zur Aggregation und damit zum Funktionsverlust von mtHsp70.

Neben dem hier vorgestellten Modell sind auch andere Mechanismen der Aggregation von mtHsp70 vorstellbar. Auch eine nicht geordnete Aggregation, die zu amorphen Aggregaten führt kann zurzeit nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung des Mechanismus sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine Analyse der Aggregate im Elektronenmikroskop könnte Aufschluss über deren Morphologie bringen. Vergleichbare Untersuchungen lieferten wichtige Einsichten in den Mechanismus der Aggregation von Prionproteinen (Glover et al., 1997).

Der Bereich in der ATPase-Domäne ist nur eine Region, die zur Aggregation von mtHsp70 in Abwesenheit von Hep1 beiträgt. So aggregiert SscK_{ins}, eine Mutante von Ssc1 die den Bereich der ATPase-Domäne aus DnaK enthält, im Gegensatz zu DnaK in *E. coli* bei höheren Wachstumstemperaturen (Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist es auch nicht in der Lage die Funktion von DnaK in *E. coli* zu übernehmen. Es ist folglich anzunehmen, dass noch ein oder

mehrere andere Sequenzabschnitte von mtHsp70 an dessen Aggregation beteiligt sind. Neben der ATPase-Domäne trägt auch die PBD zu diesem Phänomen bei. Aufgrund der geringeren Konservierung in der PBD war anhand der Primärsequenz die Identifikation eines Sequenzabschnittes in der PBD, der zur Aggregation beiträgt, nicht möglich. Eine Möglichkeit der Identifikation solcher Bereiche in der PBD besteht in der schrittweisen Verkürzung von mtHsp70 und der Analyse des Aggregationsverhaltens dieser Mutanten.

Warum benötigt ein Chaperon ein weiteres Chaperon, um seine Struktur und Funktion aufrecht zu erhalten? Zurzeit kann diese Frage nicht vollständig beantwortet werden. Allerdings scheint die Ausbildung einer Konformation von mtHsp70, die zur Aggregation neigt, für dessen Funktion notwendig zu sein. DnaK, ein naher Verwandter von mtHsp70, ist zwar in Abwesenheit von Hep1 löslich, kann aber wie alle anderen untersuchten Hsp70-Proteine nicht die Funktion von mtHsp70 übernehmen {Moro, 2002 #4599; Strub, 2002 #4538; Baumann, 2000 #8; diese Arbeit}. In Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch eines Teils der ATPase-Domäne von mtHsp70 gegen den entsprechenden Bereich in DnaK ein Hsp70-Protein entsteht, dessen Löslichkeit von Hep1 unabhängig ist. Allerdings kann dieses Protein nur noch eingeschränkt die Funktion von mtHsp70 übernehmen. Die ATPase-Aktivität des chimären Proteins SscK_{ins} ist nicht mehr durch Mdj1 stimulierbar, was zu Faltungsdefekten in den Mitochondrien eines Hefestammes führt, der SscK_{ins} anstelle von Wildtyp mtHsp70 exprimiert. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass mtHsp70 eine besondere Flexibilität braucht, um seine Funktion erfüllen zu können. Auch die komplexen Interaktionen von mtHsp70 im Importmotor der TIM23-Translokase könnten eine solche besondere Flexibilität des Proteins erfordern. Um den Import von Proteinen zu ermöglichen, wäre dann die Ausbildung eines intermediär instabilen mtHsp70 notwendig. Um dessen Aggregation zu verhindern entwickelte sich Hep1.

5 Zusammenfassung

Mitochondriales Hsp70 spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese und Funktion von Mitochondrien. Es ist essenziell für den Import, die Faltung und den Abbau mitochondrialer Proteine. Wie alle Hsp70-Proteine arbeitet mtHsp70 dabei mit Cochaperonen zusammen. In dieser Arbeit wurden neue Interaktionspartner von mtHsp70 identifiziert und funktionell charakterisiert.

MtHsp70 ist die zentrale Komponente des Importmotors der TIM23-Translokase, der den ATP-abhängigen Transport von Proteinen über die Innenmembran der Mitochondrien vermittelt. Mit Tim14 und Mdj2 wurden in dieser Arbeit zwei Proteine des Importmotors als J-Cochaperone identifiziert. Sowohl Tim14 als auch Mdj2 wurden als MBP-Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt und stimulierten die ATPase-Aktivität von mtHsp70. Eine Variante von Tim14 mit einer Mutation im HPD-Motiv, die die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 verhindert, konnte die Funktion von Tim14 in Hefezellen nicht übernehmen. Die Entdeckung von membranassoziierten J-Proteinen im Importmotor macht deutlich, dass mtHsp70 durch die Stimulation seiner ATPase-Aktivität effizient an ein importiertes Protein binden kann, sobald dieses die Translokationspore des TIM23-Komplexes verlässt. Ebenso wird die evolutionäre Konservierung zwischen dem Importmotor und bakteriellen Hsp70-Systemen ersichtlich. Der Importmotor der TIM23-Translokase ist aber eine Ausnahme unter den Hsp70-Systemen, da in diesem System mit Tim16 eine weitere, regulatorische Komponente identifiziert werden konnte. Tim16 ist ein J-ähnliches Protein, das selber keine stimulierende Wirkung auf die ATPase-Aktivität von mtHsp70 hat, aber die Stimulation von mtHsp70 durch Tim14 reguliert. Dies könnte einen unnötigen Verbrauch von ATP durch mtHsp70 in Abwesenheit eines Präproteins verhindern.

