

**Funktionelle Charakterisierung des
Imports des ADP/ATP-Carriers
über die TIM22-Translokase der mitochondrialen Innenmembran**

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

Maxi Endres

München

2001

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. W. Neupert (Fachvertreter: Prof. Dr. H. Domdey) betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 3.11.2000

Eingereicht zur Beurteilung am 3.11.2000

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2000

ABKÜRZUNGEN

aa	Aminosäure
a	anti
A	Ampere
AAC	ADP/ATP-Carrier
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a.u.	arbitrary units
bp	Basenpaare
bidest	doppelt destilliert
BMH	1,6-Bismaleimidohexan
BSA	Rinderserumalbumin
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Ci	Curie
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Cyt	Cytochrom
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
$\Delta\psi$	Membranpotential
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

fs	frame shift (Leserasterverschiebung)
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GIP	Generelle Insertionspore
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani (<i>E. coli</i> -Nährlösung)
MACP	maleimide activated carrier protein
MBS	m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester
MBP	Maltosebindungsprotein
MCF	Mitochondriale Carrier-Familie
m ⁷ G(5')ppp(5')G	7-Methylguanostriphosphat
MOPS	3-N-Morpholino-ethansulfonat
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
MRS	mitochondrial RNA splicing
MSF	mitochondrial import stimulation factor
mt	mitochondrial
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid
<i>N. crassa</i> (<i>N.c.</i>)	<i>Neurospora crassa</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
OM	Aussenmembran (outer membrane)
o-Phe	ortho-Phenanthrolin
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	Pyrococcus furiosus
PiC	Phosphat-Carrier
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNasin	Ribonuclease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase aus Shrimps
<i>S. cerevisiae (S.c.)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Su9	Untereinheit 9 des F ₀ -Teils der F ₁ F ₀ -ATPase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tim	Protein der Translokationsmaschinerie der Innenmembran
TIM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TM	Transmembrandomäne
Tom	Protein der Translokationsmaschinerie der Außenmembran
TOM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	enzymatische Einheiten (Unit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Val	Valinomycin
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien	3
1.1.1 Mitochondriale Proteine	4
1.2 Mitochondriale Transporterproteine	5
1.2.1 Die Familie der mitochondrialen Carrier	5
1.2.2 Der ADP/ATP-Carrier	7
1.3 Proteinimport in Mitochondrien	9
1.3.1 N-terminale und C-terminale Importsignale	13
1.3.2 Interne Importsignale	14
1.3.3 Proteinimport über die mitochondriale Außenmembran	16
1.3.4 Import über die mitochondriale Innenmembran durch die TIM23- Translokase	17
1.3.5 Die Translokationsmaschinerie mitochondrialer Substrattransporterproteine der Innenmembran	20
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Molekularbiologische Methoden	24
2.1.1 Präparation von DNA	24
2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	24
2.1.1.2 Isolierung von DNA aus S. cerevisiae	25
2.1.1.3 Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.1.2 Enzymatische Modifikationen von DNA	27
2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA	27

2.1.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase	28
2.1.2.3 Auffüllen überhängender DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym	28
2.1.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	29
2.1.3 Reinigung und Analyse von DNA	29
2.1.3.1 Konzentrationsbestimmung der DNA	29
2.1.3.2 Phenolextraktion und Ethanolfällung	29
2.1.3.3 Gelelektrophorese von DNA	30
2.1.3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	31
2.1.3.5 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen	32
2.1.4 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	32
2.1.5 Verwendete Plasmide	33
2.1.6 Klonierungsstrategien	35
2.2 Hefegenetische Methoden	40
2.2.1 Verwendete Stämme von S. cerevisiae	40
2.2.2 Kultivierung von S. cerevisiae	40
2.3 Zellbiologische Methoden	41
2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus S. cerevisiae	41
2.3.2 Isolierung von [³⁵ S]-markierten Hefemitochondrien	42
2.3.3 <i>In vitro</i> -Proteinimport in isolierte Mitochondrien	44
2.3.4 Proteaseverdau von nichtimportierten Vorstufenproteinen und Import-Intermediaten	45
2.3.5 Chase von Import-Intermediaten	46
2.3.6 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen	47
2.3.7 Carbonatextraktion	47
2.4 Proteinbiochemische Methoden	48
2.4.1 Proteinanalytische Methoden	48
2.4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.4.1.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	48
2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.4.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)	50
2.4.1.5 Autoradiographie und Densitometrie	50

2.4.2	Präparation von Proteinen	51
2.4.2.1	Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine in vitro	51
2.4.2.2	Expression rekombinanter Proteine in E. coli	52
2.4.2.3	Reinigung von Proteinen mit His-tag über Ni-NTA	53
2.4.2.4	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen über Amyloseharz	54
2.4.2.5	Bestimmung des Zinkgehalts der rekombinanten Proteine	56
2.4.3	Gelfiltration	56
2.4.4	Blaue Nativgelelektrophorese	57
2.4.5	Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine	59
2.5	Immunologische Methoden	60
2.5.1	Kopplung synthetischer Peptide an Ovalbumin oder KLH	60
2.5.2	Gewinnung polyklonaler Antikörper	61
2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	62
2.5.4	Immunfällungen	64
2.5.5	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen	65
2.6	Materialien	66
2.6.1	Verwendete Stämme von E. coli	66
2.6.2	Häufig verwendete Medien und Puffer	67
2.6.3	Chemikalien und Enzyme	68
2.6.4	Laborgeräte	70
3.	ERGEBNISSE	72
3. 1	Rolle von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Import von Proteinen mit internem Sortierungssignal in die Innenmembran	72
3.1.1	Tim9, Tim10 und Tim12	72
3.1.2	Membranassoziation von Tim9, Tim10 und Tim12	73
3.1.3	Interaktion von Tim9, Tim10, Tim12 mit der Tim22-Translokase	75
3.1.4	Rolle von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Proteinimport	79
3.1.4.1	Import von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz im Vergleich zu Proteinen mit internem Sortierungssignal	82

3.1.4.2 Rolle von Tim9 beim Import des AAC	83
3.1.5 Tim10 und Tim12 sind zinkfingerähnliche Proteine	84
3.1.5.1 Expression der Fusionsproteine MBP- α -Untereinheit der β -Galaktosidase, MBP-Tim10 und MBP-Tim12	85
3.1.5.2 MBP- α -Untereinheit der β -Galaktosidase, MBP-Tim10 und MBP-Tim12 sind zinkbindende Proteine	86
3.2 Import und Insertion des AAC in die Innenmembran	86
3.2.1 Modulare Struktur des AAC	86
3.2.2 Import der einzelnen Module des AAC	87
3.2.3 Interaktion des AAC auf Stufe III mit dem TOM-Komplex	92
3.2.4 Charakterisierung des membranpotentialabhängigen Insertions-signals des AAC liegt in Modul 3	94
3.2.5 Der C-terminale Bereich des AAC wird für die Insertion in die Innenmembran benötigt	96
3.2.6 Interaktion der AAC-Module mit Tim10, Tim12 und Tim22	97
3.2.7 Interaktion von Stufe III-Translokationsintermediaten der AAC-Module mit Tim10	99
3.2.8 Wechselwirkung des AAC mit dem löslichen Tim9·10-Komplex	101
3.2.9 Interaktion von Stufe III- Intermediaten mit Tim12	104
3.2.10 Das Stufe III-Intermediat des AAC akkumuliert an Kontaktstellen	106
3.2.11 Topologie des AAC auf Stufe III	107
3.2.12 Die proteolytischen Fragmente des AAC auf Stufe III resultieren aus der Spaltung eines Translokationsintermediats an alternativen Schnittstellen	110
4. DISKUSSION	113
4.1 Tim9, Tim10 und Tim12 sind Komponenten des TIM22-Komplexes	113
4.1.1 Tim9, Tim10 und Tim12 sind mit Tim22 in einem Komplex assoziiert	113
4.1.2 Tim9, Tim10 und Tim12 werden für den Import von Proteinen mit internem Sortierungssignal benötigt	114
4.1.3 Sequentielle Interaktion von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Import des AAC in die Innenmembran	115

4.1.4 Das Zinkfinger-Motiv von Tim10 und Tim12 könnte eine Rolle beim Proteinimport von Proteinen mit internem Sortierungssignal spielen	116
4.2 Transport des ADP/ATP-Carriers vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex	119
4.2.1 Jedes Modul des AAC besitzt ein unabhängiges Importsignal	119
4.2.2 Die Interaktion des Stufe III-Intermediats des AAC mit dem TOM-Komplex wird durch Modul 3 vermittelt	120
4.2.3 Modul 3 vermittelt die Insertion des AAC in die Innenmembran	120
4.2.4 Interaktion von Tim-Komponenten mit Stufe III-Translokationsintermediaten	121
4.2.5 Akkumulation des AAC an Kontaktstellen	122
4.2.6 Topologie von AAC-Translokationsintermediaten	123
4.3 Modell des Imports des AAC	124
5. ZUSAMMENFASSUNG	128
6. LITERATUR	130

Einleitung

Die eukaryontische Zelle ist in ihrem Inneren durch Lipidmembranen in verschiedene Zellorganellen unterteilt. Zu den Zellorganellen gehören der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, die Lysosomen und Endosomen, die Peroxisomen, die Mitochondrien sowie in Pflanzen die Chloroplasten. Die meisten von ihnen sind von einer Membran umschlossen, Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten von einer Doppelmembran. Die Kompartimentierung erlaubt es, daß verschiedene Stoffwechselfvorgänge in derselben Zelle in unterschiedlichen chemischen Milieus ablaufen. Jede Zellorganelle enthält einen eigenen, typischen Satz an Proteinen. Die überwiegende Zahl der Proteine der Organellen ist im Zellkern kodiert. Die Vorstufenproteine werden im Cytosol translatiert und werden von dort aus in die jeweils zugehörige Organelle transportiert. Dies kann während der Synthese (kotranslational) oder nach der Synthese (posttranslational) erfolgen. Da die Lipidmembranen der Zellorganellen undurchlässig für Makromoleküle wie auch für Ionen und andere hydrophile Moleküle (mit Ausnahme von Wasser) sind, besitzen die Membranen spezifische Transportsysteme.

Die Mechanismen der Translokation von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum, in die Mitochondrien, in die Chloroplasten und in die Plasmamembran folgen einerseits gemeinsamen, andererseits unterschiedlichen Prinzipien (Übersichtsartikel: Rapoport *et al.*, 1996; Johnson 1997; Neupert, 1997; Klösigen *et al.*, 1997; Dalbey und Robinson, 1999): Die Proteine besitzen Erkennungssignale, die für das jeweilige Kompartiment spezifisch sind. Rezeptoren auf der Membran der Zellorganellen erkennen diese Sequenzen und geben die Proteine an die Translokationsapparate weiter. Diese stellen hochmolekulare, integrale Proteinkomplexe dar, die wahrscheinlich proteinleitende Kanäle bilden. Für die Translokation von Proteinen wird Energie aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten oder in Form eines pH-Gradienten oder eines Membranpotentials bereitgestellt. Während der Translokation müssen die Polypeptidketten meist im entfalteten Zustand vorliegen (Eilers und Schatz, 1986; Rassow *et al.*, 1990; Arkowitz *et al.*, 1993; Schlenstedt *et al.*, 1994). Beim kotranslationalen Transport der Proteine in das ER wird dies dadurch erreicht, daß die naszierende Polypeptidkette direkt in den Translokationsapparat inseriert wird. Soll eine Polypeptidkette jedoch posttranslational über eine Membran transportiert werden, so muß sie im Cytosol von bestimmten Hilfsproteinen, den sog. Chaperonen, gebunden und damit in einem teilweise

Einleitung

entfalteten Zustand gehalten werden (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Caplan *et al.*, 1992). Weitere Chaperone auf der luminalen Seite der Membran sind sowohl an der Translokation als auch an der Faltung und Assemblierung in die native Konformation des Proteins im Zielkompartiment beteiligt (Craig, 1993; Stuart *et al.*, 1994a).

Es gibt einige Translokationsprozesse, bei denen Proteine in gefaltetem Zustand transportiert werden können. Dazu gehören der Transport in den Zellkern und in die Peroxisomen, sowie die Translokation von Proteinen mit prosthetischen Gruppen in Chloroplasten und Prokaryonten (Creighton *et al.*, 1995; Walton *et al.*, 1995; Erdmann *et al.*, 1997; Ullman *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Proteintranslokation in Mitochondrien, die unerlässlich ist für deren Funktion und Biogenese.

1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in nahezu allen eukaryontischen Zellen vorkommen. Sie stammen vermutlich von Vorläufern der heutigen Eubakterien ab, die als Endosymbionten von primitiven Eukaryonten vor rund 1,5 Milliarden Jahren ins Cytosol aufgenommen wurden (Herrmann, 1997; Gray *et al.*, 1999). Mittlerweile sind sie für die eukaryontischen Zellen essentiell, da sie wichtige Stoffwechselfunktionen übernommen haben. Mitochondrien sind der Ort der energieliefernden Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung und des Citratcyclus. Daneben finden dort auch eine Reihe weiterer Stoffwechselprozesse statt, wie z.B. der Fettsäureabbau oder Reaktionen bei der Synthese von Aminosäuren, Pyrimidinen, Phospholipiden, Nukleotiden, Häm und anderer Metaboliten (Attardi und Schatz, 1988).

Mitochondrien werden nicht *de novo* gebildet, sondern werden bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben (Yaffe, 1996 und 1999). Damit sich ein Mitochondrium teilen kann, muß es zunächst in seiner Größe anwachsen; es müssen also Proteinkomponenten importiert und in bereits existierende Strukturen eingefügt werden. An diesen Wachstumsprozess schließt sich die Teilung der Organelle an, gefolgt von der Weitergabe an

die Tochterzellen. Diese erhalten somit einen vollständigen Satz spezialisierter Membranen mit funktionellen Proteinkomplexen.

Mitochondrien sind in der Regel länglich oder oval (0,5 bis 1 μm Durchmesser und 2 bis 3 μm Länge), und sie bilden in der Zelle ausgedehnte Netzwerke aus (Chen, 1988; Bereiter-Hahn, 1990, Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Sie sind durch zwei Lipidmembranen begrenzt, die die Organelle in vier Subkompartimente unterteilen: Die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix. Die Innenmembran bildet sog. Cristae aus, Einstülpungen in die von ihr umschlossene Matrix. Cristae machen den Hauptteil der mitochondrialen Innenmembran aus und beinhalten unter anderem die Komponenten der Atmungskette. Der Anteil der Innenmembran, der eng an der Außenmembran anliegt, wird als innere Grenzmembran bezeichnet. Hier befinden sich die sog. Kontaktstellen, an denen die Proteintranslokasen der beiden Membranen miteinander kooperieren. Die mitochondriale Innenmembran ist undurchlässig für Ionen und polare Moleküle, die nur über spezifische Transportsysteme über die Membran gelangen können (Bernardi, 1999). Die Außenmembran dagegen enthält das porenbildende, integrale Membranprotein Porin, das sie für Moleküle bis zu etwa 6 kDa durchlässig macht.

1.1.1 Mitochondriale Proteine

Mitochondrien enthalten etwa 500 bis 1000 verschiedene Proteine. Obwohl sie in der Hefe *S. cerevisiae* ein eigenes Genom von 74 bis 85 kb sowie ein eigenständiges Proteinsynthesystem besitzen, wird nur ein sehr geringer Teil der Proteine mitochondrial kodiert und in der Matrix synthetisiert (Grivell, 1995). In der Hefe *S. cerevisiae* werden nur acht Proteine vom mitochondrialen Genom kodiert (Borst und Grivell, 1978; Tzagoloff und Meyers, 1986). Dies sind Cytochrom *b* der Ubiquinon-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (Komplex III), COXI, COXII, COXIII der Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), und die Untereinheiten 6, 8, 9 der F_1F_0 -ATPase (Komplex V) sowie Var1, eine Untereinheit mitochondrialer Ribosomen. Außerdem kodiert das mitochondriale Genom für ribosomale RNA und den Großteil der mitochondrialen tRNAs (Grivell, 1995).

Einleitung

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine ist dagegen im Zellkern kodiert und wird im Cytosol translatiert. Diese Proteine werden posttranslational in das jeweilige mitochondriale Subkompartiment importiert. Die Innenmembran enthält neben den Komponenten der Atmungskette auch mitochondriale Carrier, die für die Stoffwechselfvorgänge in Mitochondrien benötigt werden. Im folgenden wird die Familie der mitochondrialen Substrattransporterproteine mit ihrem gut charakterisierten Vertreter des ADP/ATP-Carriers näher beschrieben.

1.2 Mitochondriale Transporterproteine

1.2.1 Die Familie der mitochondrialen Carrier

Für die Energiegewinnung in Mitochondrien müssen spezifische Metabolite über die Innenmembran transportiert werden. Der Transport vieler Metabolite erfolgt durch Proteine der mitochondrialen Carrier-Familie (MCF) (Palmieri *et al.*, 1994 und 1996; Nelson *et al.*, 1998). Bisher konnten 37 Proteine aus verschiedenen Organismen identifiziert werden (Kuan und Saier, 1993a, b). In der Hefe *S. cerevisiae* wurden 35 Gene identifiziert, die in 27 Subfamilien eingeteilt wurden (El Moulaj *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1998). Zu den transportierten Metaboliten gehören die Anionen ADP/ATP, Phosphat, Oxoglutarat/Malat, Aspartat/Glutamat, Citrat, Pyruvat, Dicarboxylat, verzweigte Ketosäuren wie auch die Zwitterionen Carnitin und Ornithin, Spermidin und Glutamin (Palmieri, 1994; Nelson *et al.*, 1998). Der Transport der Substrate erfolgt dabei als Symport, Antiport oder Uniport (Pratt *et al.*, 1991; Palmieri, 1994). Zur Familie der mitochondrialen Carrier gehören auch Proteine mit bisher unbekanntem Substrat, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zugeordnet wurden (Palmieri *et al.*, 1994 und 1996; Weber *et al.* 1997; del Arco und Satrustegui, 1998; Camacho *et al.*, 1999).

Alle Mitglieder der MCF sind integrale Membranproteine der Innenmembran aus etwa 300 Aminosäureresten. Die mitochondriale Carrier-Familie zeichnet sich durch die repetitive Struktur aus drei Modulen aus. Jeder Modul besteht aus zwei Transmembransegmenten, die durch einen hydrophilen Loop verbunden sind (Saraste und Walker, 1982). Diese Schleife ist

in die Matrix exponiert und enthält unmittelbar nach der ersten Transmembrandomäne die sog. „Carrier-Signatur“ mit der Konsensussequenz Ph(D,E)_{xx}(K,R)_x(K,R) („h“ ist eine hydrophobe, „x“ eine beliebige Aminosäure) (Nelson *et al.*, 1998). Sowohl das Motiv als auch die Lokalisierung sind in allen Mitgliedern der mitochondrialen Carrier-Familie konserviert. Je nach den Auswahlkriterien für die Sequenzähnlichkeit wurden auch längere Carrier-Signaturen vorgeschlagen (Kuan und Saier, 1993; Palmieri, 1994).

Es wird angenommen, daß die Carrier-Module in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer von etwa 100 Aminosäuren durch Genduplikation hervorgegangen sind (Palmieri *et al.*, 1994 und 1996; Nelson *et al.*, 1998). Darauf weist auch die Position der Introns in den Genen mehrerer Carrier hin (Dolce *et al.*, 1994; Iacobazzi *et al.*, 1997). Defekte in manchen mitochondrialen Carriern führen in der Hefe *S. cerevisiae* zu verlangsamtem Zellwachstum oder zum Verlust der respiratorischen Aktivität (Kuan und Saier, 1993; Huizing *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1998; Camacho *et al.*, 1999).

1.2.2 ADP/ATP-Carrier

ADP/ATP-Carrier (AAC) sind von entscheidender Bedeutung für die Energieversorgung eukaryontischer Zellen. Sie transportieren cytosolisches ADP über die mitochondriale Innenmembran in die Matrix im Austausch gegen ATP, das dort durch oxidative Phosphorylierung gebildet wird (Heldt und Klingenberg, 1965; Duee und Vignais, 1965). Es gibt drei Isoformen des AAC. In Säugerzellen werden zwei der drei Isoformen gewebespezifisch exprimiert werden. Gewebespezifische Isoformen sind zwischen verschiedenen Spezies konservierter als verschiedene Isoformen in derselben Spezies (Huizing *et al.*, 1998). Bisher wurden 29 AAC-Sequenzen in verschiedenen Organismen identifiziert (Fiore *et al.*, 1998). AACs können in Geweben mit hohem Energiebedarf, z.B. im Herzmuskel, bis zu 10% des Gesamtproteins der Innenmembran betragen.