Mit der Charakterisierung der J- und J-ähnlichen Proteine des Importmotors wurden wesentliche Erkenntnisse über die Funktionsweise des Importmotors geliefert.

Ein bisher nicht bekanntes Protein wurde zusammen mit mtHsp70 aus *S. cerevisiae* gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert. Dieses Protein, Hep1, ist ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix. Es interagiert mit mtHsp70 in seiner nukleotidfreien und ADP-gebundenen Form. Für diese Interaktion ist die ATPase-Domäne von mtHsp70 notwendig. Jedoch trägt vermutlich auch die PBD zur Bindung von mtHsp70 an Hep1 bei, da eine solche Bindung nur beobachtet werden konnte, wenn mtHsp70 sowohl die ATPase-Domäne als auch die PBD aufweist.

Hep1 hat im Gegensatz zu den bekannten Cochaperonen keinen Einfluss auf den ATPase-Zyklus von mtHsp70. Allerdings aggregieren in Abwesenheit von Hep1 mitochondriale Hsp70-Proteine. Diese Aggregation ist irreversibel und führt zum Verlust der Funktion der mitochondrialen Hsp70-Proteine. Diese Beeinträchtigung führt wiederum zu Defekten in Prozessen, die funktionelle mitochondriale Hsp70-Proteine benötigen. So wurden in $\Delta hep1$ -Zellen Defekte im mitochondrialen Proteinimport und der Biogenese von Eisen-Schwefel-Clustern beobachtet. Aufgrund dieser Defekte zeigen $\Delta hep1$ -Zellen einen Temperatursensitiven Wachstumsphänotyp.

Die Tendenz zur Aggregation ist spezifisch für mitochondriale Hsp70-Proteine, wobei besonders die nukleotidfreie Form von mtHsp70 betroffen ist. Im aggregierten Material ließ sich eine erhöhte Sensitivität der ATPase-Domäne gegenüber zugesetzter Protease feststellen, was auf eine Fehlfaltung dieser Domäne deutet. Es wurde eine Region in der ATPase-Domäne von mtHsp70 identifiziert, die zur Aggregation von mtHsp70 beiträgt. Durch Austausch dieser Region gegen die entsprechende Region aus DnaK, dem nächsten nicht mitochondrialen Verwandten von mtHsp70, konnte ein teilweise funktionsfähiges Hsp70-Protein hergestellt werden, dessen Löslichkeit nicht mehr von Hep1 abhängig ist. MtHsp70 aggregiert nur, wenn es sowohl die ATPase-Domäne als auch die PBD aufweist. Die Interdomänenkommunikation zwischen der ATPase-Domäne und der PBD von mtHsp70 scheint zur Ausbildung einer instabilen Konformation notwendig zu sein. Hep1 bindet an mtHsp70 in dieser Konformation und verhindert somit die Aggregation.

Mit Hep1 wurde in dieser Arbeit ein neuer Typ von Interaktionspartnern mitochondrialer Hsp70-Proteine entdeckt. Es wirkt als Chaperon für dieses Hsp70-Proteine, indem es an sie bindet und deren Aggregation verhindert.

6 Literaturverzeichnis

- Ahting, U., C. Thun, R. Hegerl, D. Typke, F.E. Nargang, W. Neupert, and S. Nussberger. 1999. The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* 147:959-68.
- Ahting, U., T. Waizenegger, W. Neupert, and D. Rapaport. 2005. Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem.* 280:48-53.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181(96):223-30
- Bardwell, J.C., K. Tilly, E. Craig, J. King, M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1986. The nucleotide sequence of the Escherichia coli K12 dnaJ+ gene. A gene that encodes a heat shock protein. *J Biol Chem.* 261:1782-5.
- Bauer, M.F., S. Hofmann, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* 10:25-31.
- Baumann, F., I. Milisav, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2000. Ecm10, a novel hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* 487:307-12.
- Becker, T., Soll, J. and Schleiff E. 2005. Chaperone Systems in Chloroplasts. *In Protein Folding Handbook.* Vol. 5. 1047-1092.
- Benaroudj, N., G. Batelier, F. Triniolles, and M.M. Ladjimi. 1995. Self-association of the molecular chaperone HSC70. *Biochemistry.* 34:15282-90.
- Benaroudj, N., B. Fouchaq, and M.M. Ladjimi. 1997. The COOH-terminal peptide binding domain is essential for self-association of the molecular chaperone HSC70. *J Biol Chem.* 272:8744-51.
- Berthold, J., M.F. Bauer, H.C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert, and M. Brunner. 1995. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell.* 81:1085-93.
- Blom, J., P. Dekker, and M. Meijer. 1995. Functional and physical interactions of components of the yeast mitochondrial inner-membrane import machinery (MIM). *Eur J Biochem.* 232:309-314.

- Blom, J., M. Kubrich, J. Rassow, W. Voos, P.J. Dekker, A.C. Maarse, M. Meijer, and N. Pfanner. 1993. The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* 13:7364-71.
- Blond-Elguindi, S., A.M. Fourie, J.F. Sambrook, and M.J. Gething. 1993. Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem.* 268:12730-5.
- Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8:93-99.
- Bolliger, L., O. Deloche, B.S. Glick, C. Georgopoulos, P. Jenö, N. Kronidou, M. Horst, N. Morishima, and G. Schatz. 1994. A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.* 13:1998-2006.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brehmer, D., S. Rudiger, C.S. Gassler, D. Klostermeier, L. Packschies, J. Reinstein, M.P. Mayer, and B. Bukau. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol.* 8:427-32.
- Brychzy, A., T. Rein, K.F. Winklhofer, F.U. Hartl, J.C. Young, and W.M. Obermann. 2003. Cofactor Tpr2 combines two TPR domains and a J domain to regulate the Hsp70/Hsp90 chaperone system. *Embo J.* 22:3613-23.
- Buchberger, A., C.S. Gassler, M. Buttner, R. McMacken, and B. Bukau. 1999. Functional defects of the DnaK756 mutant chaperone of Escherichia coli indicate distinct roles for amino- and carboxyl-terminal residues in substrate and co-chaperone interaction and interdomain communication. *J Biol Chem.* 274:38017-26.
- Buchberger, A., H. Theyssen, H. Schroder, J.S. McCarty, G. Virgallita, P. Milkereit, J. Reinstein, and B. Bukau. 1995. Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J Biol Chem.* 270:16903-10.
- Bukau, B., and A.L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92:351-66.
- Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 125:443-51.

- Burri, L., K. Vascotto, S. Fredersdorf, R. Tiedt, M.N. Hall, and T. Lithgow. 2004. Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. *J Biol Chem.* 279:50243-9.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L.K. Sanjuan Szklarz, A. Schulze-Specking, K.N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J.* 23:3735-46.
- Chappell, T.G., B.B. Konforti, S.L. Schmid, and J.E. Rothman. 1987. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem.* 262:746-51.
- Chaudhuri, T.K., G.W. Farr, W.A. Fenton, S. Rospert, and A.L. Horwich. 2001. GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. *Cell.* 107:235-46.
- Chen, S., and D.F. Smith. 1998. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem.* 273:35194-200.
- Collins, R.N., P. Brennwald, M. Garrett, A. Lauring, and P. Novick. 1997. Interactions of nucleotide release factor Dss4p with Sec4p in the post-Golgi secretory pathway of yeast. *J Biol Chem.* 272:18281-9.
- Craig, E.A., J. Kramer, and J. Kosic-Smithers. 1987. SSC1, a member of the 70kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4156-4160.
- Craig, E.A., J. Kramer, J. Shilling, M. Werner-Washburne, S. Holmes, J. Kosic-Smithers, and C.M. Nicolet. 1989. SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.* 9:3000-3008.
- D'Silva, P.D., B. Schilke, W. Walter, A. Andrew, and E.A. Craig. 2003. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13839-44.
- Dragovic, Z., S.A. Broadley, Y. Shomura, A. Bracher, and F.U. Hartl. 2006. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *Embo J.* 25:2519-28.
- Duchniewicz, M., A. Germaniuk, B. Westermann, W. Neupert, E. Schwarz, and J. Marszalek. 1999. Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19:8201-10.

- Dutkiewicz, R., B. Schilke, S. Cheng, H. Knieszner, E.A. Craig, and J. Marszalek. 2004. Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J Biol Chem.* 279:29167-74.
- Easton, D.P., Y. Kaneko, and J.R. Subjeck. 2000. The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones.* 5:276-90.
- Ellis, R.J. 1997. Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr Biol.* 7:R531-3.
- Ellis, R.J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 26:597-604.
- Esters, H., K. Alexandrov, A. Iakovenko, T. Ivanova, N. Thoma, V. Rybin, M. Zerial, A.J. Scheidig, and R.S. Goody. 2001. Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins. *J Mol Biol.* 310:141-56.
- Ewalt, K.L., J.P. Hendrick, W.A. Houry, and F.U. Hartl. 1997. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell.* 90:491-500.
- Ferbitz, L., T. Maier, H. Patzelt, B. Bukau, E. Deuerling, and N. Ban. 2004. Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature.* 431:590-6.
- Flynn, G.C., J. Pohl, M.T. Flocco, and J.E. Rothman. 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature.* 353:726-730.
- Frazier, A.E., 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. 2004. Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol.* 11:226-33.
- Freiden, P.J., J.R. Gaut, and L.M. Hendershot. 1992. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *Embo J.* 11:63-70.
- Gambill, B.D., W. Voos, P.J. Kang, B. Miao, T. Langer, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1993. A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J. Cell Biol.* 123:109-17.
- Gaume, B., C. Klaus, C. Ungermann, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. 1998. Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J.* 17:6497-507.
- Gautschi, M., H. Lilie, U. Funfschilling, A. Mun, S. Ross, T. Lithgow, P. Rucknagel, and S. Rospert. 2001. RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK- DnaJ homologs Ssz1p and zutin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:3762-7.
- Geissler, S., K. Siegers, and E. Schiebel. 1998. A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *Embo J.* 17:952-66.