Der AAC ist ein kernkodierte Protein, das über die TIM22-Translokase in Mitochondrien importiert wird und in der Innenmembran als Dimer vorliegt (Ricchio *et al.*, 1975; Hackenberg und Klingenberg, 1980; Majima *et al.*, 1995; Sirrenberg *et al.*, 1998). Die Vorstufe besitzt keine N-terminale spaltbare Präsequenz, sondern mindestens zwei bisher nicht näher

Einleitung

charakterisierte interne Importsignale (s. Kap. 1.3.1). Der ADP/ATP-Carrier ist wie alle Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie aus drei repetitiven Modulen aufgebaut.

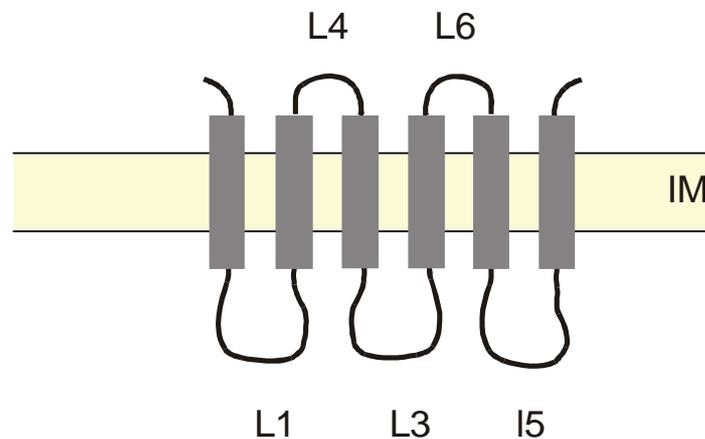


Abb. 1: Der ADP/ATP-Carrier

Abkürzungen: IM, Innenmembran; L: Loop

Der ADP/ATP-Carrier kann zwei Konformationen einnehmen: die C- bzw. M-Konformation (Klingenberg, 1989). Dabei sind die Loopregionen 1 und 3 (s. Abb. 1) in der C-Konformation zum Cytosol, in der M-Konformation zur Matrix-Seite exponiert. Die Loopregionen 1 und 3 vermitteln die Bindung der Nukleotide und transportieren sie nach einem „Swinging gate“-Mechanismus (Mayinger *et al.*, 1989; Majima *et al.* 1994 und 1995). Der AAC kann durch natürliche Gifte spezifisch inhibiert werden. Die Inhibitoren gehören zu zwei Familien, Atractylosid und Carboxyatractyloside bzw. Bongkrekssäure und Isobongkrekssäure, die an AAC spezifisch in der C- bzw. M-Form binden (Klingenberg, 1989 und 1993; Brandolin *et al.*, 1993; Roux *et al.*, 1996). Die Bindungsrate für ADP und ATP ist in beiden Konformationen gleich. Nur während der Zellatmung wird extromitochondriales ADP^{3-} gegen intramitochondriales ATP^{4-} ausgetauscht. Es wird vermutet, daß dieser asymmetrische Transport ohne Ladungsausgleich von der Anwesenheit eines Membranpotentials (außen positiv) abhängt (Krämer und Klingenberg, 1980; Saraste und Walker, 1982).

1.3 Proteinimport in Mitochondrien

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine wird an cytosolischen Ribosomen translatiert und nachfolgend in Mitochondrien importiert. Im Cytosol werden die Vorstufenproteine von Hilfsproteinen in einer translokationskompetenten Konformation gehalten. Sie werden von Hsp70-Proteinen der Ssa-Familie (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988), dem Cochaperon der Ssa-Proteine, Ydj1p, (Atenico und Yaffe, 1992; Caplan *et al.*, 1992) oder von MSF (mitochondrial import stimulation factor) gebunden, der mitochondriale Vorstufenproteine in einer translokationskompetenten Form hält, mitochondriale Präsequenzen erkennt und den Transfer von Vorstufenproteinen an mitochondriale Rezeptoren vermittelt (Hachiya *et al.*, 1993 und 1994; Mihara und Omura, 1996).

Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die Importwege in Mitochondrien, die in den letzten Jahren in *S. cerevisiae* und *N. crassa* identifiziert und charakterisiert wurden. Die Translokasen der Außen- und der Innenmembran (TOM- bzw. TIM-Komplexe) vermitteln den Import in die mitochondrialen Subkompartimente und werden in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben (Übersichtsartikel: Neupert, 1997; Pfanner und Meijer, 1997; Koehler *et al.*, 1999; Voos *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2000).

Der Transport von Vorstufenproteinen in Mitochondrien ist posttranslational. Spezifische Erkennungssignale der zu translozierenden Vorstufenproteine vermitteln die Bindung an Rezeptoren an der Oberfläche der Zellorganelle (Bauer *et al.*, 2000; Künkele *et al.*, 1998). Für die Translokation müssen die Proteine in entfalteter Konformation vorliegen (Eilers und Schatz, 1986; Rassow *et al.*, 1990; Arkowitz *et al.*, 1993; Gaume *et al.*, 1998). Der Transport über die mitochondriale Außen- und Innenmembran erfolgt durch proteinleitende Kanäle. Dies sind hochmolekulare Proteinkomplexe, die aus mehreren Untereinheiten bestehen (Übersichtsartikel: Neupert, 1997; Koehler *et al.*, 1999; Voos *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2000). Für die Translokation von Vorstufenproteinen über die Innenmembran wird Energie in Form von ATP und einem Membranpotential benötigt (Gawaz *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1991; Berthold *et al.*, 1995). Während oder nach der Translokation über die Innenmembran werden N-terminale Präsequenzen durch mitochondriale Peptidasen prozessiert (von Heijne, 1998).

Einleitung

Der TOM-Komplex vermittelt den Import von Präproteinen in die Außenmembran und den Intermembranraum (Segui-Real *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993; Steiner *et al.*, 1995; Künkele *et al.*, 1998). Für den Import in die Innenmembran oder die Matrix kooperiert der TOM-Komplex mit den Translokasen der Innenmembran, dem TIM23- und dem TIM22-Komplex. Es werden sog. Translokationskontaktstellen ausgebildet, an welchen Außen- und Innenmembran räumlich benachbart sind und eine koordinierte Translokation der Präproteine stattfindet (Schleyer und Neupert, 1985; Schwaiger *et al.*, 1987; Rassow *et al.*, 1990; Schülke *et al.*, 1997).

Eine wichtige Rolle vor, während und nach dem Proteinimport spielen Chaperone. Diese Hilfsproteine stabilisieren Faltungsintermediate durch Bindung an exponierte hydrophobe Proteinsegmente und verhindern deren Aggregation. Im Cytosol sind Mitglieder der Hsp70-Familie sowie MSF (mitochondrial import stimulation factor) beteiligt (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Hachiya *et al.*, 1993 und 1994; Mihara und Omura, 1996; Hartl, 1996). Während des Transports der Polypeptidketten über die Membran wird dieser durch ATP-abhängige Zyklen des Bindens und des Loslassens von mitochondrialem Hsp70 vorangetrieben (Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Matouschek *et al.*, 1997; Gaume *et al.*, 1998). Nach dem Import unterstützen Chaperone die effiziente Ausbildung der nativen Struktur der importierten Proteine und vermitteln deren Assemblierung in höhermolekulare Proteinkomplexe (Craig, 1993; Buchner, 1996; Hartl, 1996)

Für den Import der Präproteine werden Signale benötigt, die am N- oder am C-Terminus oder intern liegen können.

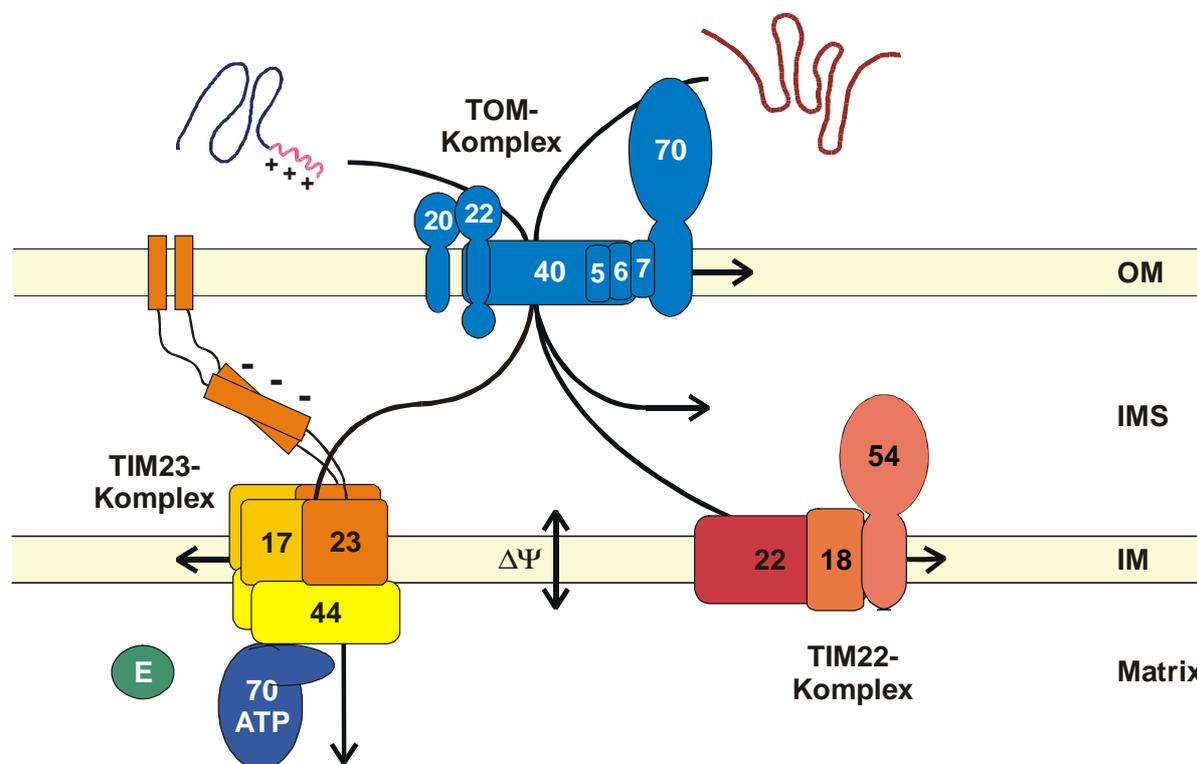


Abb. 2: Übersicht zum Proteinimport in Mitochondrien.

Kernkodierte, cytosolisch translatierte Vorstufenproteine werden durch TOM-Rezeptoren auf der Oberfläche der Mitochondrien erkannt. Der TOM-Komplex sowie die beiden TIM-Komplexe vermitteln den Import in die submitochondrialen Kompartimente. Nähere Beschreibung im Text. Abkürzungen: OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; IMS, Intermembranraum; Tom, „translocase of the outer membrane; Tim, „translocase of the inner membrane“ (die Zahlen entsprechen der molaren Masse in kDa des jeweiligen Proteins); 70: mtHsp70; E, Mge1p, Nukleotidaustauschfaktor; $\Delta\psi$: Membranpotential.

1.3.1 N-terminale und C-terminale Importsignale

Als mitochondriale Importsignale werden Sequenzen in Vorstufenproteinen bezeichnet, die notwendig für die Translokation kernkodierter, cytosolisch translaterter Präproteine in Mitochondrien sind (Neupert, 1997; Diekert *et al.*, 1999; Künkele *et al.*, 1998:).

Für den Import in die Matrix ist das Erkennungssignal meist am N-Terminus des Vorstufenproteins lokalisiert. Es besteht aus 20 bis 60 Aminosäureresten, die die Fähigkeit besitzen, in Membranen bzw. Lipidumgebung eine amphipathische α -Helix auszubilden, in wässriger Lösung dagegen geringe strukturelle Organisation aufweisen (von Heijne, 1986; Roise und Schatz, 1988). Die Präsequenz ist meist reich an basischen und hydroxylierten Resten, die auf einer Seite der Helix lokalisiert sind, wohingegen die andere Seite der Helix ungeladen ist. Es wird angenommen, daß der basische Bereich der Helix sequentiell an Regionen der Importkomponenten der Außen- und Innenmembran bindet, die reich an sauren Aminosäureresten sind (Komiya *et al.*, 1998). Bis auf wenige Ausnahmen sind die Präsequenzen frei von negativen Ladungen (von Heijne, 1986; Heard und Weiner, 1998). Die N-terminalen Präsequenzen verschiedener mitochondrialer Proteine weisen keine Sequenzhomologien auf, vielmehr sind die Struktur und die Ladungsverteilung der amphipathischen Helix ausschlaggebend für ihre Funktion (Hurt und Schatz, 1987; von Heijne *et al.*, 1989). An cytosolische Proteine (z.B. Dihydrofolatreduktase, DHFR) fusioniert, vermitteln sie deren Import in die mitochondriale Matrix (Hurt *et al.*, 1984 und 1985; Horwich *et al.*, 1985). Während oder nach dem Import wird die Präsequenz in der Matrix durch MPP abgespalten (s. Kap. 1.3.4).

Das Importsignal der DNA-Helicase Hmi1p, ein mitochondriales Matrix-Protein, ist am C-Terminus lokalisiert. Es bildet wie die N-terminalen Präsequenzen eine amphipathische α -Helix aus. Das Signal ist in der Lage, an den C-Terminus oder N-Terminus von DHFR fusioniert, dieses in die Matrix zu importieren (Lee *et al.*, 1999). Der Import kann also in C→N-Richtung wie auch in N→C-Richtung stattfinden. Ein Import in C→N-Richtung wurde ebenfalls für das BCS1-Protein gezeigt. (Fölsch *et al.*, 1998). BCS1 besitzt ein internes Importsignal (Fölsch *et al.*, 1996), auf das im nächsten Kapitel eingegangen wird.

1.3.2 Interne Importsignale

Für posttranslational importierte mitochondriale Proteine, die keine abspaltbare Präsequenz aufweisen, wurden interne Importsignale vorgeschlagen (Übersichtsartikel: Lill und Neupert, 1996; Schatz, 1996; Neupert, 1997; Diekert *et al.*, 1999; Endres *et al.*, 1999). Das Importsignal kann dabei aus einer nichtabspaltbaren N-terminalen Präsequenz bestehen oder innerhalb des Proteins liegen.

Für einige Außenmembranproteine wurde vorgeschlagen, daß eine Transmembranregion einen entscheidenden Beitrag zum Erkennungssignal leistet, wie für die Außenmembranproteine Tom20, Tom22 und Tom70 (McBride *et al.*, 1992). Die Importsignale der β -Barrel-Proteine Porin und Tom40 sowie aller anderen Außenmembranproteine sind dagegen nicht bekannt.

Die meisten Intermembranraumproteine mit internen, nicht spaltbaren Importsignalen werden membranpotentialunabhängig in Abwesenheit von ATP über die Außenmembran transloziert. Diese Signale wurden bisher nicht näher charakterisiert (Lill und Neupert, 1996). Cytochrom c_1 und Cytochrom b_2 werden über die Innenmembran in den Intermembranraum importiert. Hierzu besitzen sie zweigeteiltes, N-terminales Importsignal (Gruhler *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 1998). Die erste Hälfte des Signals wird nach Eintritt des N-Terminus in die Matrix durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase abgespalten, die zweite Hälfte im Intermembranraum durch die Peptidase Imp2.

Viele Proteine der Innenmembran besitzen ebenfalls interne Importsignale. Über diese ist wenig bekannt. Bisläng wurden nur die internen Importsignale der Innenmembran-Proteine BCS1 und Cytochrom c_1 näher charakterisiert. Das BCS1-Protein besitzt einen Sequenzbereich, der eine amphipathische α -Helix ausbilden kann. Die apolare Seite dieser Helix kann mit der darauffolgenden Transmembrandomäne interagieren und eine bildet wahrscheinlich eine Haarnadelstruktur aus. Diese Haarnadelschleife kann über die Außenmembran transloziert und in die Innenmembran inseriert werden (Fölsch *et al.*, 1996 und 1998; Gaume *et al.*, 1998). Cytochrom c_1 besitzt am C-Terminus ebenfalls einen Bereich, der eine solche Haarnadelstruktur ausbilden könnte und für die Insertion in die Innenmembran verantwortlich ist. Dieses Signal ist für den vollständigen Import über die Außenmembran

Einleitung

nicht ausreichend, für die Translokation des N-terminalen Sequenzbereichs wird eine N-terminale abspaltbare Präsequenz benötigt (Arnold *et al.*, 1998).

Die meisten Matrixproteine besitzen eine N-terminale, abspaltbare Präsequenz. Es sind allerdings auch Proteine mit internen Importsignalen bekannt wie Cpn10 (Rospert *et al.*, 1993a und 1993b). Ein weiteres Beispiel ist das Matrixprotein MTF1, das unabhängig von den Rezeptoren der Außenmembran, ATP und einem Membranpotential importiert wird (Sanyal und Getz, 1995).

1.3.3 Proteinimport über die mitochondriale Außenmembran

Die Proteintranslokation über die Außenmembran wird durch den TOM-Komplex (TOM: Translocase of the outer membrane) vermittelt (Übersichtsartikel: Lill und Neupert, 1996; Neupert, 1997; Ryan und Pfanner, 1998). Er besteht in der Hefe *S. cerevisiae* aus mindestens sieben Proteinen (Künkele *et al.*, 1998). Alle Komponenten sind integrale Membranproteine. Die Rezeptorproteine des TOM-Komplex, Tom20, Tom22, und Tom71 besitzen hydrophile, cytosolische Domänen (Söllner *et al.*, 1989; Tom70 (Hines *et al.*, 1990; Söllner *et al.*, 1990; Steger *et al.*, 1990; Kiebler *et al.*, 1993; Ramage *et al.*, 1993; Hönlinger *et al.*, 1995; Schlossmann *et al.*, 1996). Die Komponenten der Translokationspore, Tom40, Tom5, Tom6 und Tom7 sind nahezu vollständig in die Lipidmembran eingebettet (Vestweber *et al.*, 1989; Kiebler *et al.*, 1990; Kassenbrock *et al.*, 1993; Alconada *et al.*, 1995; Hönlinger *et al.*, 1996; Dietmeier *et al.*, 1997).

Die Rezeptoren bilden zwei Subkomplexe aus: Der Tom20-Tom22-Subkomplex erkennt Vorstufenproteine mit einer N-terminalen Matrixsignalsequenz und vermittelt auch die Insertion von Vorstufenproteinen, die initial an den hauptsächlich von Tom70 gebildeten Subkomplex binden (Mayer *et al.*, 1995; Lill und Neupert, 1996; Brix *et al.*, 1997). Dazu gehören Präproteine mit internen Importsignalen (Dietmeier *et al.*, 1993; Schlossmann *et al.*, 1994; Palmisano *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1999). Der Transport über die Außenmembran erfolgt durch eine Translokationspore (GIP: General Import Pore), die von Tom40 im Komplex mit Tom5, Tom6 und Tom7 gebildet wird (Lill und Neupert, 1996). Tom40 ist die zentrale Komponente dieses Kanals (Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998; Ahting *et al.*, 1999).

Tom5 vermittelt die Insertion der rezeptorgebundenen Präproteine in die GIP (Dietmeier *et al.*, 1997). Für Tom6 und Tom7 wird eine regulatorische Funktion bei der Komplexstabilität der GIP (Hönlinger *et al.*, 1996; Kübrich *et al.*, 1998) vorgeschlagen.

1.3.4 Import über die mitochondriale Innenmembran durch die TIM23-Translokase

Die Translokation von Vorstufenproteinen mit N-terminaler, abspaltbarer Präsequenz über die Innenmembran in die Matrix erfolgt über den TIM23-Komplex (TIM: Translocase of the innner membrane) (Übersichtsartikel: Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 1997; Rassow *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2000) mit seinen essentiellen integralen Komponenten Tim23, Tim17 und dem peripher auf der Matrixseite assoziierten Tim44 (Maarse *et al.*, 1992; Scherer *et al.*, 1992; Dekker *et al.*, 1993; Emtage und Jensen, 1993; Blom *et al.*, 1993; Kübrich *et al.*, 1994; Maarse *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1994). Wahrscheinlich enthält der Komplex von 250 kDa noch weitere Proteine, die bisher nicht identifiziert wurden (Berthold *et al.*, 1995; Blom *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1999). Tim44 rekrutiert das mtHsp70, an das Mge1p aus der Matrix binden kann (Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Bolliger *et al.*, 1994; Laloraya *et al.*, 1995). Tim23, Tim17 und Tim44 liegen in äquimolaren Mengen im TIM23-Komplex vor. Tim23 und Tim44 bilden Dimere aus (Bauer *et al.*, 1996; Moro *et al.*, 1999).