- Georgopoulos, C.P., B. Lam, A. Lundquist-Heil, C.F. Rudolph, J. Yochem, and M. Feiss. 1979. Identification of the *C. coli* dnaK (groPC756) gene product. *Mol Gen Genet.* 172:143-9.
- Georgopoulos, C.P., A. Lundquist-Heil, J. Yochem, and M. Feiss. 1980. Identification of the *E. coli* dnaJ gene product. *Mol Gen Genet.* 178:583-8.
- Giaever, G., A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418:387-91.
- Glover, J.R., A.S. Kowal, E.C. Schirmer, M.M. Patino, J.J. Liu, and S. Lindquist. 1997. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell.* 89:811-9.
- Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283:1476-81.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; NY. 725 pp.
- Harrison, C.J., M. Hayer-Hartl, M. Di Liberto, F. Hartl, and J. Kuriyan. 1997. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science.* 276:431-5.
- Hartl, F.U. 1995. Principles of chaperone-mediated protein folding. *Philos Trans R Soc Lond [Biol].* 348:107-112.
- Hartl, F.U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295:1852-8.
- Haslbeck, M., T. Franzmann, D. Weinfurter, and J. Buchner. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 12:842-6.

- Hawlitsek, G., H. Schneider, B. Schmidt, M. Tropschug, F.U. Hartl, and W. Neupert. 1988. Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*. 53:795-806.
- Hell, K., J. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, and R.A. Stuart. 1997. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*. 418:367-70.
- Hell, K., W. Neupert, and R.A. Stuart. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J*. 20:1281-8.
- Hendrick, J.P., T. Langer, T.A. Davis, F.U. Hartl, and M. Wiedmann. 1993. Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10216-20.
- Hesterkamp, T., S. Hauser, H. Lutcke, and B. Bukau. 1996. Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:4437-41.
- Hettema, E.H., C.C. Ruigrok, M.G. Koerkamp, M. van den Berg, H.F. Tabak, B. Distel, and I. Braakman. 1998. The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *J Cell Biol*. 142:421-34.
- Hoppins, S.C., and F.E. Nargang. 2004. The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem*. 279:12396-405.
- Horst, M., W. Oppliger, S. Rospert, H.J. Schonfeld, G. Schatz, and A. Azem. 1997. Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J*. 16:1842-9.
- Horwich, A.L. 2004. Chaperoned protein disaggregation--the ClpB ring uses its central channel. *Cell*. 119:579-81.
- Horwich, A.L., K.B. Low, W.A. Fenton, I.N. Hirshfield, and K. Furtak. 1993. Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell*. 74:909-17.
- Jiang, J., K. Prasad, E.M. Lafer, and R. Sousa. 2005. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell*. 20:513-24.
- Johnson, A.E., and M.A. van Waes. 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:799-842.
- Kang, P.J., J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1990. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*. 348:137-43.

- Kawai, A., S. Nishikawa, Si, A. Hirata, and T. Endo. 2001. Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *J Cell Sci.* 114:3565-74.
- Kelley, W.L. 1998. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci.* 23:222-7.
- Kelley, W.L. 1999. Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol.* 9:R305-8.
- Khyse-Anderson, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10:203-207.
- Kim, R., S. Saxena, D.M. Gordon, D. Pain, and A. Dancis. 2001. J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J Biol Chem.* 276:17524-32.
- Kleizen, B., and I. Braakman. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 16:343-9.
- Klingenberg, M. 1973. The adenine nucleotide carrier in the mitochondrial membrane. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 49:2pp.
- Kluck, C.J., H. Patzelt, P. Genevaux, D. Brehmer, W. Rist, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, and M.P. Mayer. 2002. Structure-function analysis of HscC, the Escherichia coli member of a novel subfamily of specialized Hsp70 chaperones. *J Biol Chem.* 277:41060-9.
- Kozany, C., D. Mokranjac, M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. 2004. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol.* 11:234-41.
- Kramer, G., H. Patzelt, T. Rauch, T.A. Kurz, S. Vorderwulbecke, B. Bukau, and E. Deuerling. 2004. Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in Escherichia coli. *J Biol Chem.* 279:14165-70.
- Kramer, G., T. Rauch, W. Rist, S. Vorderwulbecke, H. Patzelt, A. Schulze-Specking, N. Ban, E. Deuerling, and B. Bukau. 2002. L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature.* 419:171-4.
- Kuwajima, K. 1992. Protein folding in vitro. *Curr Opin Biotechnol.* 3:462-7.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Landles, C., and G.P. Bates. 2004. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5:958-63.

- Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer, and F.U. Hartl. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*. 356:683-9.
- Leonhard, K., B. Guiard, G. Pellicchia, A. Tzagoloff, W. Neupert, and T. Langer. 2000. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol Cell*. 5:629-38.
- Leonhard, K., A. Stiegler, W. Neupert, and T. Langer. 1999. Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature*. 398:348-51.
- Leonhardt, S.A., K. Fearson, P.N. Danese, and T.L. Mason. 1993. HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol*. 13:6304-13.
- Leung, S.M., and L.E. Hightower. 1997. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *J Biol Chem*. 272:2607-14.
- Liang, P., and T.H. MacRae. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci*. 110 (Pt 13):1431-40.
- Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos, and M. Zylicz. 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:2874-8.
- Linke, K., T. Wolfram, J. Bussemer, and U. Jakob. 2003. The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *J Biol Chem*. 278:44457-66.
- Liu, Q., P. D'Silva, W. Walter, J. Marszalek, and E.A. Craig. 2003. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science*. 300:139-41.
- Lu, Z., and D.M. Cyr. 1998. Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J Biol Chem*. 273:27824-30.
- Lussier, M., A.M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S.B. Southard, C.I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A.F. Ram, J.C. Kapteyn, T.W. Roemer, D.H. Vo, D.C. Bondoc, J. Hall, W.W. Zhong, A.M. Sdicu, J. Davies, F.M. Klis, P.W. Robbins, and H. Bussey. 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147:435-50.
- Lutz, T., B. Westermann, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2001. The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol*. 307:815-25.

- Manning-Krieg, U.C., P.E. Scherer, and G. Schatz. 1991. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* 10:3273-80.
- Marc, P., A. Margeot, F. Devaux, C. Blugeon, M. Corral-Debrinski, and C. Jacq. 2002. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* 3:159-64.
- Martin, J., and F.U. Hartl. 1993. Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. *Structure.* 1:161-4.
- Martin, J., M. Mayhew, T. Langer, and F.U. Hartl. 1993. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature.* 366:228-33.
- Martinez-Yamout, M., G.B. Legge, O. Zhang, P.E. Wright, and H.J. Dyson. 2000. Solution structure of the cysteine-rich domain of the Escherichia coli chaperone protein DnaJ. *J Mol Biol.* 300:805-18.
- Matouschek, A., A. Azem, K. Ratliff, B.S. Glick, K. Schmid, and G. Schatz. 1997. Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein import. *EMBO J.* 16:6727-36.
- Matouschek, A., N. Pfanner, and W. Voos. 2000. Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* 1:404-10.
- Matouschek, A., S. Rospert, K. Schmid, B.S. Glick, and G. Schatz. 1995. Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:6319-23.
- Mayer, M.P., T. Laufen, K. Paal, J.S. McCarty, and B. Bukau. 1999. Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J Mol Biol.* 289:1131-44.
- Mayer, M.P., S. Rudiger, and B. Bukau. 2000. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol Chem.* 381:877-85.
- Meier, S., W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2005. Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol.* 170:881-8.
- Meisinger, C., T. Sommer, and N. Pfanner. 2000. Purification of Saccharomyces cerevisiae mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem.* 287:339-42.
- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell.* 121:1059-69.

- Miao, B., J.E. Davis, and E.A. Craig. 1997. Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 265:541-52.
- Moczko, M., B. Schonfisch, W. Voos, N. Pfanner, and J. Rassow. 1995. The mitochondrial ClpB homolog Hsp78 cooperates with matrix Hsp70 in maintenance of mitochondrial function. *J Mol Biol.* 254:538-43.
- Mokranjac, D., G. Bourenkov, K. Hell, W. Neupert, and M. Groll. 2006. Structure and function of Tim14 and Tim16, the J and J-like components of the mitochondrial protein import motor. *Embo J.* 25:4675-85.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. 2003a. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22:816-825.
- Mokranjac, D., M. Sichtung, W. Neupert, and K. Hell. 2003b. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22:4945-56.
- Mokranjac, D., M. Sichtung, D. Popov-Celeketic, A. Berg, K. Hell, and W. Neupert. 2005. The import motor of the yeast mitochondrial TIM23 preprotein translocase contains two different J proteins, Tim14 and Mdj2. *J. Biol. Chem.*:M502397200.
- Montgomery, D., R. Jordan, R. McMacken, and E. Freire. 1993. Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the *Escherichia coli* molecular chaperone DnaK. *J Mol Biol.* 232:680-92.
- Morishima, N., K. Nakagawa, E. Yamamoto, and T. Shibata. 1990. A subunit of yeast site-specific endonuclease SceI is a mitochondrial version of the 70-kDa heat shock protein. *J Biol Chem.* 265:15189-97.
- Moro, F., K. Okamoto, M. Donzeau, W. Neupert, and M. Brunner. 2002. Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *J Biol Chem.* 277:6874-80.
- Moro, F., C. Sirrenberg, H.C. Schneider, W. Neupert, and M. Brunner. 1999. The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J.* 18:3667-75.
- Muchowski, P.J., and J.L. Wacker. 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci.* 6:11-22.
- Muhlenhoff, U., and R. Lill. 2000. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1459:370-82.