Für die initiale Translokation der Präsequenz wird ein Membranpotential, $\Delta\psi$, benötigt (Schleyer *et al.*, 1982; Martin *et al.*, 1991). Dies kann durch den elektrophoretischen Effekt erklärt werden, der auf die positiv geladene Präsequenz wirkt. Es wird ebenfalls diskutiert, daß die Präsequenz eine Domäne im N-terminalen Bereich von Tim23 binden könnte, die als Rezeptor fungiert. Tim23 liegt membranpotentialabhängig als Dimer vor, das durch die Wechselwirkung mit der Präsequenz dissoziiert (Bauer *et al.*, 1996). Die Präsequenz wird demnach in den proteinleitenden Kanal inseriert, der aus Tim23 und Tim17 besteht und vermutlich eine passive Pore besitzt (Ungermann *et al.*, 1994; Berthold *et al.*, 1995). Tim23 und Tim17 besitzen Sequenzähnlichkeit und durchspannen die Innenmembran viermal (Maarse *et al.*, 1994; Ryan und Jensen, 1995). Auf der Matrixseite des Kanals ist Tim44 peripher assoziiert. Tim44 rekrutiert mtHsp70, das ATP gebunden hat, an den Ausgang der Pore und vermittelt dessen Assoziation mit der durchtretenden entfalteten Polypeptidkette.

Einleitung

Der Kontakt stimuliert die Hydrolyse von ATP durch mtHsp70, das erst in seiner ADP-Form mit hoher Affinität an das Vorstufenprotein bindet. Nun kann die Polypeptidkette nicht mehr in einer retrograden Bewegung in den Kanal zurückgleiten (Cyr *et al.*, 1993; Ungermann *et al.*, 1994). Nach der ATP-Hydrolyse dissoziiert mtHsp70 unter Beteiligung von Mge1p von Tim44 ab (Westermann *et al.*, 1995; Schneider *et al.*; 1996). Das Präprotein mit gebundenem mtHsp70 kann sich jetzt unidirektional in die Matrix bewegen (Modell des Brownschen Sperrhakens). Tim44 bindet nun wieder ein neues mtHsp70 in ATP-Form aus der Matrix. Ein nachfolgendes Segment der Polypeptidkette kann am Ausgang des Kanals in einem neuen Zyklus mtHsp70 binden, wodurch ein gerichteter Transport zustande kommt. Zur vollständigen Translokation der Polypeptidkette sind wiederholte Zyklen des Bindens von mtHsp70-Molekülen nötig.

Moro *et al.* (1999) konnten zeigen, daß das Tim44-Dimer zwei mtHsp70-Moleküle bindet. Es wurde ein „Hand-over-hand“-Modell vorgeschlagen, bei dem jeweils ein Tim44 an der Übertragung eines mtHsp70 auf die translozierende Polypeptidkette teilnimmt, während das andere neues mtHsp70 in ATP-Form aus der Matrix rekrutiert. Das sequentielle Binden von mtHsp70 erhöht die Translokationseffizienz und kann vermutlich ein Zurückgleiten der Kette im Kanal verhindern. Zusätzlich wird ein Modell des aktiven Ziehens von mtHsp70 diskutiert. Ein solcher Mechanismus konnte jedoch bisher nicht eindeutig bestätigt werden (Glick *et al.*, 1995; Voos *et al.*, 1996; Matouschek *et al.*, 1997; Gaume *et al.*, 1998). Das an die Polypeptidkette gebundene mtHsp70 dissoziiert schließlich vom Vorstufenprotein ab oder bleibt gebunden, bis das importierte Protein in seine native Konformation gefaltet oder auf Hsp60 übertragen wird (Stuart *et al.*, 1994; Rospert *et al.*, 1996). Der Nukleotidaustauschfaktor Mge1p tauscht das an mtHsp70 gebundene ADP gegen ATP aus. Danach liegt mtHsp70 wieder in seiner bindungsbereiten ATP-Form vor.

Während oder nach dem Import wird die Präsequenz in der Matrix durch die Matrix-Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten, kann jedoch auch am Protein verbleiben (Waltner und Weiner, 1995; Jarvis *et al.*, 1995; Hammen *et al.*, 1996; Luciano *et al.*, 1998). Nach der Abspaltung der Präsequenz durch MPP werden einige Vorstufenproteine zusätzlich durch die mitochondriale Intermediat-Peptidase (MIP) prozessiert, die ein Oktapeptid abspaltet (Isaya *et al.*, 1991 und 1992; Branda *et al.*, 1995).

In der Matrix werden die Proteine durch Hilfsproteine in ihre native Konformation gefaltet

und können in höhermolekulare Proteinkomplexe assembliert werden (Hartl, 1996). Zu den Hilfsproteinen gehören das mtHsp70/Mdj1p/Mge1p-Chaperonsystem und das Hsp60/Hsp10-Chaperonin-system (Höfeld *et al.*, 1994; Rowley *et al.*, 1994; Westermann *et al.*, 1995; Rassow *et al.*, 1996; Rospert *et al.*, 1996; Horst *et al.*, 1997).

1.3.5 Die Translokationsmaschinerie mitochondrialer Transporterproteine der Innenmembran

In der Innenmembran befindet sich neben dem TIM23-Komplex die TIM22-Translokase, welche die Insertion von mitochondrialen Carriern sowie Tim17, Tim22 und Tim23 in die Innenmembran vermittelt (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997; Kaldi *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1999). Der TIM22-Komplex mit seinen integralen Membranproteinen Tim22 und Tim54 besitzt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 300 kDa.

Tim22 wurde aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu Tim23 und Tim17 identifiziert. Es ist essentiell für das Zellwachstum von *S. cerevisiae* und vermittelt die membranpotentialabhängige Insertion von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie sowie von Tim17 und Tim23 in die Innenmembran (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kaldi *et al.*, 1998). Tim54 ist ebenfalls essentiell und liegt als integrales Protein der mitochondrialen Innenmembran im Komplex mit Tim22 vor (Kerscher *et al.*, 1997). Es wird ebenfalls für den Import von Proteinen mit internem Importsignal in die Innenmembran benötigt, eine direkte Rolle von Tim54 beim Proteinimport konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher könnte es lediglich zur Stabilisierung des TIM22-Komplexes in der mitochondrialen Innenmembran dienen. Eine weitere Komponente der TIM22-Maschinerie ist Tim18. Dieses Protein ist nicht essentiell und spielt ebenfalls nur eine Rolle bei der Stabilisierung des Komplexaufbaus (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Die Vorstufe von Tim18 wird mit einer N-terminalen Präsequenz synthetisiert und nach dem Import in Mitochondrien zu seiner reifen Form prozessiert. Tim18 scheint wie Tim54 nicht mit Präproteinen zu interagieren. Es wird angenommen, daß es an der Assemblierung und der Stabilisierung des TIM22-Komplexes, nicht aber an der Insertion von Proteinen in die Innenmembran beteiligt ist.

Einleitung

Der Import in die Innenmembran über den TIM22-Komplex wurde in dieser Arbeit am Beispiel des ADP/ATP-Carriers (AAC) untersucht. Der Import der Vorstufe des AAC in die Mitochondrien konnte in fünf Stufen unterteilt werden (Pfanner und Neupert, 1987; Pfanner *et al.*, 1987a; Kübrich *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1999). Abbildung 3 zeigt schematisch den Importweg des AAC in die Innenmembran:

Die kernkodierte AAC-Vorstufe wird im Cytosol synthetisiert und bindet an cytosolische Hilfsproteine (Stufe I). Auf Stufe II bindet das Vorstufenprotein auf der Oberfläche der Mitochondrien an Rezeptoren des TOM-Komplexes (Pfanner und Neupert, 1987; Söllner *et al.*, 1990). In Anwesenheit von cytosolischem ATP wird es teilweise über die Außenmembran transloziert (Stufe III). Dabei ist der AAC in den Intermembranraum exponiert, gleichzeitig aber noch in stabiler Wechselwirkung mit dem TOM-Komplex (Söllner *et al.*, 1992; Dietmeier *et al.*, 1997; Kübrich *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1999). Nur in Gegenwart eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, wird der AAC vom TIM22-Komplex (Kerscher *et al.*, 1997, Endres *et al.*, 1999) in die mitochondriale Innenmembran inseriert (Stufe IV) und assembliert dort zum funktionellen Dimer (Stufe V). Für den Import des AAC wird kein Matrix-ATP benötigt (Pfanner *et al.*, 1987b; Wachter *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1999)

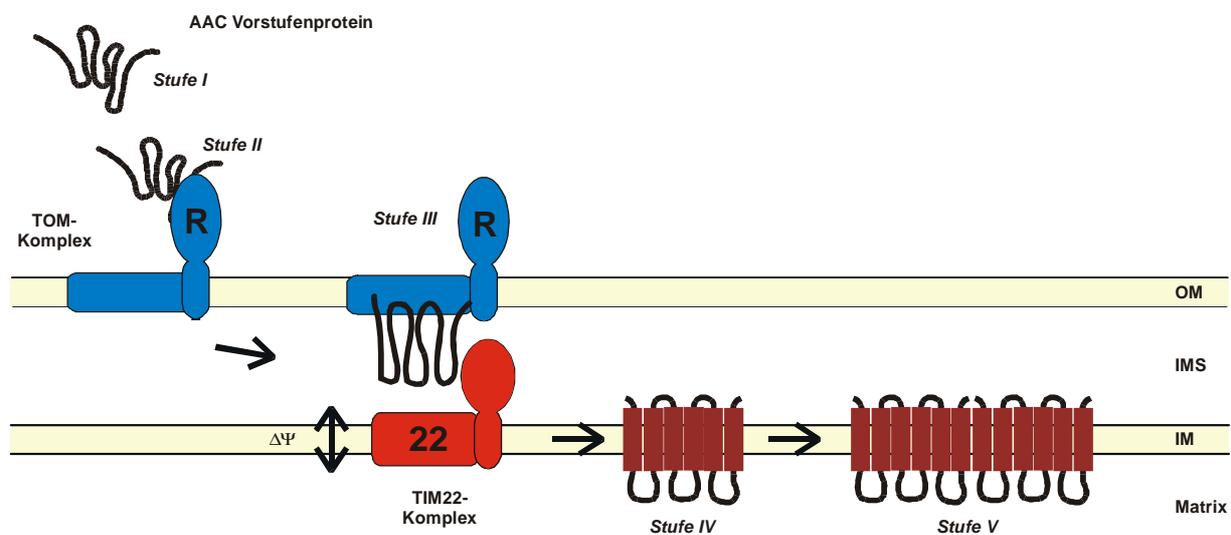


Abb. 3: Der Importweg des AAC in die mitochondriale Innenmembran kann in fünf Stufen unterteilt werden.

Erklärung im Text. Abkürzungen: AAC, ADP/ATP-Carrier; OM, Außenmembran; IMS, Intermembranraum IM, Innenmembran; TOM-Komplex, Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran; TIM22-Komplex, Translokase der mitochondrialen Innenmembran, R, Rezeptor Tom70; 22, Tim22.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die mit der TIM22-Translokase assoziierten Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 funktionell charakterisiert und die Organisation der Komplexkomponenten untersucht werden. Es sollte untersucht werden, welche Rolle diese Proteine beim Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien spielen. Tim9, Tim10 und Tim12 besitzen ein Cys₄-Motiv, das eine Zinkfinger-Domäne ausbilden könnte. Dies sollte durch rekombinante Expression und Bestimmung des Zinkgehalts analysiert werden. Weiterhin sollte analysiert werden, für welche Substrate und auf welcher Stufe der Translokation diese Proteine benötigt werden.

Der ADP/ATP-Carrier (AAC) wird wie alle Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie über den TIM22-Komplex in die mitochondriale Innenmembran importiert. Bisher war nur bekannt, daß der AAC mindestens zwei interne Importsignale besitzt. Daher sollte untersucht werden, ob der AAC mehrere unabhängige Importsignale besitzt. Außerdem sollten die Wechselwirkungen des AAC bzw. einzelner Domänen des AAC mit den einzelnen Komponenten der TIM22-Translokase im Zuge des AAC-Imports näher analysiert und so der Importweg beschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation von DNA

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

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979). Bei der Präparation größerer Mengen („Maxi-Präp“) wurde die DNA zusätzlich über eine Anionen-Austauscher-Säule gereinigt.

a) Minipräparationen von DNA

Für die Präparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Bakterien aus 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LBA-Medium (Luria-Bertani-Medium, s. 2.6.2, supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) für 30 sec (14000 UpM, Tischzentrifuge) abzentrifugiert, in 100 µl GTE-Lösung (50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH und 1% SDS. Nach einer Inkubation für 3 min auf Eis wurden die Proben zur Neutralisation mit 150 µl 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 versetzt, sofort durchmischt und 10 min zentrifugiert (14000 UpM, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt und anschließend mit Natriumacetat/Ethanol gefällt (s. Kap. 2.1.3.2). Die bei RT getrocknete DNA wurde in 50 µl H₂O resuspendiert. 3 µl DNA-Lösung wurde durch Restriktionsverdau (s. Kap. 2.1.2.1) analysiert.

Material und Methoden

b) Maxipräparationen von DNA

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA (bis 0,5 mg) wurde der "Jetstar-Kit" der Firma Genomed verwendet. Eine Anionen-Austauschersäule wurde mit 30 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0, 0,15% Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden *E.coli*-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid aus 200 ml einer Über-Nacht-Kultur in LBA-Medium durch 5 min Zentrifugation (4000 UpM, Beckman JA10-Rotor, RT) geerntet. Die Zellen wurden in 10 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 10 ml Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% SDS) 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Zell-Lysat wurde durch Zugabe von 11 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation (12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, RT) wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde mit 60 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen und mit 15 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (30 min, 12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C) aus dem Eluat gefällt, anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl H₂O resuspendiert.

2.1.1.2 Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

Die Präparation von Hefe-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Rose *et al.* (1990). Der Hefestamm D273-10B wurde in 10 ml YPD-Medium (s. Kap. 2.6.2) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 2500 UpM, Heraeus Bactifuge) geerntet, in 0,5 ml H₂O resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 sec sedimentiert (Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 0,2 ml Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und 0,3 g Glaskugeln (0,45 mm Durchmesser) wurde 4 min gevortext. Es wurde 0,2 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) zugegeben und für 5 min zentrifugiert (14000 UpM, Tischzentrifuge). Anschließend wurde die wässrige Phase von der organischen abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Ethanol-fällung (2.1.3.2) wurde die DNA in 0,4 ml TE-Puffer mit 75 µg/ml RNaseA resuspendiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde erneut mit Natriumacetat/Ethanol gefällt und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.1.1.3 Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch die wiederholte Abfolge von Strangtrennung, Anlagerung zweier spezifischer Oligonukleotide ("Primer") und DNA-Synthese mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) oder aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA-Polymerase) wurde eine exponentielle Synthese der DNA-Fragmente erreicht (Saiki *et al.*, 1985, 1988; Mullis *et al.*, 1986).

Für die PCR wurde der „Prime Zyme“-Kit der Firma Biometra verwendet. Jeder Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 1-2 U *Taq* bzw. 5 U *Pfu* DNA-Polymerase, je 200 µM dNTPs und je 15 pmol Oligonukleotide in dem von Biometra gelieferten PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100). Als Matrize wurde 100 ng genomische Hefe-DNA (2.1.1.2) oder 5 ng Plasmid-DNA verwendet (s. 2.1.1.1). Punktmutanten wurden mit dem „ExSite PCR-Based-Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers erhalten.

Im ersten Schritt der PCR wurde der Ansatz zum Denaturieren der Matrize auf 94°C aufgeheizt. Diese Temperatur wurde im ersten Zyklus für 3 min, in allen weiteren Zyklen für 1 min gehalten. Im zweiten Schritt wurde für 1 min auf 45-50°C abgekühlt, um die Anlagerung der Primer an die Matrize zu erlauben. Im dritten Schritt wurde der Ansatz zur DNA-Synthese je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments für 1-4 min bei 72°C inkubiert. Nachdem dieser Zyklus 20-30mal durchlaufen war, wurde die amplifizierte DNA auf einem Agarosegel analysiert (2.1.3). Durch Isolierung der DNA aus Agarose- oder Polyacrylamid-Gelen (2.1.3.4 bzw. 2.1.3.5) wurde das PCR-Produkt gereinigt, bevor es in einen geeigneten Vektor kloniert wurde.

2.1.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Appligene, Boehringer Mannheim, Gibco/BRL und New England Biolabs in den entsprechenden mitgelieferten Puffern verdaut. Es wurden etwa 2-3 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60-120 min bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur. Die erhaltenen Fragmente oder Vektoren wurden nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen mittels Gelelektrophorese analysiert und durch Isolierung aus Agarose- oder Polyacrylamidgel gereinigt (2.1.3.4, 2.1.3.5).

2.1.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase

Vor einer Ligation eines DNA-Fragments mit einem Vektor wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektormoleküle mit Alkalischer Phosphatase aus Shrimps (Boehringer Mannheim) entfernt, um eine intramolekulare Zyklisierung zu verhindern (Chaconas und van de Sande, 1980). Für die Dephosphorylierung wurde zu einem Restriktionsverdau 10x-CIP-Puffer sowie 1 U Enzym auf etwa 500 µg linearisierte DNA gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Die Alkalische Phosphatase wurde 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert und der dephosphorylierte Vektor durch Isolierung aus Agarosegel oder Ethanol-fällung gereinigt (2.1.3.4, 2.1.3.2).

2.1.2.3 Auffüllen überhängender DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym

Um auch bei nicht kompatiblen Schnittstellen eine Verknüpfung von DNA-Fragmenten zu ermöglichen bzw. zum vollständigen Auffüllen überhängender Enden nach der PCR, wurden 5'-überhängende Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt (Telford *et al.*, 1979). 0,1 bis 0,4 µg DNA wurden in 50 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, je 12,5 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit 1

22

U Klenow-Enzym für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 65°C denaturiert. Die DNA wurde durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung (2.1.3.2) oder Isolierung aus Agarosegel (2.1.3.4) gereinigt.

2.1.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 benutzt. Etwa 50 ng Plasmid-DNA wurden mit einem zwei- bis fünffachen molaren Überschuss an DNA-Fragment in 10 µl Ligationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% PEG 8000) mit 1 Unit T4-Ligase 2 h bei Raumtemperatur, zur Ligation von „blunt ends“ über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert und 1 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* transformiert.

2.1.3 Reinigung und Analyse von DNA

2.1.3.1 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration von DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNS bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNS (linearer Bereich: 0,1-1 OD) (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.3.2 Phenolextraktion und Ethanol-fällung

Durch Phenolextraktion werden Proteine und andere Verunreinigungen entfernt, die sich an der Grenzschicht der organischen und der wässrigen Phase ansammeln (Sambrook *et al.*, 1989).

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung für 1 min zentrifugiert (14000 UpM, Eppendorfzentrifuge, RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert.

Material und Methoden

Durch Präzipitation mit Ethanol wurde die DNA aus der wässrigen Phase aufkonzentriert und von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNA-Lösung mit Natriumacetat (pH 5,8; 300 mM Endkonzentration) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde zentrifugiert (20 min, 18000 UpM, Sigma 12154-Rotor, 4°C), mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in H₂O oder TE-Puffer (2.6.2) resuspendiert.

2.1.3.3 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA-Lösungen wurden mit DNA-Auftragspuffer (5x DNA-Auftragspuffer: 30% Glycerin, 5 mM EDTA, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 0,025% (w/v) Xylenxyolanol) versetzt und auf das entsprechende Gel geladen (Sambrook *et al.*, 1989). DNA-Fragmente mit einer Größe von mehr als 500 bp wurden mit horizontalen Agarosegelen analysiert. Bei kleineren DNA-Fragmenten wurden Polyacrylamid-Vertikalgele verwendet. Zum Längenvergleich der Fragmente diente DNA mit bekannter Größe. Zur Detektion der DNA-Banden wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid verwendet der in die DNA interkaliert und sie so im UV-Licht sichtbar macht.

a) Agarosegele

Die Agarose wurde in einem Mikrowellenherd in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) gelöst und bei 65°C aufbewahrt. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und betrug 0,8-2% (w/v). Beim Gießen des Gels wurde der Gellösung 0,25 mg/l Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von bis zu 13 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht (254 nm) sichtbar zu machen, wurde dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

b) Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele enthielten 6% (w/v) Acrylamid und 0,2% (w/v) Bisacrylamid in TAE-Puffer. Durch die Zugabe von 0,05% (v/v) TEMED und 0,05% (w/v) APS wurde die Polymerisation gestartet und ein vertikales Gel mit den Abmessungen 10,2 cm x 7,3 cm x 0,8 mm gegossen. Die Laufzeit der Gele betrug 1-2 h im Elektrodenpuffer TAE bei einer

Spannung von 150 V. Die Acrylamidgele wurden nach dem Lauf mit 1 mg/l Ethidiumbromid in TAE für 10 min gefärbt und unter UV-Licht analysiert.

2.1.3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Das Verfahren beruht auf der Auflösung von Agarosegel mit Hilfe eines chaotropen Puffers (Vogelstein & Gillespie, 1979) sowie der Affinität von DNA zu einer Silicagel-Membran.

Die DNA-Fragmente wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die zu reinigenden Banden unter Schwarzlicht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Das Gelstück wurde in einem Eppendorf-Gefäß gewogen und im dreifachen Volumen Puffer QX1 bei 50°C solubilisiert. Es wurde ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gut durchmischt. Die Lösung wurde auf eine QIAquick-Säule aufgetragen. Nach 1 min Zentrifugation (14000 UpM, Tischzentrifuge) wurde die adsorbierte DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zu dessen vollständiger Entfernung nochmals zentrifugiert (je 1 min bei 14000 UpM). Die Säule wurde auf ein Eppendorfgefäß aufgesetzt und mit 50 µl nach 2 min durch Zentrifugation eluiert. Das Eluat wurde bei -20°C aufbewahrt. Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wurden durch analytische Agarosegel-Elektrophorese (2.1.3.3) bestimmt.

2.1.3.5 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen

Die Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen erfolgte durch Elektrophorese in ein Hochsalzkissen. Dazu wurde eine Elektrophorese-Kammer mit einem V-förmigen Kanal („Elutionsknie“) verwendet, der mit 80 µl 3M Kaliumacetat (pH 7,25; 0,25% Bromphenolblau) gefüllt war. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h in 0,5x TAE-Puffer bei 150 V. Es wurden 160 µl des Salzpuffers mit einer Hamilton-Spritze abgenommen und 80 µl frisches 3 M Kaliumacetat zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurden erneut 160 µl Salzpuffer abgenommen. Die Eluate wurden vereinigt und die DNA durch Ethanol-fällung aus der Lösung gereinigt (2.1.3.2) und in 100 µl Wasser aufgenommen.

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

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde die Methode der Elektroporation angewendet (Neumann *et al.*, 1982; Potter, 1988). Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Dower *et al.* (1988) hergestellt. 500 ml LB-Medium (2.6.2) wurden mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert. Dann wurden die Zellen 30 min auf Eis gekühlt, in sterile JA10-Zentrifugationsbecher überführt und sedimentiert (15 min, 5000 UpM, Beckman JA10-Rotor, 4°C). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit einer eiskalten 10%igen (v/v) Glycerinlösung (je 500 ml, 250 ml bzw. 50 ml) wurde das Zellsediment in 500 µl 10%iger Glycerinlösung aufgenommen und in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Die *E. coli*-Stämme wurden durch Elektroporation mit einem "Gene Pulser" der Firma BioRad nach den Angaben des Herstellers transformiert. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid-DNA gemischt und in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Anschließend wurden die Zellen durch einen Stromstoß (2,5 kV, 400¹/₂, 25 mF, Zeitkonstante 8-9 ms) mit der DNA transformiert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge (3 min, 5000 UpM, RT) wurden die Zellen sedimentiert. Sie wurden in 200 µl SOC-Medium resuspendiert, auf einer LBA-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden über eine DNA-Minipräparation (2.1.1.1) und spezifische Restriktionsverdau (2.1.2.1) identifiziert. Die rekombinanten Bakterien wurden in 45% Glycerin bei -70°C gelagert.

2.1.5 Verwendete Plasmide

<u>pGEM4-Plasmid</u>	<u>Referenz</u>
AAC (<i>N.c.</i>)	Pfanner <i>et al.</i> , 1987
AAC-Domänen:	
TM1-2 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> , 1999

TM3-4 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> , 1999
TM5-6 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> ,
TM1-4 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> , 1999
TM1-5 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> , 1999
TM1-L5 (<i>N.c.</i>)	diese Arbeit, Endres <i>et al.</i> , 1999
Tim10 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim12 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim22 (<i>S.c.</i>)	Sirrenberg <i>et al.</i> , 1998
Tim23 (<i>S.c.</i>)	Berthold <i>et al.</i> , 1995
PiC (<i>S.c.</i>)	Dietmeier <i>et al.</i> , 1993
Mrs3 (<i>S.c.</i>)	Adam <i>et al.</i> , 1999
pb2Δ19(1-167)-DHFR (<i>S.c.</i>)	Schneider <i>et al.</i> , 1994
pCyc1-DHFR	Arnold <i>et al.</i> , 1998
pHsp60 (<i>S.c.</i>)	Kang <i>et al.</i> , 1990
pSu9(1-69)-DHFR (<i>N.c.</i>)	Pfanner <i>et al.</i> , 1987
pSu9(1-79)-DHFR (<i>N.c.</i>)	Ungermann <i>et al.</i> , 1994

<u>pMALcRI-Plasmid</u>	<u>Referenz</u>
Tim8 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim9 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim10 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim12 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim13 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim22 (<i>S.c.</i>)	Sirrenberg <i>et al.</i> , 1996

<u>pQE30</u>	<u>Referenz</u>
Tim9 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim9 und Tim10 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit

<u>Rekombinationskassette</u>	<u>Referenz</u>
Tim9 (<i>S.c.</i>)	Adam <i>et al.</i> , 1999
Tim10 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim12 (<i>S.c.</i>)	diese Arbeit
Tim22 (<i>S.c.</i>)	Sirrenberg <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

Die Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit erstellten Plasmide sind unter 2.1.6 beschrieben. (*N.c.*: *Neurospora crassa*, *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*)

2.1.6 Klonierungsstrategien

Klonierungen in pGEM4

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation mitochondrialer Vorstufenproteine wurde die betreffende cDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und in das Plasmid pGEM4 (Promega) unter die Kontrolle des SP6-RNA-Polymerase Promotors kloniert. Die ligierten Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm DH1 transformiert.

Die Oligonukleotide („Primer“) für die Klonierung von einzelnen Modulen und C-terminalen Deletionen von AAC2 (*N.c.*) wurden so gewählt, daß die Module durch die Ligation einer SalI- mit einer XhoI-Schnittstelle fusioniert werden können.

TM1-2-pGEM4 (pMX50)

Amplifizierung des Sequenzbereichs von Aminosäure 1 bis 105 (Position 1-315 in der Nukleotidsequenz) von AAC (*N.c.*) durch PCR mit den Primern AACNC I UPPER (N-terminaler Primer) und AACNC I LOWER (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen EcoRI und HindIII von pGEM4. Dieser Sequenzbereich entspricht dem ersten Modul der ADP/ATP-Translokase aus *N. crassa*.

TM3-4-pGEM4 (pMX51)

Amplifizierung des Sequenzbereichs von Aminosäure 106 bis 209 (Position 316-627 in der Nukleotidsequenz) von AAC (*N.c.*) durch PCR mit den Oligonukleotiden AACNC II UPPER (N-terminaler Primer) und AACNC II LOWER (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen EcoRI und HindIII von pGEM4. Dieser Sequenzbereich entspricht dem zweiten Modul der ADP/ATP-Translokase aus *N. crassa*.

TM5-6-pGEM4 (pMX55)

Amplifizierung des Sequenzbereichs von Aminosäure 210 bis 313 (Position 628-939 in der Nukleotidsequenz) von AAC (*N.c.*) durch PCR mit den Oligonukleotiden AACNC III UPPER (N-terminaler Primer) und AACNC III LOWER (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen EcoRI und HindIII von pGEM4. Dieser Sequenzbereich entspricht dem dritten Modul der ADP/ATP-Translokase aus *N. crassa*.

TM1-4-pGEM4 (pMX57)

Klonierung des TM3-4-Fragments (SalI/HindIII; aa 106-209) in die XhoI/HindIII-Schnittstellen von TM1-2-pGEM4 (aa 1-105). Dieses Fusionsprotein (aa 1-209) beinhaltet die ersten beiden AAC-Module. Dabei wurden durch die Ligation der SalI- und XhoI-Schnittstellen zwischen den beiden AAC-Modulen die Aminosäuren L D K M eingefügt.

TM1-5-pGEM4 (pMX89)

Amplifizierung des Sequenzbereichs von Aminosäure 1 bis 239 (Position 1-717 in der Nukleotidsequenz) von AAC (*N.c.*) durch PCR mit den Oligonukleotiden AACNC I UPPER (N-terminaler Primer) und AAC-DEL1 (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen EcoRI und HindIII von pGEM4. Dieser Sequenzbereich entspricht einer C-terminalen Deletion der ADP/ATP-Translokase aus *N. crassa*, bei der der Bereich nach der Transmembrandomäne 5 fehlt.

TM1-L5-pGEM4 (pMX91)

Amplifizierung des Sequenzbereichs von Aminosäure 1 bis 278 (Position 1-834 in der Nukleotidsequenz) von AAC (*N.c.*) durch PCR mit den Oligonukleotiden AACNC I UPPER (N-terminaler Primer) und AAC-DEL3 (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen EcoRI und HindIII von pGEM4. Dieser Sequenzbereich entspricht einer C-terminalen Deletion der ADP/ATP-Translokase aus *N. crassa*, bei der der Bereich nach Loop 5 fehlt.

Klonierungen in pMAL-cRI

Für die Expression von Fusionsproteinen (Maltosebindungsprotein und Tim8, Tim9, Tim10 bzw. Tim12) wurde die jeweilige cDNA mittels PCR amplifiziert bzw. aus einem entsprechenden Vektor herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pMAL-cRI unter die Kontrolle des *lac*-Operons kloniert. Die ligierten Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Dieser enthält das pREP4-Repressor-Plasmid, das den *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert und somit in Abwesenheit von IPTG das heterologe Gen reprimiert.

Material und Methoden

Tim8-pMAL-cRI (pMX101)

Das TIM8-Gen wurde aus dem Vektor Tim8-pGEM4 (Adam 1998, unveröff. Erg.) mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII herausgeschnitten und in dieselben Schnittstellen des Vektors pMAL-cRI ligiert.

Tim9-pMAL-cRI (pMX99)

Das TIM9-Gen wurde aus dem Vektor Tim9-pGEM4 (Adam 1998, unveröff. Erg.) mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII herausgeschnitten und in dieselben Schnittstellen des Vektors pMAL-cRI ligiert.

Tim10-pMAL-cRI

Amplifizierung des TIM10-Gens aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* durch PCR mit den Oligonukleotiden S11-CU (N-terminaler Primer) und S11-CL (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen BamHI und HindIII des Vektors pMAL-cRI.

Tim12-pMAL-cRI

Amplifizierung des TIM12-Gens aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* durch PCR mit den Oligonukleotiden S5-CU (N-terminaler Primer) und S5-CL (C-terminaler Primer); Klonierung des PCR-Produkts in die Schnittstellen BamHI und HindIII des Vektors pMAL-cRI.

Tim13-pMAL-cRI (pMX102)

Das TIM13-Gen wurde aus dem Vektor Tim13-pGEM4 (B. Guiard, Gif-Sur-Yvette) mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII herausgeschnitten und in dieselben Schnittstellen des Vektors pMAL-cRI ligiert.

Klonierung in pQE30

Tim9-pQE30

Für die Expression von Tim9 mit N-terminalem Hexahistidin-Cluster wurde das TIM9-Gen aus dem Vektor Tim9-pGEM4 (Adam 1999, unveröff. Erg.) mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und HindIII herausgeschnitten und in dieselben

Schnittstellen des Vektors pQE30 kloniert Das ligierte Plasmid wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert.

Name	Sequenz (enthaltene Schnittstellen)
AACNC I UPPER	5'-CCC CGA ATT CGT CGA CAA AAT GGC GGA GCA ACA GAA G (EcoRI, Sall)
AACNC I LOWER	5'-CCC CAA GCT TTT AGG ATC CCT CGA GGA ACA TCT TCT TGA ACT (XhoI, HindIII)
AACNC II UPPER	5'-CCC CGA ATT CGT CGA CAA AAT GGG CTA CAA GAA GGA CGT C (EcoRI, Sall)
AACNC II LOWER	5'-CCC CAA GCT TTT AGG ATC CCT CGA GGA GGA CGG GCT TGA TGG (XhoI, HindIII)
AACNC III UPPER	5'-CCC CGA ATT CGT CGA CAA AAT GCT CGT CGG TGA CCT CAA G (EcoRI, Sall)
AACNC III LOWER	5'-CCC CAA GCT TTT AGG ATC CCT CGA GAC CGG AAC CAC CCT TGA (XhoI, HindIII)
AAC-DEL1	5-CCC AAG CTT TTA GGA TCC AAG AGG GTA AGA GGC (BamHI, HindIII)
AAC-DEL3	5'-CCC AAG CTT TTA GGA TCC CTT GAA GAG AGA CTT G (BamHI, HindIII)
S11-CU	5'-CCC CGG ATC CAT GTC TTT CTT AGG TTT C(BamHI)
S11-CL	5'-CCC CAA GCT TCT AAA ACT TAC CGG CTG C (HindIII)
S5-CU	5'-CCC CGG ATC CAT GTC GTT CTT TTT AAA TAG TC (BamHI)
S5-CL	5'-CCC CAA GCT TCT ATT TTT TGG AAT CAT CAG C (HindIII)

Tabelle 2: Oligonukleotide

2.2 Hefegenetische Methoden

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
D273-10B	MATa, Wildtyp	Amerikanisches Hefestockcenter, ATCC#24657
WT334a	MATa, leu2, ura3-52	Hovland et al., 1989
Tim9(Gal10)	W334a, <i>tim9::TIM9(Gal10)</i> , LEU2	diese Arbeit, Adam et al., 1999
Tim10(Gal10)	W334a, <i>tim10::TIM10(Gal10)</i> , LEU2	diese Arbeit, Sirrenberg et al., 1998
Tim12(Gal10)	W334a, <i>tim12::TIM12(Gal10)</i> , LEU2	diese Arbeit, Sirrenberg et al., 1998
Tim22(Gal10)	W334a, <i>tim22::TIM22(Gal10)</i> , LEU2	Sirrenberg et al., 1996
Tim23fs	MB2, <i>tim23::URA3</i> , komplementiert mit YEP51vk (LEU2)-His ₆ (N) <i>tim23</i> -NcoI-Verkürzung	Berthold et al., 1995
a/α MB2	MATa/α, ADE2/ <i>ade2-101^{ochre}</i> , <i>his3/his3-Δ200</i> , <i>leu2/leu2-Δ1</i> , <i>lys2-801^{amber}/lys2-801^{amber}</i> , <i>trp1-289/TRP1</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i>	Maarse et al., 1992

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Wildtyp-Stämme wurden in YPD- oder Laktatmedium (2.6.2) kultiviert. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurden SD-Agarplatten oder SD-Laktatmedium (2.6.2) verwendet, die den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert waren (20 mg/l Aminosäuren sowie Uracil und Adenin). Für die Expression der GAL10-regulierten TIM-Gene im Stamm 334

wurde dem Medium 1% Galaktose zugesetzt (Hovland *et al.*, 1989). Die Anzucht der Hefe für die Isolierung von Mitochondrien erfolgte in Flüssigkultur auf selektivem Laktatmedium. Die Hefezellen wurden in 15%iger Glycerinlösung bei -80°C gelagert und vor der Überführung in Flüssigkultur auf Agarplatten ausgestrichen (YPD- bzw. selektive SD-Platten). Mit jeweils einer Einzelkolonie wurden 20 ml Laktatmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Für die Isolierung von Mitochondrien wurde diese Vorkultur etwa eine Woche lang passagiert, d.h. täglich in frischem Medium auf eine OD₅₇₈ von 0,05-0,1 verdünnt. Die Hauptkultur wurde entsprechend der Verdopplungszeit des Hefestamms so angeimpft, daß die Kultur zum Zeitpunkt der Ernte eine OD₅₇₈ von 1,0 bis 1,5 hatte.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Daum (Daum *et al.*, 1982). Die Hefezellen wurden wie unter 2.2.2 bis zu einer OD₅₇₈ von 1,0-1,5 kultiviert, durch Zentrifugation geerntet (5 min, 4000 UpM, Beckman JA10-Rotor, RT) und mit 100 ml H₂O gewaschen. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts wurden die Zellen in DTT-Puffer (100 mM Tris/SO₄, pH 9,4, 10 mM DTT) ad 0,5 g/ml resuspendiert. Es wurde für 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, abermals zentrifugiert und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen.

Für den enzymatischen Verdau der Zellwand wurden die Zellen in Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) aufgenommen (ad 0,15 g/ml) und mit 5 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht versetzt. Die Zellsuspension wurde für 30-60 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Abbau der Zellwand (Bildung von Späroplasten) wurde durch osmotische Lyse getestet. Die Inkubation wurde beendet, wenn die OD₅₇₈ einer 1:40 Verdünnung der Zellen in Wasser im Vergleich zu einer entsprechenden Verdünnung in 1,2 M Sorbitol noch 10-20% betrug.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 2500 UpM, Beckman JA10-Rotor, 4°C) wurde das Sediment in kaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,2% (w/v) BSA, 1 mM

Material und Methoden

PMSF) resuspendiert (0,15 g/ml) und im Dounce-Homogenisator auf Eis 10mal homogenisiert. Anschließend wurde nochmals das gleiche Volumen Homogenisierungspuffer zugegeben und erneut homogenisiert. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden durch zweimalige Zentrifugation (5 min, 2500 UpM, Beckman JA10-Rotor, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien geerntet (12 min, 12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C). Das Sediment wurde vorsichtig in 10 ml HS-Puffer (2.6.2.) resuspendiert und nochmals zentrifugiert (5 min, 4000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C). Die Mitochondrien wurden erneut aus dem Überstand isoliert (12 min, 12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C) und in 500 µl HS-Puffer aufgenommen. Nach der Proteinbestimmung (2.4.6.1) wurden die isolierten Mitochondrien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.2 Isolierung von [³⁵S]markierten Hefemitochondrien

Zur metabolischen Markierung von Hefeproteinen mit [³⁵S]Sulfat wurden Hefezellen in einem speziellen sulfatarmen Minimalmedium kultiviert. Dazu wurden die zu markierenden Hefestämme zunächst in SD-Laktatmedium (2.6.2) angezogen, das durch die Markersubstanzen und Glukose/Galaktose komplementiert wurde. Anschließend wurden die Hefezellen in sulfatarmes Minimalmedium (s. unten) überführt. Nach drei Passagen wurde eine 2,5 l Hauptkultur auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und mit 7,5 mCi/l [³⁵S]-Na₂SO₄ versetzt. Diese Kultur wurde über Nacht unter Rühren und ständiger Luftzufuhr bei 30°C inkubiert. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

Zusammensetzung des sulfatarmen Minimalmediums:

(Die Lösungen wurden sterilfiltriert wenn nicht anders angegeben.)