- Murakami, H., D. Pain, and G. Blobel. 1988. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* 107:2051-7.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863-917.
- Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:555-65.
- Nielsen, K.L., and N.J. Cowan. 1998. A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo. *Mol Cell.* 2:93-9.
- Nielsen, K.L., N. McLennan, M. Masters, and N.J. Cowan. 1999. A single-ring mitochondrial chaperonin (Hsp60-Hsp10) can substitute for GroEL-GroES in vivo. *J Bacteriol.* 181:5871-5.
- Nollen, E.A., and R.I. Morimoto. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci.* 115:2809-16.
- Nuoffer, C., S.K. Wu, C. Dascher, and W.E. Balch. 1997. Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Mol Biol Cell.* 8:1305-16.
- Okamoto, K., A. Brinker, S.A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert, and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J.* 21:3659-71.
- Paek, K.H., and G.C. Walker. 1987. Escherichia coli dnaK null mutants are inviable at high temperature. *J Bacteriol.* 169:283-90.
- Panaretou, B., C. Prodromou, S.M. Roe, R. O'Brien, J.E. Ladbury, P.W. Piper, and L.H. Pearl. 1998. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *Embo J.* 17:4829-36.
- Parsell, D.A., A.S. Kowal, M.A. Singer, and S. Lindquist. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature.* 372:475-8.
- Parsell, D.A., Y. Sanchez, J.D. Stitzel, and S. Lindquist. 1991. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature.* 353:270-3.
- Paschen, S.A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert. 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature.* 426:862-6.
- Polissi, A., L. Goffin, and C. Georgopoulos. 1995. The Escherichia coli heat shock response and bacteriophage lambda development. *FEMS Microbiol Rev.* 17:159-69.

- Rassow, J., A.C. Maarse, E. Krainer, M. Kubrich, H. Muller, M. Meijer, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1994. Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell Biol.* 127:1547-56.
- Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner. 2004. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:519-30.
- Rojo, E.E., R.A. Stuart, and W. Neupert. 1995. Conservative sorting of F0-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J.* 14:3445-51.
- Rowley, N., C. Prip-Buus, B. Westermann, C. Brown, E. Schwarz, B. Barrell, and W. Neupert. 1994. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell.* 77:249-59.
- Sanjuan Szklarz, L.K., B. Guiard, M. Rissler, N. Wiedemann, V. Kozjak, M. van der Laan, C. Lohaus, K. Marcus, H.E. Meyer, A. Chacinska, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2005. Inactivation of the mitochondrial heat shock protein zim17 leads to aggregation of matrix hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis. *J Mol Biol.* 351:206-18.
- Savel'ev, A.S., L.A. Novikova, I.E. Kovaleva, V.N. Luzikov, W. Neupert, and T. Langer. 1998. ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J. Biol. Chem.* 273:20596-602.
- Schilke, B., J. Forster, J. Davis, P. James, W. Walter, S. Laloraya, J. Johnson, B. Miao, and E. Craig. 1996. The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 134:603-13.
- Schilke, B., B. Williams, H. Knieszner, S. Puksza, P. D'Silva, E.A. Craig, and J. Marszalek. 2006. Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr Biol.* 16:1660-5.
- Schirmer, E.C., J.R. Glover, M.A. Singer, and S. Lindquist. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 21:289-96.
- Schmidt, S., A. Strub, K. Rottgers, N. Zufall, and W. Voos. 2001. The two mitochondrial heat shock proteins 70, ssc1 and ssq1, compete for the cochaperone mge1. *J Mol Biol.* 313:13-26.

- Schmitt, M., W. Neupert, and T. Langer. 1995. Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.* 14:3434-44.
- Schneider, H., M. Arretz, E. Wachter, and W. Neupert. 1990. Matrix processing peptidase of mitochondria. Structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* 265:9881-7.
- Schneider, H.C., J. Berthold, M.F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert. 1994. Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature.* 371:768-74.
- Schonfeld, H.J., D. Schmidt, H. Schroder, and B. Bukau. 1995. The DnaK chaperone system of Escherichia coli: quaternary structures and interactions of the DnaK and GrpE components. *J Biol Chem.* 270:2183-9.
- Seaton, B.L., and L.E. Vickery. 1994. A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2066-70.
- Shomura, Y., Z. Dragovic, H.C. Chang, N. Tzvetkov, J.C. Young, J.L. Brodsky, V. Guerriero, F.U. Hartl, and A. Bracher. 2005. Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell.* 17:367-79.
- Sichting, M., D. Mokranjac, A. Azem, W. Neupert, and K. Hell. 2005. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. *Embo J.* 24:1046-56.
- Sickmann, A., 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. 2003. The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13207-12.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics.* 122:19-27.
- Silberg, J.J., K.G. Hoff, and L.E. Vickery. 1998. The Hsc66-Hsc20 chaperone system in Escherichia coli: chaperone activity and interactions with the DnaK-DnaJ-grpE system. *J Bacteriol.* 180:6617-24.
- Silver, P.A., and J.C. Way. 1993. Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell.* 74:5-6.
- Soll, J., and E. Schleiff. 2004. Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:198-208.
- Sondermann, H., A.K. Ho, L.L. Listenberger, K. Siegers, I. Moarefi, S.R. Wentz, F.U. Hartl, and J.C. Young. 2002. Prediction of novel Bag-1 homologs based on

- structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 277:33220-7.
- Stan, T., U. Ahting, M. Dembowski, K.P. Kunkele, S. Nussberger, W. Neupert, and D. Rapaport. 2000. Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J*. 19:4895-902.
- Steel, G.J., D.M. Fullerton, J.R. Tyson, and C.J. Stirling. 2004. Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science*. 303:98-101.
- Suh, W.C., W.F. Burkholder, C.Z. Lu, X. Zhao, M.E. Gottesman, and C.A. Gross. 1998. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:15223-8.
- Suzuki, C.K., K. Suda, N. Wang, and G. Schatz. 1994. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science*. 264:273-6.
- Szabo, A., R. Korszun, F.U. Hartl, and J. Flanagan. 1996. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *Embo J*. 15:408-17.
- Szabo, A., T. Langer, H. Schroder, J. Flanagan, B. Bukau, and F.U. Hartl. 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:10345-9.
- Terada, K., M. Kanazawa, B. Bukau, and M. Mori. 1997. The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *J. Cell. Biol.* 139:1089-95.
- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2005. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett*. 579:179-84.
- Teter, S.A., W.A. Houry, D. Ang, T. Tradler, D. Rockabrand, G. Fischer, P. Blum, C. Georgopoulos, and F.U. Hartl. 1999. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*. 97:755-65.
- Tilly, K., N. McKittrick, M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1983. The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell*. 34:641-6.
- Truscott, K.N., 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. 2003. A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*. 163:707-13.

- Tzagoloff, A., J. Yue, J. Jang, and M.F. Paul. 1994. A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:26144-51.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, and S.E. Holstein. 1997. Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70. *J Biol Chem.* 272:19594-600.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, S.E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L.E. Greene, and E. Eisenberg. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature.* 378:632-5.
- van Dyck, L., W. Neupert, and T. Langer. 1998. The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* 12:1515-24.
- Veinger, L., S. Diamant, J. Buchner, and P. Goloubinoff. 1998. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem.* 273:11032-7.
- Voisine, C., E.A. Craig, N. Zufall, O. von Ahsen, N. Pfanner, and W. Voos. 1999. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell.* 97:565-574.
- Voos, W., and K. Rottgers. 2002. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1592:51.
- Wagner, I., H. Arlt, L. van Dyck, T. Langer, and W. Neupert. 1994. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* 13:5135-45.
- Waizenegger, T., T. Stan, W. Neupert, and D. Rapaport. 2003. Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem.* 278:42064-71.
- Wall, D., M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1994. The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem.* 269:5446-51.
- Wall, D., M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1995. The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. *J Biol Chem.* 270:2139-44.
- Walter, J., C. Kaether, H. Steiner, and C. Haass. 2001. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol.* 11:585-90.

- Wawrzynow, A., and M. Zylicz. 1995. Divergent effects of ATP on the binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denatured protein substrates. *J Biol Chem.* 270:19300-6.
- Wegele, H., M. Haslbeck, J. Reinstein, and J. Buchner. 2003. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem.* 278:25970-6.
- Westermann, B., B. Gaume, J.M. Herrmann, W. Neupert, and E. Schwarz. 1996. Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16:7063-71.
- Westermann, B., and W. Neupert. 1997. Mdj2p, a novel DnaJ homolog in the mitochondrial inner membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 272:477-83.
- Westermann, B., C. Prip-Buus, W. Neupert, and E. Schwarz. 1995. The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J.* 14:3452-60.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature.* 424:565-71.
- Wiedmann, B., H. Sakai, T.A. Davis, and M. Wiedmann. 1994. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature.* 370:434-40.
- Winklhofer, K.F., and J. Tatzelt. 2006. The role of chaperones in Parkinson's disease and prion diseases. *Handb Exp Pharmacol:*221-58.
- Yamamoto, H., T. Momose, Y. Yatsukawa, C. Ohshima, D. Ishikawa, T. Sato, Y. Tamura, Y. Ohwa, and T. Endo. 2005. Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. *FEBS Lett.* 579:507-11.
- Young, J.C., V.R. Agashe, K. Siegers, and F.U. Hartl. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:781-91.
- Young, J.C., J.M. Barral, and F. Ulrich Hartl. 2003a. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci.* 28:541-7.
- Young, J.C., N.J. Hoogenraad, and F.U. Hartl. 2003b. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell.* 112:41-50.
- Young, J.C., I. Moarefi, and F.U. Hartl. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* 154:267-73.

- Zhu, X., X. Zhao, W.F. Burkholder, A. Gragerov, C.M. Ogata, M.E. Gottesman, and W.A. Hendrickson. 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 272:1606-14.
- Zimmermann, R., L. Muller, and B. Wullich. 2006. Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med*.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen

Mokranjac, D., M. Sichtung, W. Neupert, and K. Hell. 2003b. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22:4945-56.

Kozany, C., D. Mokranjac, M. Sichtung, W. Neupert, and K. Hell. 2004. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol.* 11:234-41.

Sichtung, M., D. Mokranjac, A. Azem, W. Neupert, and K. Hell. 2005. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. *Embo J.* 24:1046-56.