10 x Salzlösung: 60 g (NH₄)₂HPO₄, 8,1 g NH₄Cl, 10 g KH₂PO₄, 1 g NaCl, mit H₂O auf 1 l auffüllen

100x Ca/Mg-Salze: 1,3 g CaCl₂ • 2 H₂O, 4,1 g MgCl₂ • 6 H₂O, mit H₂O auf 1l auffüllen

Grundmedium: 100 ml 10 x Salzlösung, 10 ml 100x Ca/Mg-Salze, 1 g Glukose, 22 ml 90% (v/v) Milchsäure

Das Medium wurde mit KOH auf pH 5,5 eingestellt, mit H₂O auf ein Volumen von 870 ml

aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden die folgenden Lösungen zugegeben:

5 ml Vitaminlösung: je 40 mg Ca-Pantothenat, Thiaminhydrochlorid,

Pyridoxinhydrochlorid und 10 mg Nicotinsäure in 99 ml H₂O sowie

1 ml Biotin (40 mg/100 ml in 50 mM NaHCO₃)

5 ml Inositollösung: 400 mg Inositol in 100 ml H₂O

10 ml 1 x Spurenelemente (autoklaviert): 50 mg H₃BO₃, 10 mg KI, 4 mg CuCl₂ • 2 H₂O, 47 mg MnCl₂ • 4 H₂O, 19 mg ZnCl₂, 20 mg Na₂MoO₄ • 2 H₂O, in 1 l Wasser lösen

1 ml FeCl₃-Lösung: 33 mg FeCl₃ • 6 H₂O in 100 ml H₂O

4 ml Uracil Lösung (autoklaviert): 250 mg Uracil in 100 ml H₂O

100 ml Aminosäuremix: 0,2 mg jeder Aminosäure (außer Met und Cys) pro ml H₂O

5 ml Na₂SO₄-Lösung: 85 mg Na₂SO₄ in 100 ml H₂O

2.3.3 *In vitro* Proteinimport in isolierte Mitochondrien

Für den Import in isolierte Mitochondrien (2.3.1) wurden *in vitro* synthetisierte, [³⁵S]-markierte Vorstufenproteine verwendet (2.4.2.1). Ein typischer Importansatz enthielt 100 µg Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,2, 600 mM Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM MnCl₂, 2,5 mM EDTA, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2, 0,1 oder 3 mg/ml fettsäurefreies BSA) und 2-5% (v/v) [³⁵S]-markiertes Vorstufenprotein („Lysat“). Der Importansatz wurde mit 5 mM NADH (und 2,5 mM ATP zur Untersuchung von Proteinimport über den Tim23-17-Komplex) versetzt. Der Import in Mitochondrien der Tim9-, Tim10-, Tim12- und Tim22-Mutanten wurde in Anwesenheit von je 2,5 mM Malat und Succinat durchgeführt. In einigen Fällen wurden noch 10 mM Phosphokreatin und 100 µg/ml Kreatinkinase als ATP-regenerierendes System zugegeben. Sollte der Einfluß des Membranpotentials, Δψ, auf den Proteinimport untersucht werden, wurde ein Importansatz ohne NADH und ATP mit 1 µM Valinomycin versetzt, da dieses Δψ zerstört. Nach einer Präinkubation von 5 min bei 25°C wurde das Lysat zugegeben und ebenfalls bei 25°C importiert. Die Importreaktion wurde nach 5-20 min durch Abkühlen der Proben auf Eis gestoppt. Um nicht importiertes von importiertem Protein unterscheiden oder nicht

Material und Methoden

vollständig über die Außenmembran translozierte Intermediate charakterisieren zu können, wurden Aliquots der Ansätze anschließend mit Proteinase K oder mit Trypsin nachbehandelt (2.3.4). Um die submitochondriale Lokalisation der importierten Vorstufenproteine zu untersuchen, wurden aus einem Aliquot des Importansatzes Mitoplasten durch osmotisches Schwellen erzeugt und diese ebenfalls mit einer Protease verdaut (2.3.6). Danach wurden die Proben sedimentiert (10 min, 12000 UpM, 12154-Sigma-Rotor, 4°C), mit 150 µl HS-Puffer (2.6.2) mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, ggf. 0,1 mg/ml STI) gewaschen und durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.4), Autoradiographie (2.4.1.5) und ggf. Immundekoration (2.5.5) analysiert.

2.3.4 Proteaseverdau von nichtimportierten Vorstufenproteinen und Import-Intermediaten

Um importiertes Vorstufenprotein von nichtimportiertem unterscheiden oder nicht vollständig über die Außenmembran translozierte Import-Intermediate untersuchen zu können, wurde ein Aliquot des Ansatzes (20-30 µl) nach Stoppen der Importreaktion im zehnfachen Volumen Import- oder HS-Puffer mit Proteinase K (30-200 µg/ml), Trypsin (50-100 µg/ml) oder Chymotrypsin (100 µg/ml) 20 min auf Eis inkubiert. Nicht vollständig importierte oder von außen zugängliche Proteine wurden dabei durch die Protease verdaut. Der Proteaseverdau wurde durch die Zugabe von Proteaseinhibitor (1 mM PMSF, STI in zehnfacher Konzentration der verwendeten Trypsinkonzentration), leichtes Vortexen und fünfminütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Die Proben wurden wie unter 2.3.3 sedimentiert, mit HS-Puffer (2.6.2) mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, ggf. 0,1 mg/ml STI) gewaschen und analysiert (2.3.3).

2.3.5 Chase von Import-Intermediaten

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden in Abwesenheit eines Membranpotentials ($\Delta\psi$) in isolierte Mitochondrien importiert. Dazu wurde ein Importansatz ohne NADH und ATP mit 100 µM CCCP versetzt, da dieses $\Delta\psi$ zerstört. Nach einer Präinkubation von 5 min bei 25°C wurde das Lysat zugegeben und ebenfalls bei 25°C importiert. Die Importreaktion wurde nach 5-20 min durch Abkühlen der Proben auf Eis gestoppt. Der Ansatz wurde in zwei

Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K behandelt (2.3.4), um nichtimportiertes Material sowie proteinasezugängliche Abschnitte der nicht vollständig über die Außenmembran translozierten Import-Intermediate zu verdauen. Nach dem Stoppen des Proteinase-Verdau wurde jeder Ansatz zweigeteilt und zentrifugiert (10 min, 10000 UpM, 12154-Sigma-Rotor, 4°C). Je ein Aliquot wurde in Importpuffer bzw in Chase-Puffer (1x Importpuffer mit 2,5 mM Malat, 2,5 mM Succinat, 5 mM NADH, 20 mM DTT (Stammlösung 100 mM DTT in 100 mM MOPS, pH 7,2), 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 20 min bei 25°C inkubiert. Dabei wird das Membranpotential der Mitochondrien durch die Inkubation in Chase-Puffer wiederhergestellt. Um zu untersuchen, ob die proteinaseverdauten Translokationsintermediate des AAC wie die unverdaute Spezies nun in die Innenmembran inseriert werden, wurden die Mitochondrien sedimentiert (10 min, 12000 UpM, 12154-Sigma-Rotor, 4°C) und zur Carbonatextraktion eingesetzt (2.1.7). Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.4) und Autoradiographie (2.4.1.5) analysiert.

2.3.6 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen

Durch osmotisches Schwellen von Mitochondrien werden Mitoplasten erzeugt. Die Außenmembran wird geöffnet, während die Innenmembran intakt bleibt. Dadurch werden alle Proteine im Intermembranraum zugänglich für zugegebene Proteasen. Ein Aliquot eines Importansatzes (20-30 µl) bzw. Mitochondrien in HS-Puffer (1 mg/ml) wurden im zehnfachen Volumen 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2, 15-30 min auf Eis inkubiert. Zur Proteasebehandlung der Mitoplasten wurde Proteinase K (1-200 µg/ml), Trypsin (100 µg/ml) oder Chymotrypsin (100 µg/ml) während des hypotonischen Schwellens zugesetzt. Danach wurde Proteaseinhibitor (1 mM PMSF, ggf. STI in zehnfacher Konzentration der verwendeten Trypsinkonzentration) zugegeben, leicht gevortext und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben wie unter 2.3.3 sedimentiert, mit HS-Puffer (2.6.2) mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, ggf. 0,1 mg/ml STI) gewaschen und analysiert.

2.3.7 Carbonatextraktion

Mit Hilfe der Carbonatextraktion werden lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abgetrennt (Fujiki *et al.*, 1982a,b). Dazu wurden die Mitochondrien in H₂O bidest resuspendiert, mit demselben Volumen einer frischen 0,1 M Na₂CO₃-Lösung (pH 11,5) versetzt, 30 sec gevortext und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proteinkonzentration der Lösung betrug dabei 0,5 mg/ml. Die integralen Membranproteine wurden durch Zentrifugation (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor, 4°C) sedimentiert. Der Überstand enthielt die löslichen und die peripher mit der Membran assoziierten Proteine und wurde mit 12% TCA gefällt (s. 2.4.1.2). Das Sediment sowie der TCA-gefällte Überstand wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.4) und Autoradiographie (2.4.1.5) analysiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinanalytische Methoden

2.4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde mit dem „BioRad-Proteinassay“ nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Blau G-250 an Proteine, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Proben wurden mit je 1 ml einer 1:5-Verdünnung des Farbstoffkonzentrats gemischt. Nach einer Inkubation von 5-10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration. Als Proteinstandard wurde IgG aus Rind (Biorad) verwendet.

2.4.1.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Um Proteine aus einem größeren Volumen auszufällen, wurden den Proben 12% (w/v) TCA und 0,01% Desoxycholat zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die denaturierten Proteine für 15 min abzentrifugiert (16000 UpM, Sigma 12154-Rotor, 4°C). Das TCA-Sediment wurde mit kaltem Aceton (-20°C) zweimal gewaschen, bei 56°C getrocknet und in Laemmli-Puffer (2.6.2) aufgenommen. Bei der TCA-Fällung aus digitoninhaltenen Lösungen wurden die Proben bei -20°C eingefroren, um eine vollständige Fällung zu erreichen.

2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden zwei verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet. Standardgele waren 0,8 mm dick, Trenn- und Sammelgel hatten eine Größe von 9 cm x 15 cm bzw. 1 cm x 15 cm. Bei den Minigelen (Biorad) hatte das Trenngel die Abmessungen 7,3 cm x 10,2 cm, das Sammelgel von 1 cm x 10,2 cm. Die Dicke betrug 0,75 mm.

Die Gellösungen hatten folgende Zusammensetzung :

Sammelgel: 5% (w/v) Acrylamid, 0,085% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED

Trenngel: 10-16% (w/v) Acrylamid, 0,07-0,2% (w/v) Bisacrylamid, 380 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,06% (w/v) APS, 0,06% (v/v) TEMED

Bodengel: 2% Agar

Für kleine Proteine (Molekulargewicht < 14 kDa) wurden Tris-Urea-Polyacrylamidgele verwendet:

Sammelgel: 6,7% (w/v) Acrylamid, 0,09% (w/v) Bisacrylamid, 50% (w/v) Harnstoff, 166 mM Tris, pH 6,8, 0,14% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,22% (v/v) TEMED

Trenngel: 26% (w/v) Acrylamid, 0,35% (w/v) Bisacrylamid, 50% (w/v) Harnstoff, 1 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,14% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,09% (v/v) TEMED

Material und Methoden

Die Proben wurden in 10 µl Laemmli-Puffer (2.6.2) gelöst, für 3 min auf 95°C erhitzt und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstant 30 mA (Standardgele) bzw. 25 mA (Minigele), der Laufpuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS bzw. kein SDS bei Tris-Urea-Polyacrylamidgelen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose transferiert (2.4.1.4) oder mit 0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R-250 in 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure angefärbt. Anschließend wurde es mit 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure entfärbt und im Vakuum getrocknet.

2.4.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese nach der „Semi dry“-Methode von Towbin *et al.* (1979) und Kyhse-Anderson (1984) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran und das Gel wurden zwischen mehrere mit Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,08% SDS bzw. ohne SDS bei Tris-Urea-Gelen) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und zwischen zwei Graphitelektroden geklemmt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 1 mA/cm². Anschließend wurden die Proteine durch Anfärben mit Ponceau S (0,2% (w/v) in 3% (w/v) TCA) sichtbar gemacht. Die jeweiligen Proteine wurden durch Immundekoration (2.5.5.) detektiert.

2.4.1.5 Autoradiographie und Densitometrie

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie oder Fluorographie sichtbar gemacht. Für die Fluorographie wurden die entfärbten Gele für 10-15 min in Salicylatlösung (0,94 N NaOH, 0,94 M Salicylsäure) inkubiert und unter Vakuum für 1 h bei 80°C getrocknet. Für die Autoradiographie wurden die entfärbten Polyacrylamidgele direkt getrocknet. Auch auf Nitrozellulose übertragene Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Nach Exposition auf Röntgenfilm (Fuji Super RX, Kodak BioMax MR) wurden die Signale gegebenenfalls mit einem Densitometer (ImageMaster DTS, Pharmacia) quantifiziert. Alternativ wurden die radioaktiven Proteine mit Hilfe eines Phosphoimaging-Systems (Phosphoimager BAS 1500, Fuji) quantifiziert.

2.4.2 Präparation von Proteinen

2.4.2.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Zur *in vitro*-Synthese von [³⁵S]-Methionin-markierten Proteinen wurden pGEM4-Plasmide verwendet, die die kodierende Sequenz des jeweiligen Vorstufenproteins unter der Kontrolle des SP6-Promotors enthielten. Die Plasmide wurden durch Maxipräparation aus *E.coli* gewonnen (2.1.1.1). Als Translationssystem wurde Retikulozytenlysat aus Kaninchen (Promega) verwendet.

in vitro Transkription

Die Transkription erfolgte im wesentlichen wie von Melton *et al.* (1984) beschrieben, mit Modifikationen in Anlehnung an Stueber *et al.* (1984) und Sambrook *et al.* (1989). Der Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 50 µl 5x Transkriptionspuffer (Stratagene), 10 µl DTT, je 5 µl 10 mM ATP, CTP, UTP, 5 µl 1 mM GTP, 10 µl 7mG(5')ppp(5')G (5 mM), 10-20 µg DNA, 2,5 µl Rnasin (40 U/µl), 1 µl SP6-Polymerase (25 U/µl), H₂O zu einem Endvolumen von 100 µl. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 6 µl 10 M LiCl und 200 µl Ethanol für mindestens 30 min bei -70°C gefällt, abzentrifugiert (20 min, 20000 UpM, 12154-Sigma-Rotor, 4°C) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die RNA in 100 µl H₂O mit 50 U Rnasin resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

in vitro Translation

Die Translation der *in vitro* synthetisierten RNA wurde in Retikulozytenlysat aus Kaninchen (Promega) in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin durchgeführt. Dabei folgte die Translation im wesentlichen dem Protokoll von Pelham und Jackson (1976).

Der Translationsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 50 µl Retikulozytenlysat, 20 µl RNA, 1,2 µl 1 mM Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren ausser Methionin; Promega), 1,5 µl Rnasin (40 U/µl), 10 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/µl), 14,3 µl H₂O. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 µl nichtradioaktivem 60 mM L-

Material und Methoden

Methionin und 21 μ l 1,5 M Saccharose und weiteren 5 min bei 30°C wurden die Ribosomen abzentrifugiert (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor). Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.4.2.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Fusionsproteine MBP- α , MBP-Tim9, MBP-Tim10 und MBP-Tim12, bestehend aus dem Maltosebindungsprotein (MBP) und der α -Untereinheit der β -Galactosidase, Tim9, Tim10 bzw. Tim12, und das Histidinhexapeptid-Fusionsprotein His₆-Tim9 wurden unter der Kontrolle des lac-Promotors in *E. coli* exprimiert. Dazu erfolgt die Transformation des entsprechenden Plasmids in den Stamm XL1-Blue. Jeweils ein positiver Klon wurde über Nacht in LB-Amp-Medium bei 37°C kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Amp-Medium auf eine OD₅₇₈ von etwa 0,05 angeimpft und bei 25°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde für die Zinkbindungsexperimente mit 1 mM Zinkacetat versetzt und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet (4000 UpM, 10 min, Beckman JA10-Rotor) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Expression von His₆-Tim9 erfolgte bei 37°C für 2 h nach IPTG-Zugabe.

2.4.2.3 Reinigung von Proteinen mit His-tag über Ni-NTA

Zur Reinigung von Tim9 wurde das Gen in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Dadurch wurden N-terminal sechs Histidinreste („His-tag“) angefügt, was die Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose (Quiagen) erlaubt. Der Histidin-Cluster bindet dabei an Nickel-Ionen, die an Nitrilotriessigsäure-Gruppen des Harzes gebunden sind. Die Elution erfolgt mit einem Imidazolgradienten, der das Fusionsprotein durch Verdrängen der Histidinreste durch Imidazol vom Harz ablöst.

Zur Reinigung der Histidinhexapeptid-Fusionsproteine wurden 400 ml der IPTG-induzierten Zellen nach 2 h geerntet (10 min, 4000 UpM, Beckman-JA10-Rotor) und über Nacht eingefroren. Das Sediment wurde in 10 ml Lysepuffer (pH 8,0; 20 mM HEPES, 10 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 10 μ M Zinkacetat, Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA (Boehringer Mannheim, 1 Tablette / 50 ml Lysepuffer), 0,5 mg/ml Lysozym)

aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer Makrospitze unter ständiger Kühlung bei 4°C beschallt (12 x 10 Pulse in 30 sec-Intervallen, Branson Sonifier, Stufe 4, 80% Leistung). Nicht aufgeschlossene Zellen sowie unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (30 min, 15000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen (Gelbettvolumen 2 ml). Diese war zuvor mit je 5 Säulenvolumina Puffer A (20 mM HEPES, 10 mM Imidazol, 100 mM NaCl; pH 8,0), 5 Säulenvolumina Puffer B (20 mM HEPES, 500 mM Imidazol, 100 mM NaCl; pH 8,0) und erneut mit 10 Säulenvolumina Puffer A bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit Hilfe eines FPLC-Systems äquilibriert worden. Nach dem Beladen der Säule wurde sie wieder an die FPLC angeschlossen, bei einer Flußrate von 0,1 ml/min mit 10 Säulenvolumina Puffer A gewaschen und mit 10 Säulenvolumina eines Imidazolgradienten (0-100% Puffer B) in 1 ml-Fractionen eluiert. Danach wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Puffer B gewaschen und mit 5 Säulenvolumina Puffer A äquilibriert oder in H₂O mit 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert. Durch eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.4.1.1) wurden die proteinhaltigen Fraktionen ermittelt. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3) analysiert, der Rest mit 10% (w/v) Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.4.2.4 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen über Amyloseharz

Die Fusionsproteine MBP- α , MBP-Tim9, MBP-Tim10 und MBP-Tim12, bestehend aus dem Maltosebindungsprotein (MBP) und der α -Untereinheit der β -Galactosidase, Tim9, Tim10 bzw. Tim12 wurden in *E. coli* XL1-Blue in löslicher Form exprimiert. Das Zellsediment aus 400 ml einer IPTG-induzierten *E. coli*-Kultur (2.4.2.2) wurde in 15 ml Säulenpuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Zinkacetat) resuspendiert, mit 15 mg Lysozym versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer Mikrospitze unter Eiskühlung beschallt (12 x 10 Pulse in 30 sec-Intervallen, Branson Sonifier, Stufe 4, 80% Leistung,). Zur Abtrennung von unlöslichen Zellbestandteilen und nicht aufgeschlossenen Zellen wurde zentrifugiert (30 min, 15000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min auf eine zuvor mit 10 Säulenvolumina Säulenpuffer äquilibrierten Amylosesäule (1,5 ml Gelbett, Amylose Resin, New England Biolabs) aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit 20 Säulenvolumina Säulenpuffer (Flußrate 1 ml/min) und anschließend mit 15 ml

Material und Methoden

Waschpuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Die Elution erfolgt mit 10 mM Maltose in Waschpuffer (Flußrate 0,2 ml/min). Die Eluate wurden in 0,5-1 ml Fraktionen gesammelt und mittels BioRad-Proteinassay (2.4.1.1) die Fraktionen bestimmt, die das Fusionsprotein enthielten. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3) und Coomassie-Färbung analysiert und vereinigt. Die Proteinkonzentration (2.4.1.1) sowie der Zinkgehalt (2.4.2.5) wurden ermittelt.

Vorbehandlung mit NEM

Eine Amylosesäule mit gebundenem MBP-Tim12 wurde für 1h bei 4°C mit 2 mM N-ethylmaleimid (NEM) in Waschpuffer vorbehandelt. Dann wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer mit 1 mM Zinkacetat äquilibriert und mit weiteren 5 Säulenvolumina Waschpuffer ohne Zn^{2+} -Ionen gewaschen. Die Elution erfolgte mit Waschpuffer, dem 10 mM Maltose zugesetzt wurden. Die Eluate wurden in 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration (2.4.1.1) sowie der Gehalt an Zinkionen (2.4.2.5) bestimmt.

2.4.2.5 Bestimmung des Zinkgehalts der rekombinanten Proteine

Die rekombinanten Fusionsproteine (MBP- α , MBP-Tim10 und MBP-Tim12) wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie auf deren Zinkgehalt untersucht. Die Proteine wurden wie unter 2.4.2.4 gereinigt, vor der Messung zentrifugiert (15 min, 16000 UpM, 4°C, Sigma, 12154-Rotor) und mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Perkin Elmer 1100B) analysiert. Für die Eichkurve wurden Zinklösungen (1-3 μ g/ml) der Firma Merck verwendet.

2.4.3 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration wurde das apparente Molekulargewicht von Proteinen und Proteinkomplexen analysiert. Isolierte Mitochondrien (1 mg Protein) wurden in 200 μ l Digitonin-Puffer (1% (w/v) Digitonin, 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 150 mM Kaliumacetat, pH 7,4, 1 mM Zinkacetat, 1 mM PMSF), der zusätzlich 0,1 mg/ml α 2-Makroglobulin, 1 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin enthielt, für 30 min auf Eis lysiert. Nicht lysiertes

Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor). Der Überstand wurde auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (25 ml Säulenvolumen, Pharmacia) aufgetragen, die mit Digitonin-Puffer äquilibriert worden war. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flußrate von 0,2-0,3 ml/min mit einer FPLC-Anlage (Pharmacia). Es wurden Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Nach einer TCA-Fällung (2.4.1.2) wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.1.3) und nach Transfer auf Nitrozellulose-Membran (2.4.1.4) mittels Immundekoration (2.5.5) analysiert. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Hilfe von Dextranblau (2000 kDa) bestimmt. Die Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte mit den Markerproteinen Rinderthyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa) aus *S. cerevisiae*, Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Carboanhydrase aus Rindererythrozyten (29 kDa), die in einem separaten Säulenlauf untersucht wurden.

2.4.4 Blaue Nativgelelektrophorese

Die Blaue Nativgelelektrophorese dient der Analyse von Proteinkomplexen (Schägger und Jagow, 1991). Dabei werden Membranproteinkomplexe zunächst in einem geeigneten Detergenz solubilisiert. Der Farbstoff Serva Blau G bindet an Proteinkomplexe, die dadurch eine negative Nettoladung erhalten. Die elektrophoretische Auftrennung über ein Blaues Nativgel erlaubt im Gegensatz zur Gelfiltration die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Proben und den direkten Vergleich ihrer Proteinkomplexe.

Zuerst wurde ein 5 x 150 x 1 mm Bodengel gegossen, darüber dann ein kontinuierliches 7-16,9% Acrylamid-Gradientengel (90 x 150 x 1 mm). Beim Gießen des Gradientengels wurden die beiden Lösungen sofort nach der Zugabe von APS und TEMED mit Hilfe eines Gradientenmischers gemischt, wobei sich in der vorderen Kammer die höherprozentige Acrylamid-Lösung 2 befand. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel direkt nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gradientengels wurde das Isopropanol entfernt und ein Sammelgel (5 x 150 x 1 mm) darüber gegossen. Die Gellösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Bodengel: 20% (w/v) Acrylamid, 0,13% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,05% (w/v) APS, 0,025% (v/v) TEMED

Material und Methoden

Trenngel: linearer Gradient von 7-16,9% (w/v) Acrylamid, 0,15-0,3% (w/v) Bisacrylamid und 0-16% (w/v) Glycerin, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,04% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED

Sammelgel: 3,8% (w/v) Acrylamid, 0,12% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,08% (w/v) APS, 0,08% (v/v) TEMED

Kathodenpuffer: 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, pH 7,0; 0,02% (w/v) Serva Blau G in der ersten Hälfte des Gellaufs

Anodenpuffer: 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0)

Isolierte Mitochondrien (200 µg Protein pro Gelspur) wurden in 40 µl Digitonin-Puffer (1% (w/v) Digitonin, 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 50 mM Kaliumacetat, pH 7,4, 1 mM PMSF) für 30 min auf Eis lysiert. Nicht lysiertes Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor). Der Überstand wurde mit 4 µl Probenpuffer (5% Serva Blau G in 500 mM 6-Aminocapronsäure) versetzt und auf das Nativgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei konstant 100 V und 4°C in Kathodenpuffer/0,02% Serva Blau G durchgeführt. Sobald die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf konstant 500 V (bei maximal 15 mA) erhöht. Nach etwa einem Drittel des Gellaufs wurde der Kathodenpuffer/0,02% Serva Blau G gegen Kathodenpuffer ohne Farbstoff ausgetauscht. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (2.4.1.4). Folgende Markerproteine dienen als Größenstandard: Rinderthroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa) aus *S. cerevisiae*, Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* (150 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa).

2.4.5 Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen lassen sich mit Hilfe von chemischen Quervernetzern („Crosslinkern“) nachweisen, die eine kovalente Verknüpfung der Interaktionspartner erlauben. Dies setzt jedoch die räumliche Nachbarschaft der funktionellen Gruppen der beiden Proteine voraus, mit denen der gewählte Quervernetzer kovalente Bindungen eingehen kann.

In dieser Arbeit wurden MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester; Pierce) und BMH (1,6-Bismaleimidohexan ;Pierce) als Quervernetzungsreagenzien verwendet, die durch

intakte biologische Membranen hindurchdiffundieren können. Der bifunktionelle Quervernetzer MBS bewirkt die Verknüpfung von Cysteinseitenketten mit Lysinseitenketten benachbarter Proteine, BMH verknüpft Cysteinseitenketten.

Die Quervernetzung von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen mit mitochondrialen Proteinen erfolgte mit BMH während, bei der Verwendung von MBS auf Eis nach der Importreaktion (2.3.3). Dabei wurde der Quervernetzer in einer Endkonzentration von 0,5 mM BMH bzw. 1 mM MBS unter leichtem Vortexen aus einer Stammlösung in DMSO zugesetzt (BMH: 50 mM, MBS: 200 mM,). Als Kontrolle diente ein Ansatz, dem dasselbe Volumen reines DMSO zugegeben wurde. Die Vernetzungsreaktion wurde nach 30 min bei Verwendung von BMH durch Zugabe von 1 M β - Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 10 mM, bzw. bei Verwendung von MBS durch Zugabe von 1M Glycin (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 0,1 M beendet. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min, 12000 UpM, 12154-Sigma-Rotor) und mit HS-Puffer gewaschen. Gegebenenfalls wurde ein Aliquot der Quervernetzungsreaktion mit Proteinase behandelt (2.3.4). Danach wurden die Proben durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.4) und Autoradiographie (2.4.1.5) analysiert oder zur Immunfällung eingesetzt (2.5.4).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Kopplung synthetischer Peptide an Ovalbumin oder KLH

Um Antiseren gegen synthetische Oligopeptide zu gewinnen, wurden diese an ein Trägerprotein gekoppelt (Modrow und Wolf, 1986; Modrow *et al.*, 1989).

Die Peptide wurden vom jeweiligen C-Terminus bzw. N-Terminus der Proteine abgeleitet (die letzten 9 Aminosäuren) und nach Merrifield (1963) synthetisiert. Dabei wurde N-terminal ein zusätzliches Cystein angefügt, das die Kopplung an ein aktiviertes Trägerprotein erlaubt. Es wurde Maleimid-aktiviertes Keyhole-limpet-Hämocyanin (KLH, Hämocyanin aus der Napfschnecke *Megathura crenulata*) oder Ovalbumin verwendet (Inject Maleimide

Material und Methoden

Activated KLH/OVA-Kit, Pierce).

Zwei Milligramm des jeweiligen Peptids wurden in 200 µl eines 50 mM Kaliumphosphat-Puffers, pH 7,2 (im Kit enthalten) gelöst. Zur Kopplung wurden 2 mg Maleimid-aktiviertes Ovalbumin in 200 µl Wasser aufgenommen und sofort mit der Peptidlösung gemischt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugat wurde durch Gelfiltration über eine PD10-Säule in 100 mM NaCl, 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2 (im Kit enthalten) umgepuffert. Es wurden 10 Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt und deren Proteinkonzentration bestimmt (5 µl Probe plus 20 µl Biorad-Verdünnung, s. 2.4.1). Die Fraktionen, welche das Konjugat enthielten, wurden vereinigt und in 200 µg-Aliquots bei -20°C gelagert.

2.5.2 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Um polyklonale Antiseren zu gewinnen, wurden Kaninchen nach der von Knudsen (1985) beschriebenen Methode immunisiert. Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.1.3), auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Ponceau S angefärbt (2.4.1.4). Pro Injektion wurden 60-100 µg der jeweiligen spezifischen Proteinbande ausgeschnitten, in 300 µl DMSO solubilisiert und mit 300 µl Immunstimulans (für die Erstinjektion TiterMax, CytRX, für Folgeinjektionen Freund's inkomplettes Adjuvans, Behringwerke) versetzt. Bei der Verwendung von gekoppelten Peptiden wurden 200 µl des Konjugats mit 200 µl Immunstimulans vermischt.

Die zu einer homogenen Emulsion vermischten Antigen-Lösungen wurden subkutan nahe der Lymphknoten in der Achselregion des Kaninchens injiziert. Das Kaninchen wurde alle 4-6 Wochen erneut immunisiert. Nach der Erstinjektion wurde die Folgeinjektion bereits nach 2 Wochen durchgeführt. Zehn Tage nach jeder Folgeinjektion wurden dem Kaninchen 30-40 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Die Blutgerinnung erfolgt für 2h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Serum durch zwei Zentrifugationsschritte (5 min, 5000 UpM Heraeus Bactifuge; danach 12 min, 12000 UpM, Beckman-JA20-Rotor) von den partikulären Bestandteilen abgetrennt und das Komplementsystem durch eine 30minütige Inkubation bei 56°C inaktiviert. Das Serum wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um eine Antigensäule zur Affinitätsreinigung des Immunsersums zu erhalten, wurde das Antigen an ein Harz gekoppelt. Peptide wurden an Iodoacetyl-aktiviertes SulfoLink Coupling Gel (Pierce) gekoppelt, Proteine an BrCN-Sepharose 4B (Pharmacia).

Kopplung synthetischer Peptide an SulfoLink Coupling Gel

Alle Schritte der Kopplung erfolgten bei Raumtemperatur. Vor Beginn der Kopplungsreaktion wurden 2 ml des bei 4°C gelagerten Harzes auf Raumtemperatur erwärmt und mit 12 ml Kopplungspuffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,5) in einer Säule mit Silicafritte äquilibriert. 2 mg des Oligopeptids wurden in 1 ml Kopplungspuffer gelöst und mit dem Harz 15 min unter leichter Bewegung inkubiert. Danach wurde die Säule 30 min stehengelassen, bevor sie mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen wurde. Um alle nicht abreagierten Iodoacetylgruppen zu quenchen, wurden 2 ml 50 mM Cystein in Kopplungspuffer auf die Säule gegeben und 15 min unter leichter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde die Säule 30 min stehengelassen, bevor sie erst mit 32 ml 1 M NaCl, dann mit 32 ml 0,02% Natriumazid in TBS gewaschen wurde. Die Antigensäule wurde in diesem Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Kopplung von Proteinen an BrCN-Sepharose

Zur Kopplung von Proteinen an BrCN-Sepharose 4B (Pharmacia) wurden 15 mg des betreffenden Proteins TCA-gefällt (2.4.1.2) und in 2 ml 2% SDS und 2 ml 200 mM NaHCO₃, pH 8,3 gelöst. Die Aktivierung der BrCN-Sepharose (0,4 g/Ansatz) erfolgte durch 15minütiges Quellen in 1 mM HCl, gefolgt von drei Waschschritten mit 4 ml 1 mM HCl und zwei mit 2% SDS, 100 mM NaHCO₃, pH 8,3. Anschließend wurde die Proteinlösung sofort zu der aktivierten Sepharose gegeben, mit 4 ml 2% SDS, 100 mM NaHCO₃, pH 8,3 versetzt und 2 h bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Die Kopplung wurde durch eine zweistündige Inkubation mit 100 mM Glycin, pH 8,0 beendet. Um nicht kovalent gebundenes Antigen abzutrennen, wurde abwechselnd je viermal mit 15 ml 500 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 4,0 bzw. 15 ml 500 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃, pH 8,3 gewaschen. Die Sepharose wurde in eine Säule überführt und in TBS/0,02% NaN₃ bei 4°C

Material und Methoden

gelagert.

Affinitätsreinigung des Antiserums

Die antigenspezifischen Antikörper wurden mit Hilfe einer Antigensäule (s. oben) aus dem Serum aufgereinigt. Die Affinitätsreinigung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Harlow und Lane (1988).

Die Bindung und Elution der Immunglobuline erfolgte bei Raumtemperatur mit einer peristaltischen Pumpe. Vor Beginn der Antikörperreinigung wurde die Affinitätssäule bei einer Flußrate von 3 ml/min mit je 10 ml folgender Puffer gewaschen: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5; 10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5 und 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. Zum Binden der Immunglobuline an das Antigen wurden sechs Milliliter des Antiserums mit 24 ml TBS (2.6.2) verdünnt, mit Proteaseinhibitoren versetzt (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM o-Phenanthrolin, 1 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Aprotinin) und bei einer Flußrate von 1 ml/min dreimal über die Säule gegeben. Anschließend wurde bei einer Flußrate von 4 ml/min mit 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 2,5 ml 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5. Das Eluat wurde mit 1 M Trisbase neutralisiert oder über eine PD10-Säule (Pharmacia) in TBS umgepuffert und 10 µl durch SDS-PAGE (2.4.1.3) analysiert. Die gereinigten Antikörper aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Säule wurde mit 10 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5 und dann mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, gewaschen bis der pH-Wert neutral war und unter TBS (2.6.2.) und 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert.

2.5.4 Immunfällungen

Immunfällungen wurden mit Hilfe von Protein A-Sepharose-Harz (PAS, Pharmacia) durchgeführt, das eine hohe Affinität für Immunglobuline der Klasse G besitzt und sich leicht sedimentieren läßt.

Zum Binden der Antikörper an die Protein A-Sepharose wurden 60 µl PAS-Suspension (entspricht 30 µl Gelbett) dreimal mit 1 ml TBS (2.6.2) gewaschen. Danach wurde die PAS mit 100-500 µl affinitätsgereinigtem Antikörper (2 µg) oder mit 10-50 µl Antikörperserum in 1 ml TBS versetzt und 30 min bei 4°C invertiert. Durch zwei Waschschrte mit je 1 ml TBS wurden die IgGs entfernt, die nicht an die PAS gebunden hatten. Der dritte Waschschrte

erfolgte mit der gleichen Pufferlösung, die auch für die jeweilige Immunfällung verwendet wurde, um die PAS zu äquilibrieren.

Native Immunfällung von Quervernetzungsprodukten

Die Isolierung mitochondrialer Quervernetzungsprodukte erfolgte durch Immunfällung. Nach der Quervernetzungsreaktion mit dem Crosslinker BMH (2.4.5) wurde das Mitochondriensediment in 200 µl Lysispuffer (0,5% Triton X-100, 15 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 µg/ml α -Macroglobulin, 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin) resuspendiert und 15 min auf Eis lysiert. Danach wurde nichtsolubilisierendes Material durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde 2 h mit den äquilibrierten PAS-gebundenen Antikörpern bei 4°C invertiert. Anschließend wurde die PAS für 30 sec abzentrifugiert (14000 UpM, Eppendorf-Tischzentrifuge, 4°C) und zweimal Lysispuffer gewaschen. Danach wurde das Reaktionsgefäß gewechselt, um unspezifisch an das Eppendorfgefäß haftendes Probenmaterial abzutrennen, und einmal mit Lysispuffer ohne Detergens gewaschen. Zur Elution der Proteine wurden die Proben mit 20-30 µl Laemmli (2.6.2) versetzt, 15 min bei 4°C geschüttelt und für 3 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.4) und Autoradiographie (2.4.1.5) und gegebenenfalls durch Immundekoration (2.5.5) untersucht.

Denaturierende Immunfällung von Quervernetzungsprodukten

Die Isolierung mitochondrialer Quervernetzungsprodukte nach der chemischen Quervernetzung mit MBS (2.4.5) erfolgte ebenfalls durch Immunfällung. Nach der Quervernetzungsreaktion wurde das Mitochondriensediment in 60 µl Lysispuffer (1% SDS, 100 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM PMSF, 5% 1x-Laemmli-puffer) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Solubilisat wurde auf das 20fache Volumen verdünnt (0,5 % Triton X-100 in TBS, 1 mM EDTA, 0,8 mM PMSF, 0,1 mg/ml α -Macroglobulin, je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin) und 30 min zentrifugiert (45000 UpM, Beckman TLA-45-Rotor, 4°C), um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde auf die vorbereitete Protein A-Sepharose mit gebundenem Antikörper gegeben und wie oben behandelt. Dabei wurde für die Waschschriffe mit Detergens TBS/0,5% Triton X-100 verwendet.

2.5.5 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Alle Inkubationen der Nitrozellulose-Membran mit den darauf übertragenen Proteinen (2.4.1.4) wurden unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit 4% (w/v) Magermilchpulver in TBS (2.6.2) abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für 1 h mit spezifischen Antiseren, die je nach Titer 1:200 bis 1:10000 in Magermilchpulver/TBS verdünnt waren. Danach wurde die Membran je 5 min mit TBS, TBS/0,05% Tween20 und wieder mit TBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation für 1 h mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase, das 1:10000 in Magermilchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS gewaschen und mit Luminol-Reagenz (Amersham) benetzt. Die Signale der Chemolumineszenz-Reaktion der gebundenen Peroxidase wurden auf einem Röntgenfilm (Fuji NewRX) sichtbar gemacht.

Für die Immundekoration von Tim9, Tim10, Tim12 und Tim22 wurde die Nitrozellulosemembran mit 2% BSA in TBS/0,05% Tween20 abgesättigt. Für alle Waschschrte wurde TBS/0,05% Tween20 verwendet.

2.6 Materialien

2.6.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

DH1 (Hanahan, 1983): F⁻*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, (Nal^r), *thi-1*, (*r_k⁻m_k⁺*), *relA1*

XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, (Nal^r), *thi-1*, (*r_k⁻m_k⁺*), *relA1*, *lac*, F['][*proAB⁺*, *lac^qZDM15*, Tn10(*tet^r*)]

2.6.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

Medien:

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

LB-Amp-Medium: zusätzlich 100 mg/l Ampicillin (sterilfiltriert) nach dem Autoklavieren zugeben

LB-Amp-Platten: LB-Amp-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar

YPD-Medium: 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, mit H₂O auf 930 ml auffüllen, pH 5,5 mit KOH einstellen, nach dem Autoklavieren 67 ml 30% Glucose zugeben

YPD-Platten: YPD-Medium mit 20 g/l Bacto-Agar

SD-Platten: 6,7 g/l Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), 20 g/l Glukose, 20 g/l Bacto-Agar,

SC-Platten: zusätzlich 2 g/l „Drop Out Mix“

„Drop Out Mix“: je 2 g Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Inositol, Isoleucin, Glutamin, Glutamat, Glycin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin und 0,2 g p-Aminobenzoesäure

Laktatmedium: 3 g Hefeextrakt, 1 g Glukose, 1 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g CaCl₂ • 2 H₂O, 0,5 g NaCl, 1,1 g MgSO₄ • 6 H₂O, 0,3 ml 1% FeCl₃, 22 ml 90% Milchsäure, mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH 5,5 mit KOH einstellen

SD-Laktatmedium: 2% Laktat, 0,67% Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), pH 5,5 mit KOH einstellen

Puffer:

HS-Puffer: 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4

Laemmli-Puffer: 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau

PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,9 mM KH₂PO₄, 8,2 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetat, pH 7,4

Material und Methoden

50xTAE-Puffer: 242 g/l Tris, 57 ml Eisessig, 50 mM EDTA

TBS: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA

2.6.3 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Amersham-Buchler, Braunschweig: ECL Reagenz für Western Blots

Behringwerke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans

Biometra, Göttingen: Kit für die Polymerase-Kettenreaktion ("Prime Zyme")

Biorad, München: Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege)

Biozym, Hess. Oldendorf: SP6-Polymerase

Boehringer, Mannheim: Alkalische Phosphatase (aus Shrimps), α_2 -Makroglobulin, Aprotinin, ATP, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Nukleotide, NADH, Lysozym, Oligomycin, Proteinase K, Restriktionsenzyme, RNase A, Tris

CytRX, Norcross, USA: TiterMax

DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Hefeextrakt, Nutrient Broth, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)

Eurogentec, Seraing, Belgien: Oligonukleotide

Fluka, Buchs, CH: Trichloressigsäure

Fuji: Röntgenfilme Super RX

Genomed, Bad Oeyenhausen: „Jetstar“-Kit

Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH

GIBCO-BRL, Eggenstein: Agarose (ultra pure, low endoosmosis), Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, Klenow-Enzym

ICN Pharmaceuticals, Eschwege: [^{35}S]Methionin, [^{35}S]-Sulfat

Kodak, München: Röntgenfilme BioMax MR

Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide

Nestle-Alete, München: Magermilchpulver

New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme, Amyloseharz

Pharmacia, Freiburg: Desoxyribonucleotide, 7-Methyl-Guanosintriphosphat (7mGpppG), Protein A-Sepharose CL4B, Superose6, BrCN-Sepharose, PD10-Gelfiltrationssäulen

Pierce, Rochester, USA: chemische Quervernetzer, Sulfolink Coupling Gel, Inject Maleimide Activated KLH/OVA-Kit

Promega, Heidelberg: RNasin, SP6-Polymerase, Kaninchenretikulocytenlysat, Aminosäuremix ohne Methionin, pGEM-Vektoren

QIAGEN, Hilden: pQE-Vektoren, Ni-NTA-Agarose, QIAquick Gel Extraction-Kit

Riedel de Haen, Seelze: Kaliumacetat

Schleicher&Schüll, Dassel: Nitrozellulosemembran (0,2 µm) BA83, Faltenfilter, Filterpapiere

Serva, Heidelberg: Acrylamid, 6-Aminocaprinsäure, Bisacrylamid, Bistris, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Serva Blau G, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Serva Blue G250, Spermidin, TEMED, Xylenxyanol

Sigma, München: Ammoniumperoxodisulfat (APS), Aminosäuren, Ampicillin, BSA (fettsäurefrei), Cytochrom *c* (aus Pferdeherz), DMP, Ethidiumbromid, Glycerin, Kreatinphosphat, Lachsspermien-DNA, Leupeptin, β-Mercaptoethanol, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE und für die Analyse nativer Proteinkomplexe, PMSF, Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI), Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Uracil, Valinomycin A

Stratagene, Amsterdam: ExSite PCR-Based-Site-Directed Mutagenesis Kit

Whatman, Maidstone, England: DE52-Cellulose

Von der Firma Merck, Darmstadt, wurden alle übrigen Chemikalien als analysenreine Substanzen bezogen.

2.6.4 Laborgeräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevomatic 60

Appligene, Heidelberg: Agarosegel-Imaging-System „The Imager“

Beckman Instruments, München: Kühlzentrifugen J2-21, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich der Rotoren und Zentrifugenröhrchen

Bender und Hobein, München: Vortex-Mixer

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

Biorad, München: „Gene Pulser“ für Elektroporation

Braun, Melsungen: Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler

Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415

Fuji, Japan: Phosphoimager BAS 1500

Genser, Rothenburg: Gelrockner Jet1

Heraeus Christ, Osterode: Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge

Ika, Staufen: Magnetrührer

Memmert, Hannover: Wärmeschränke

Perkin Elmer Cetus, Überlingen: Atomabsorptionsspektroskop 1100B

Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte, Densitometer ImageMaster DTS, FPLC, Chromatographiesäulen, Durchflussmonitore, Fraktionssammler, Gradientenmischer, Peristaltikpumpen

Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Sterilfilter

Schütt, Göttingen: Autoklav „Bioclav“

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-240 und UV-120-02

Sigma, München: Kühlzentrifuge MK

Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München: Gelapparaturen, Semi-Dry-Blotkammern

3 Ergebnisse

3.1 Rolle von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Import von Proteinen mit internen Sortierungssignalen in die Innenmembran

3.1.1 Tim9, Tim10 und Tim12

Tim9, Tim10 und Tim12 aus *S. cerevisiae* sind essentielle mitochondriale Proteine mit einer molekularen Masse von 10,2, 10,3 bzw. 12,8 kDa, die im Intermembranraum lokalisiert sind. Tim9, Tim10 und Tim12 sind essentiell für das Zellwachstum von *S. cerevisiae* und werden für die Aufrechterhaltung normaler Mengen an Tim22 benötigt (Jarosch *et al.*, 1996, 1997; Sirrenberg *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1999). Daher lag es nahe, ihre Beteiligung am mitochondrialen Proteinimport zu untersuchen.

Tim9, Tim10 und Tim12 sind strukturell verwandt (Abb. 4). Tim10 und Tim12 besitzen ca. 35% Sequenzähnlichkeit. Tim9 weist 25% Sequenzähnlichkeit mit Tim10 und Tim12 auf. Auffallend sind vier konservierte Cysteinreste in der Sequenz von Tim9, Tim10 und Tim12, die eine Metallbindungsstelle ausbilden könnten (Zinkfinger-Motiv).

Ergebnisse

Tim12	MSFFLN ^{SL} LRGN ^Q EV ^S Q ^E K ^L LDV ^A GV ^F D ^A MCST ^F NNIL	37
Tim10	MSFL ^G FGGG ^Q P ^Q LS ^S Q ^Q K ^I QA ^A E ^A EL ^D LVTDM ^F N ^K LV	37
Tim9	MDAL ^N S ⁻⁻⁻ KE ^Q Q ^E F ^Q KVVE ^Q K ⁻⁻⁻ Q ^M KDFMRLYS ^N LV	32
Tim12	ST ^C LE ^K C ^I PHEG ^F GE ^P DL ^T K ^G EQ ^C CID ^R C ^V AK ^M HYS	73
Tim10	NN ^C Y ^K K ^C IN ^T S ⁻ YSE ^G EL ^N K ^N ESS ^C L ^D R ^C V ^A K ^Y FET	72
Tim9	ER ^C FTD ^C V ^N DF ⁻⁻ TT ^S KL ^T NK ^E Q ^T C ^I M ^K C ^S E ^K FLKH	66
Tim12	N ^R L ^I G ^F V ^Q TR ^G FGPENQLRHYS ^R F ^V AKEIADDSK	109
Tim10	N ^V Q ^V G ^E N ^M Q ^K M ^G QS ⁻⁻⁻⁻ FNAAG ^K F ⁻⁻⁻⁻⁻	93
Tim9	SER ^V G ^Q R ^F Q ^E QNAALG ⁻⁻⁻ QGL ^G R ⁻⁻⁻⁻⁻	87

Abb. 4: Tim10, Tim12 und Tim9 sind homologe Proteine.

Sequenzvergleich zwischen Tim10, Tim12 und Tim9. Identische Aminosäuren sind hellgrau, konservierte Cysteinreste schwarz markiert.

3.1.2 Membranassoziation von Tim9, Tim10 und Tim12

Zur Untersuchung der submitochondrialen Lokalisierung von Tim9, Tim10 und Tim12 wurden Mitochondrien in hypotonischem Puffer inkubiert. Durch das osmotische Schwellen werden Mitoplasten erzeugt: Die Außenmembran wird selektiv geöffnet, während die Innenmembran intakt bleibt. Die Proteine des Intermembranraums, die nicht mit den Membranen assoziiert sind, werden dabei in den Überstand freigesetzt. Ein Aliquot der Mitoplasten wurde mit 500 mM NaCl behandelt, um peripher gebundene Membranproteine abzulösen (Abb. 5).

Tim12 blieb vollständig mit den Mitoplasten (MP) assoziiert, auch nach Behandlung mit NaCl. Ein Großteil von Tim9 und Tim10 wurde nach Schwellen aus dem Intermembranraum in den Überstand freigesetzt (S). Ein geringer Teil von Tim9 und Tim10 blieb jedoch membranassoziiert (MP). Dieser Anteil ließ sich auch nicht durch NaCl ablösen, was darauf

schließen läßt, daß er fest mit den Mitoplasten assoziiert ist.

Dieses Experiment zeigt, daß der Intermembranraum nur eine Spezies von Tim12, dagegen zwei Spezies von Tim9 und Tim10 enthält. Tim12 ist ausschließlich und stabil mit der Außenseite der Innenmembran assoziiert. Der Großteil von Tim9 und Tim10 läßt sich durch Schwellen der Mitochondrien aus dem Intermembranraum freisetzen, während ein geringer Teil der beiden Proteine salzresistent mit der Innenmembran assoziiert bleibt.

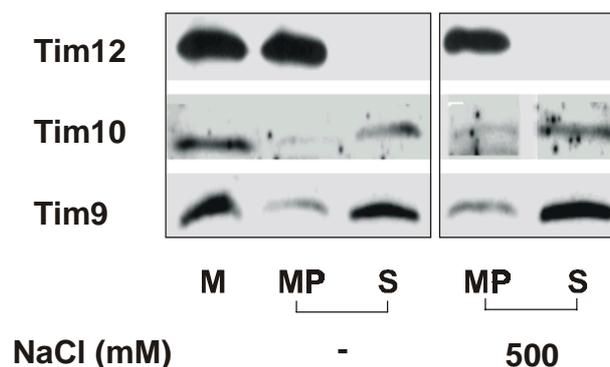


Abb. 5: Assoziation von Tim9, Tim10 und Tim12 mit der mitochondrialen Innenmembran.

Mitochondrien (M) wurden mit HS-Puffer gewaschen und danach Mitoplasten (MP) durch osmotisches Schwellen in 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2 erzeugt (30 min auf Eis). Nach Schwellen wurden die Ansätze der Mitoplasten halbiert. Einer Hälfte wurde dasselbe Volumen 1 M NaCl zugesetzt, der anderen 20 mM HEPES-KOH. Die Proben wurden weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Mitochondrien bzw. Mitoplasten sedimentiert. Die Überstände (S) wurden abgenommen und mit 12% TCA gefällt. Die Membranpellets wurden reisoliert und in Laemmli-Puffer solubilisiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration analysiert.

3.1.3 Interaktion von Tim9, Tim10, Tim12 mit der Tim22-Translokase

Die Expression von Tim9, Tim10 und Tim12 ist für die Aufrechterhaltung normaler Mengen des essentiellen Membranproteins Tim22 erforderlich (Sirrenberg *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1999). Daher lag die Überlegung nahe, ob diese Proteine in einem Komplex vorliegen. Mit Hilfe der Gelfiltration sollte nun die Interaktion von Tim9, Tim10 und Tim12 mit Tim22 sowie der Komponenten untereinander untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden Mitochondrien von einem Hefestamm isoliert, in dem der chromosomale Promotor des

Ergebnisse

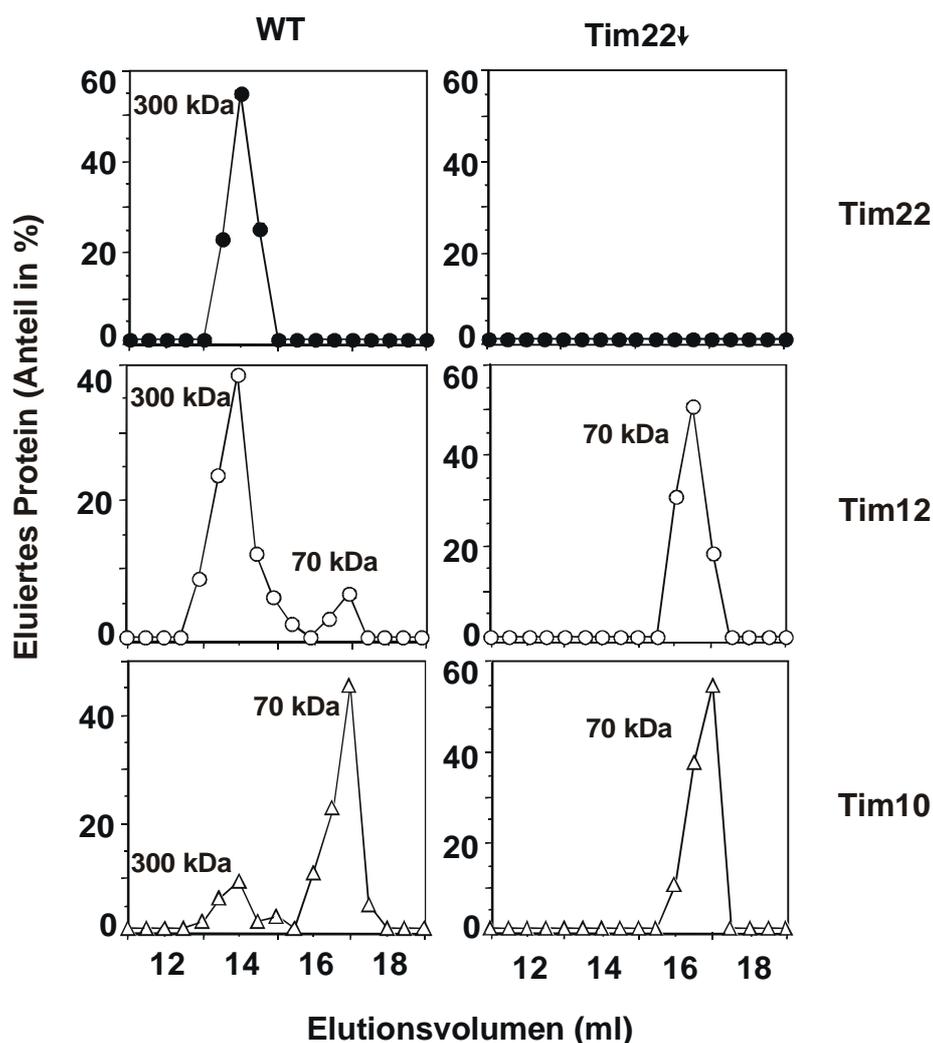
TIM22-Gens mittels Rekombination durch den Gal10-Promotor ersetzt wurde (Sirrenberg *et al.*, 1996). Die Expression von Tim22 kann somit durch die An- bzw. Abwesenheit von Galaktose im Wachstumsmedium reguliert werden. In galaktosefreiem Medium nahm die Wachstumsrate des mutierten Hefestamms ab, bis die Zellen ihr Wachstum einstellten. Die Mitochondrien wurden aus einer Tim22(Gal10)-Kultur nach fünf Generationszeiten in Abwesenheit von Galaktose isoliert (Tim22↓). Sie enthielten drastisch reduzierte Mengen an Tim22, die im Vergleich mit derselben Menge an Wildtyp-Mitochondrien unterhalb der Nachweisgrenze der Chemilumineszenz-Detektion der Immundekoration lagen.

Wildtyp und Tim22↓-Mitochondrien wurden mit Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurde der lösliche Überstand mittels Gelfiltration auf einer Superose 6-Säule analysiert. Die eluierten Proteine wurden fraktioniert und mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration analysiert. Bei der Gelfiltration von Wildtyp-Mitochondrien eluierte Tim22 in Fraktionen, die einem hochmolekularen Komplex mit einer apparenten molaren Masse von 300 kDa entsprechen (Abb. 6A). Tim12 wie auch ein Teil von Tim9 und Tim10 eluierten ebenfalls in diesen Fraktionen. Der überwiegende Anteil von Tim9 und Tim10 eluierte in einem Komplex von etwa 70 kDa. Keine der untersuchten Komponenten wurde mit dem TIM23-Komplex koeluiert (250 kDa). Bei der Chromatographie von Tim22↓-Mitochondrien, also in Abwesenheit von Tim22, eluierten Tim9, Tim10 und Tim12 ausschließlich in Fraktionen, die einer molekularen Masse von ca. 70 kDa entsprechen. Abb. 6A zeigt die Gelfiltrationsläufe, die mit Antikörpern gegen Tim22, Tim12 und Tim10 analysiert wurden. Die Signale der Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim9 entsprachen den Elutionsprofilen von Tim10, die Intensität war jedoch im Vergleich zum unspezifischen Hintergrund auf den Röntgenfilmen zu schwach, um sie hinreichend genau zu quantifizieren.

Um ein ausreichendes Signal für die Quantifizierung von Tim9 zu erhalten, wurden Wildtyp-Hefezellen metabolisch mit [³⁵S]-Sulfat markiert. Anschließend wurden Mitochondrien isoliert, mit Digitonin solubilisiert und mittels Gelfiltration analysiert. Die Fraktionen wurden zur Immunfällung mit Antikörpern gegen Tim10 eingesetzt. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE, Autoradiographie (Abb. 6B) und Quantifizierung der Signale mit Hilfe eines Phosphoimager-Systems (Abb. 6C) analysiert. Tim12 eluierte ausschließlich im 300 kDa-Komplex mit Tim22. Die Assoziation mit Tim22 wurde durch Koimmunfällung

nachgewiesen (Sirrenberg *et al.*, 1998). Dies bestätigt, daß im Intermembranraum nur eine Spezies von Tim22 vorliegt. Etwa 25% von Tim9 und Tim10 waren ebenfalls Teil des 300 kDa-Komplexes. Der Großteil von Tim9 und Tim10 eluierte als Komplex von 70 kDa. Die Gelfiltrationen zeigen also, daß Tim12 und ein Teil von Tim9 und Tim10 mit Tim22 in einem 300 kDa-Komplex vorliegen, dem TIM22-Komplex. Tim12 ist ausschließlich mit Tim22 assoziiert. In Abwesenheit von Tim22 wurde Tim12 in einem Komplex von 70 kDa eluiert. Von Tim9 und Tim10 existieren zwei Spezies: Etwa 25% der beiden Proteine eluieren mit dem TIM22-Komplex, der überwiegende Anteil liegt in einem Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa vor, dem TIM9·10-Komplex. Dies könnte auf eine dynamische Assoziation von Tim9 und Tim10 mit der TIM22-Translokase hinweisen.

A



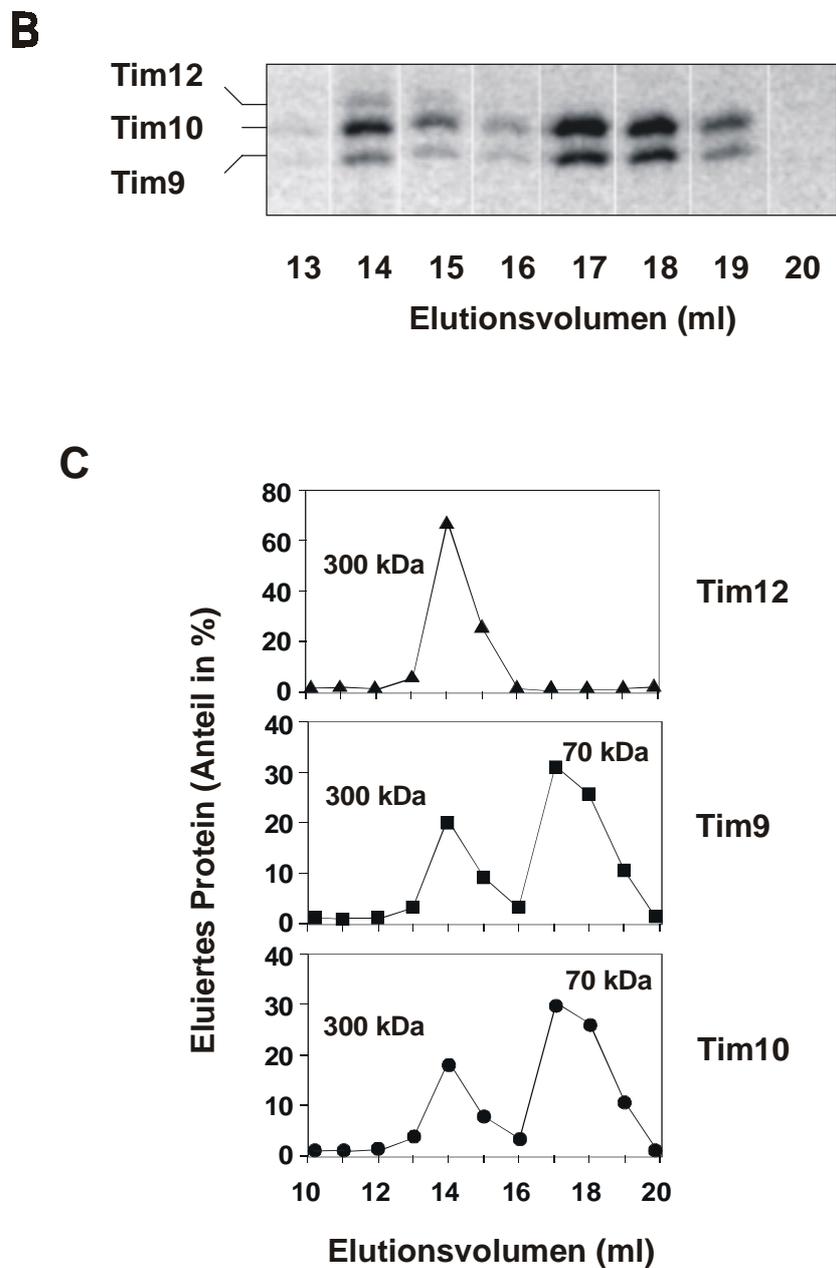


Abb. 6: Tim9, Tim10 und Tim12 sind mit der Tim22-Translokase in einem 300kDa-Komplex assoziiert, Tim9 und Tim10 liegen überwiegend in einem 70 kDa-Komplex vor.

(A) Gelfiltrationsanalysen von Tim10, Tim12 und Tim22. Je 2,5 mg Wildtyp 334- und Tim22[↓]-Mitochondrien wurden in Solubilisierungspuffer (20 mM HEPES/KOH, pH7,4, 150 mM Kaliumacetat, 1 mM Zinkacetat, 1 mM PMSF, Aprotinin, Leupeptin, -Macroglobulin) mit 1% Digitonin für 30 min auf Eis solubilisiert. Nach einer Zentrifugation (30 min, 45000 UpM, TLA45-Rotor, Beckman-Zentrifuge, 4°C) wurde der Überstand auf eine Superose 6-Säule aufgetragen (25 ml Gelbett, Flußrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen (0,5 ml) wurden gesammelt

und nach einer TCA-Fällung mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10, Tim12 und Tim22 analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Laserdensitometrie der Röntgenfilme. Die Eichkurve wurde mit folgenden Markerproteinen erstellt: Rinderthyroglobulin (669 kDa), Apoferritin aus *S.c.* (443 kDa), Alkoholdehydrogenase aus *S.c.* (150 kDa), Rinderserumalbumin (66kDa) und Rindererythrocyten-Carboanhydrase (29 kDa).

(B) Elutionsprofil der Gelfiltration von [³⁵S]-Sulfat-markierten Wildtyp-Mitochondrien und anschließender Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tim10. Es wurden 0,5 mg radioaktive Mitochondrien mit 1% Digitonin wie unter (A) solubilisiert und zur Gelfiltration eingesetzt. Die Fraktionen à 0,5 ml wurden mit 1% TritonX-100 und 0,05% SDS versetzt und mit Antikörpern gegen Tim10 immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

(C) Quantifizierung der immunpräzipitierten Eluate der Gelfiltration von [³⁵S]-Sulfat-markierten Wildtyp-Mitochondrien. Die Banden des SDS-Gels (s. (B)) wurden mit einem Phosphorimager-System quantifiziert.

3.1.4 Rolle von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Proteinimport

3.1.4.1 Import von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz im Vergleich zu Proteinen mit internem Sortierungssignal

Proteine mit spaltbarer N-terminaler Präsequenz werden über den TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix transportiert (Übersichtsartikel: Neupert, 1997). Integrale Innenmembranproteine mit internem Sortierungssignal werden dagegen durch den TIM22-Komplex importiert. Hierzu gehören die Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie (Bauer *et al.*, 2000). Es sollte untersucht werden, ob Tim9, Tim10 bzw. Tim12 am Import von Vorstufenproteinen beteiligt sind.

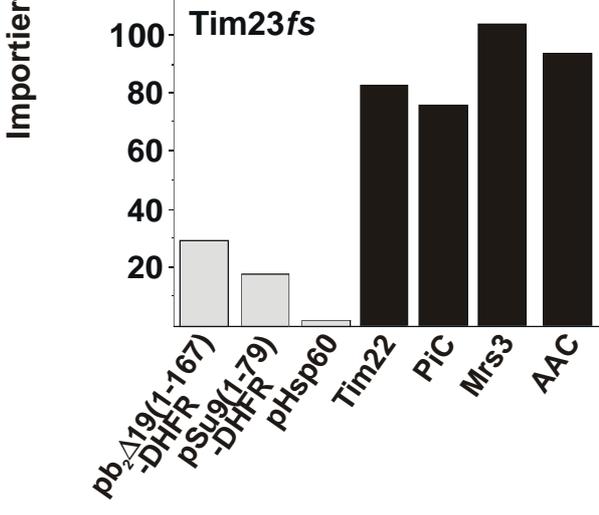
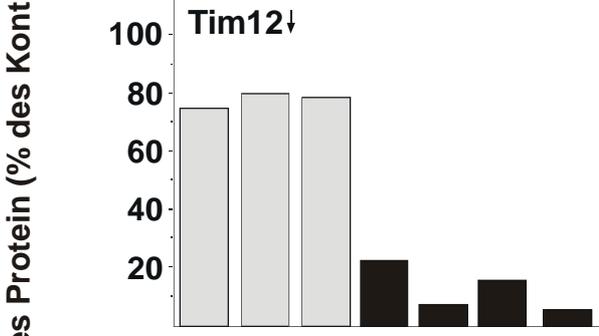
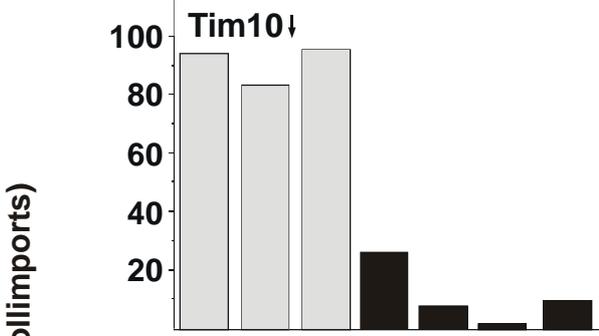
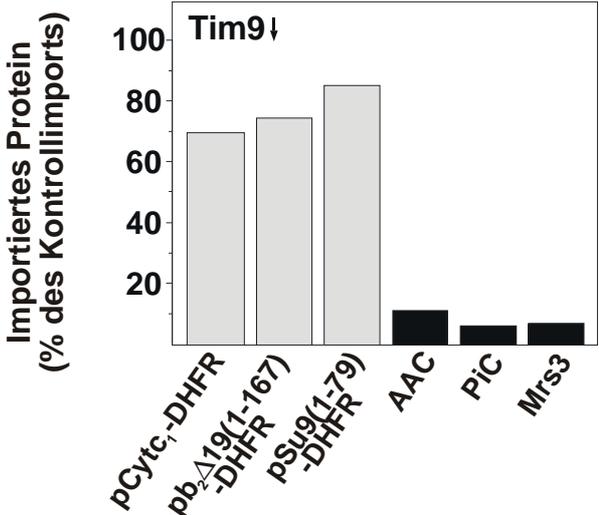
Hierzu wurden Mitochondrien aus Wildtyp-Hefe 334 (334) sowie den Hefestämmen Tim9(Gal10), Tim10(Gal10), und Tim12(Gal10) verwendet, in denen das entsprechende TIM-Gen unter der Kontrolle des Gal10-Promoters exprimiert wird (s. Kap. 3.1.3). Die Tim9↓-, Tim10↓-, bzw. Tim12↓-Mitochondrien wurden nach 15 h Wachstum in galaktosefreiem Medium isoliert. Der mutierte Hefestamm Tim23(fs) exprimiert eine Tim23-Variante, die aufgrund einer Leserasterverschiebung nach dem Methionin 178 eine kurze C-terminale Deletion aufweist. Diese Tim23-Variante ist *in situ* instabil. In Tim23(fs)-

Ergebnisse

Mitochondrien sind daher nur geringe Mengen *In vitro* in Anwesenheit von [³⁵S] Sulfat synthetisierte Vorstufen mitochondrialer Proteine wurden in isolierte Wildtyp 334-, Tim9↓-, Tim10↓-, Tim12↓- und Tim23(fs)-Mitochondrien importiert. Einerseits wurde der Import von Präproteinen untersucht, die eine N-terminale Präsequenz besitzen wie pHsp60, pCyt c₁-DHFR, pSu9(1-79)-DHFR und pb₂Δ19(1-167)-DHFR. Andererseits wurden Vorstufenproteine mit internen Importsignalen importiert: Dies waren die Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie AAC, PiC und Mrs3 sowie die Vorstufe von Tim22, dessen Importweg nicht bekannt ist.

In Tim9↓-, Tim10↓- und Tim12↓-Mitochondrien wurden Präproteine mit N-terminaler Präsequenz mit vergleichbaren Effizienz wie in die isogenen Wildtyp-Mitochondrien importiert. Im Gegensatz dazu war der Import von Mitgliedern der mitochondrialen Carrier-Familie, drastisch reduziert (Abb. 7). Auch der Import von Tim22 war in Tim10↓- und Tim12↓-Mitochondrien um 80% reduziert. In Tim23(fs)-Mitochondrien wurden die Vorstufen mit internem Importsignal mit gleicher Effizienz wie in Wildtyp-Mitochondrien importiert, der Import von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz war dagegen signifikant inhibiert.

Tim9, Tim10 und Tim12 werden also für den Import von Proteinen mit internem Importsignal benötigt, die von der TIM22-Translokase in die mitochondriale Innenmembran inseriert werden. Dazu gehören nicht nur die Mitglieder der Carrier-Familie, sondern auch die Vorstufe von Tim22. Im Gegensatz dazu werden Proteine mit einem N-terminalen Matrixsortierungssignal unabhängig von Tim9, Tim10 und Tim12 über den TIM23-Komplex importiert.



Ergebnisse

Abb. 7: *In vitro*-Import von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz bzw. mit internem Importsignal

Verschiedene [³⁵S]-markierte Vorstufen mitochondrialer Proteine wurden für 5 min bei 25°C in die jeweiligen Mitochondrien importiert. Danach wurden die Mitochondrien 30 min mit 200 µg/ml Proteinase K auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF und 5minütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, mit HS-Puffer (1 mM PMSF) gewaschen und durch SDS-PAGE mit nachfolgendem Transfer auf Nitrozellulose analysiert. Die Signale der radioaktiv markierten Proteine wurden mit einem Phosphoimager-System quantifiziert. Der Import der Vorstufenproteine in Wildtyp-Mitochondrien wurde gleich 100% gesetzt. (Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit C. Sirrenberg.)

3.1.4.2 Rolle von Tim9 beim Import des AAC

Der Import und die Membraninsertion des ADP/ATP-Carriers (AAC) wird durch den TIM22-Komplex vermittelt. Der Import des AAC ist membranpotentialabhängig. In Abwesenheit eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, akkumuliert der AAC als Translokationsintermediat auf seinem Weg in die Innenmembran (Stufe III). Dabei ist das AAC-Vorstufenprotein teilweise über die Außenmembran transloziert und mit Komponenten des TOM-Komplexes in Kontakt (Söllner *et al.*, 1992). Das Stufe III-Translokationsintermediat zeichnet sich dadurch aus, daß es bei Behandlung mit geringen Mengen an Proteinase K (30 µg/ml) resistent ist und charakteristische proteolytische Fragmente liefert. Diese sind etwa 2-4 kDa kleiner als die AAC-Vorstufe (Kübrich *et al.*, 1998). Die nach Stufe III folgende membranpotentialabhängige Insertion des AAC in die Innenmembran erfolgt durch den TIM22-Komplex. Bei Behandlung von Mitoplasten mit Proteinase K ist der inserierte AAC (Stufe IV) resistent, liefert jedoch ein charakteristisches Fragment, das etwa 1 kDa kleiner ist als das Vorstufenprotein (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997; Kübrich *et al.*, 1998).

Für den Import des AAC auf Stufe III wird Tim10, nicht aber Tim12 benötigt. Tim12 vermittelt die nachfolgende Insertion des AAC in die Innenmembran (Sirrenberg *et al.*, 1998, Koehler *et al.*, 1998a). Es sollte untersucht werden, ob und bei welcher Stufe des Imports der AAC-Vorstufe Tim9 mit dem Vorstufenprotein interagiert.

In vitro synthetisiertes, radioaktiv markiertes AAC-Vorstufenprotein wurde in isolierte Wildtyp- und Tim9↓-Mitochondrien sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Membranpotentials ($\Delta\psi$) importiert. Die Ansätze wurden dreigeteilt. Ein Aliquot wurde mit weiter behandelt, ein weiteres mit Proteinase K verdaut, um nichtimportierte Proteine

abzubauen und den Import des AAC über die Außenmembran zu untersuchen. Das dritte Aliquot wurde zur Erzeugung von Mitoplasten eingesetzt, welche ebenfalls mit Proteinase K behandelt wurden, um die Membraninsertion des AAC zu untersuchen (Stufe IV).

In Anwesenheit von $\Delta\psi$ war das AAC-Vorstufenprotein in Wildtyp-Mitochondrien geschützt, in Mitoplasten wurde ein proteolytisches Fragment (*) erzeugt (Abb.8, links). Dies zeigt die Insertion des AAC in die Innenmembran an. Bei $\text{Tim9}\downarrow$ -Mitochondrien erfolgte die Membraninsertion mit drastisch reduzierter Effizienz. In Abwesenheit von $\Delta\psi$ war die AAC-Vorstufe partiell proteaseresistent; es wurde das charakteristische Stufe III-Fragment (***) erzeugt (Abb. 8, rechts). Im Gegensatz dazu wurde das AAC-Vorstufenprotein in $\text{Tim9}\downarrow$ -Mitochondrien durch Proteinase K verdaut, hatte demnach Stufe III nicht erreicht. In beiden Fällen war das Vorstufenprotein nach Öffnen der Außenmembran nicht proteaseresistent, wurde also ohne $\Delta\psi$ nicht in die Innenmembran inseriert.

Dies zeigt, daß Tim9 für den Import des AAC benötigt wird, um die Stufe III zu erreichen.

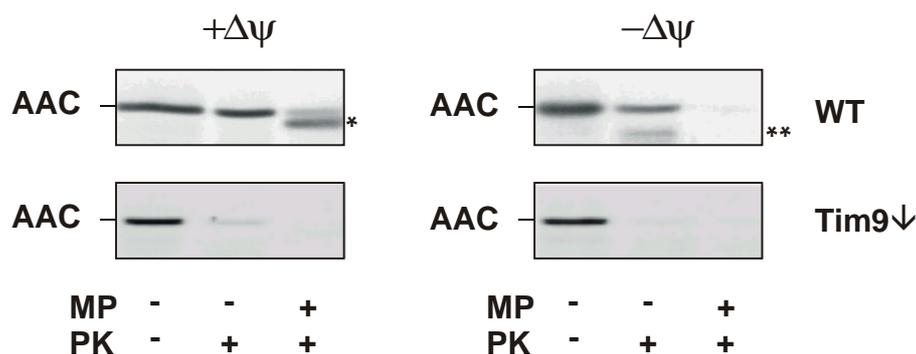


Abb. 8: Tim9 wird für den Import von AAC auf Stufe III benötigt

Das AAC-Vorstufenprotein wurde in Wildtyp- und in $\text{Tim9}\downarrow$ -Mitochondrien für 5 min bei 25°C in An- bzw. Abwesenheit eines Membranpotentials () importiert. Nach dem Import wurde der Ansatz dreigeteilt, und die Aliquots wurden wie angegeben behandelt. Links: Die Mitochondrien wurden mit Proteinase K (PK; 200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt, um den Import über die Außenmembran zu messen. Die erzeugten Mitoplasten wurden mit 200 $\mu\text{g/ml}$ PK verdaut, um die Insertion in die Innenmembran durch das resultierende Fragment ** aufzuzeigen. Rechts: Die Aliquots wurden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ PK behandelt, um den Import des AAC auf Stufe III zu untersuchen. Der AAC auf Stufe III liefert das charakteristische proteolytische Fragment *. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

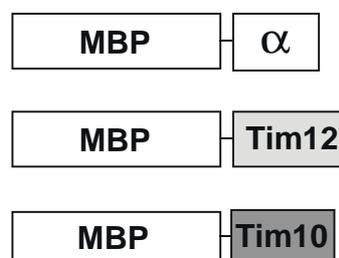
3.1.5 Tim10 und Tim12 sind zinkfingerähnliche Proteine

Auffallend in der Sequenz von Tim10 und Tim12 sind jeweils vier konservierte Cysteinreste, die eine Metallbindungsstelle ausbilden könnten (Cys₄-Motiv). Ähnliche Cys₄-Motive wurden in sogenannten Zinkfinger-Proteinen gefunden (Berg und Shi, 1996; Mackay und Crossley, 1998). Diese können äquimolare Mengen an Zn²⁺-Ionen binden (Klug und Schwabe, 1995). Es wurde gezeigt, daß die Interaktion der AAC-Vorstufe mit Tim10 und Tim12 von der Gegenwart zweiwertiger Metallionen abhängt (Sirrenberg *et al*, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob Tim10 und Tim12 zinkbindende Proteine sind.

3.1.5.1 Expression der Fusionsproteine MBP- α -Untereinheit der β -Galaktosidase, MBP-Tim10 und MBP-Tim12

Die Fusionsproteine MBP-Tim10 und MBP-Tim12, bestehend aus dem Maltosebindungsprotein (MBP) und Tim10 bzw. Tim12, wurden in Gegenwart von Zn²⁺-Ionen in *E.coli* exprimiert (schematische Darstellung s. Abb. 9A). Die Proteinexpression wurde durch IPTG induziert. Nach dem Zellaufschluss wurden die rekombinanten Proteine über Amylosesäulen gereinigt (Abb. 9B). Zur Kontrolle wurde MBP- α , eine Fusion des Maltosebindungsproteins mit dem α -Fragment der β -Galaktosidase, ebenfalls gereinigt und untersucht (Abb. 9B). Die Proteinkonzentration der eluierten Fraktionen wurde nach Bradford ermittelt.

A



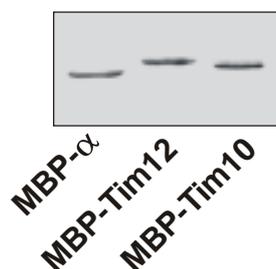
B

Abb. 9: Expression der Fusionsproteine MBP- α , MBP-Tim10 und MBP-Tim12

(A) Schematische Darstellung der Fusionsproteine MBP- α , MBP-Tim10 und MBP-Tim12, bestehend aus dem Maltosebindungsprotein (MBP) und dem α -Fragment der β -Galactosidase (α), Tim10 bzw. Tim12.

(B) Expression und Reinigung der Fusionsproteine. Der Rohextrakt wurde auf eine Amylosesäule aufgetragen. Die Säule wurde gewaschen und gebundenes Protein mit 10 mM Maltose in Waschpuffer eluiert. Nachfolgend wurde der Proteingehalt nach Bradford ermittelt. Je 1 μ g Protein wurden durch SDS-PAGE und Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue analysiert.

3.1.5.2 MBP-Tim10 und MBP-Tim12 sind zinkbindende Proteine

Der Zinkgehalt der rekombinanten Proteine wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ermittelt. Es wurde ein Gehalt von 0.92 mol Zn^{2+} /mol MBP-Tim10 und 0.99 mol Zn^{2+} /mol MBP-Tim12 erhalten (Abb. 10A). Die Präparation von MBP- α enthielt keine Zink-Ionen (Hintergrundwerte der AAS). Dies zeigt, daß Tim10 und Tim12 äquimolare Mengen an Zn^{2+} -Ionen binden.

Das Fusionsprotein MBP-Tim12 wurde an eine Amylosesäule gebunden. Es wurde vor der Elution mit EDTA inkubiert, was seinen Zn^{2+} -Gehalt auf den Hintergrundwert reduzierte. Durch eine nachfolgende Inkubation mit Zn^{2+} -Ionen konnte der Metallgehalt des Proteins wiederhergestellt werden (Abb. 10B). Daraus kann geschlossen werden, daß die Zinkbindung von Tim12 reversibel ist. Um zu zeigen, daß die Zinkbindung der Fusionsproteine über Cysteinreste vermittelt wird, wurde das chemische Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM)

Ergebnisse

verwendet. NEM ethyliert spezifisch Sulfhydrylgruppen von Cysteinseitenketten, sodaß diese nicht mehr zur Zinkbindung beitragen können. Das Fusionsprotein MBP-Tim12 wurde an Amyloseharz gebunden und auf der Säule mit NEM inkubiert. Danach wurde die Säule gewaschen, um nicht gebundene Zink-Ionen zu entfernen. Das Protein wurde eluiert und die Konzentration der proteinhaltigen Fraktionen ermittelt. Der Zinkgehalt dieser Fraktionen wurde durch AAS bestimmt. Das mit NEM behandelte Protein enthielt keine signifikanten Mengen an Zn^{2+} -Ionen (Abb. 10B). Zur Kontrolle wurde MBP-Tim12 unbehandelt im selben Experiment untersucht.

Diese Experimente zeigen, daß Tim10 und Tim12 äquimolare Mengen an Zn^{2+} -Ionen binden. Die reversible Zinkbindung wird von den Sulfhydrylgruppen der Cysteinseitengruppen vermittelt. Tim10 und Tim12 verhalten sich also wie Proteine, die ein Cys_4 -Zinkfingermotiv enthalten.