Mokranjac, D., M. Sichtung, D. Popov-Celeketic, A. Berg, K. Hell, and W. Neupert. 2005. The import motor of the yeast mitochondrial TIM23 preprotein translocase contains two different J proteins, Tim14 and Mdj2. *J. Biol. Chem.*:M502397200.

7 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. e. / C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotheritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethlyendiamintertraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
<i>H. s. / H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-N'-
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bretani
<i>M. m. / M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
<i>N. c. / N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

Abkürzungen

<i>S. c. / S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	kleines Hitzeschockprotein
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tertamethylethylendiamid
TIM	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
YPD	Hefeextrakt, Pepton, Dextrose

8 Danksagungen

Zum Gelingen meiner Doktorarbeit haben einige Menschen beigetragen. Bei ihnen möchte ich mich am Ende dieses Lebensabschnitts bedanken.

Prof. Dr. Dr. Walter Neupert danke ich dafür, dass ich an seinem Institut eine sehr lehrreiche und interessante Zeit verbringen durfte. Sein beständiges Interesse an meiner Arbeit, die vielen Diskussionen (auch über die Wissenschaft im Allgemeinen) und sein großer Elan beim Vorrantreiben meiner Projekte haben mir viel geholfen und einen großen Einfluss auf meine Entwicklung gehabt. Ich möchte ihm auch dafür danken, dass er sich stets um den Ausgleich der kulturellen Unterschiede zwischen einem Bayern und einem Berliner bemüht hat.

Prof. Dr. Soll danke ich für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie.

Die direkte Betreuung meiner Arbeit hat Dr. Kai Hell übernommen. Für die Freiheit bei der Gestaltung meiner Projekte und seine Geduld bei der Zusammenarbeit gebührt ihm mein Dank.

Von Herzen möchte ich Dr. Dejana Mokranjac danken. Die vielen Diskussionen mit ihr waren für mich sehr lehrreich und häufig Ausgangspunkt oder Bestätigung meiner Ideen. Ihr „Science is fun, don't lose faith“ hat mir durch die Zeiten geholfen, in denen sich die Wissenschaft von ihrer weniger freundlichen Seite gezeigt hat. Auch neben dem wissenschaftlichen Bereich möchte ich ihr für ihre Freundschaft danken, die mir eine große Stütze ist.

Auch meinen anderen Kollegen, die die Zeit mit mir im Neupert-Labor ertragen haben, möchte ich Dank sagen: Marc „Marci“ Preuß für viele Diskussionen beim Mittagessen und gute Freundschaft auch außerhalb des Labors. Sölchen „Clonig Queen“ Funes für gute Freundschaft sowie Rat und Tat beim Klonieren und VIEL Cappuccino. Heike Bauerschmitt, meiner permanenten Essenspartnerin, für die Begleitung bei Wind und Wetter zum Essen. Den H-Girlies Sölchen, Heike und Nikola für die Adoption in die H-Group. Christiane „Huhuhu“, Paschlein und Sandi für schöne Abende und ein paar Pfunde mehr. Marica Malesic für die besten Mitos und Heiko Germeroth für die Unterstützung meiner Arbeit. Auch meiner besten Praktikantin Conny König vielen Dank für die schöne Zusammenarbeit. Dem

Bestellteam, Anja und Nikola, für die Erleichterung meines Laborjobs und das Führen der Computerliste. Den Spülfrauen für die Bereitstellung von sauberem Arbeitsmaterialien. Allen Mitarbeitern des Neupert-Labors für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für den administrativen Teil der Arbeit geht mein Dank an Frau Farsen, ohne die ich vermutlich deutlich länger auf meine Diplomurkunde hätte warten müssen, Mama Döge, für ihre ruhige und gelassene Art, Frau Hauck und Frau Werner, die stets ein offenes Ohr und eine kleine Süßigkeit zur Hand hatte.

Für die Aufrechterhaltung des Kontaktes nach meiner Diplomarbeit und seine wertvolle Anleitung meiner ersten Schritte in die Welt der Wissenschaft danke ich Dr. Hanspeter Rottensteiner.

Den fleißigen Korrektoren dieser Arbeit Christopher Bachran, Florian Heyd, Heike Bauerschmitt und Marc Preuß sowie meinem Vater. Vielen Dank für das Fehlerfinden und alle konstruktiven Anmerkungen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir eine sorgenfreie Ausbildung ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Hans-Hermann Sichtung
Geburtsdatum: 30.05.1977
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 – 1989 Besuch der Weinmeisterhorn Grundschule in Berlin
1989 – 1996 Besuch des Kant-Gymnasiums in Berlin
Mai 1996 Abitur am Kant-Gymnasium in Berlin

Hochschulbildung

Oktober 1997 – Mai 2002 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
Oktober 2001 – Mai 2002 Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. Ralf Erdmann an der Frein Universität Berlin
Titel der Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung der peroxisomalen Biogenesefaktoren Pex7p, Pex13p, Pex14p und Pex20p aus dem filamentösen Schimmelpilz *Neurospora crassa*
Juni 2002 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Stipendien

Oktober1999 – Mai 2002 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes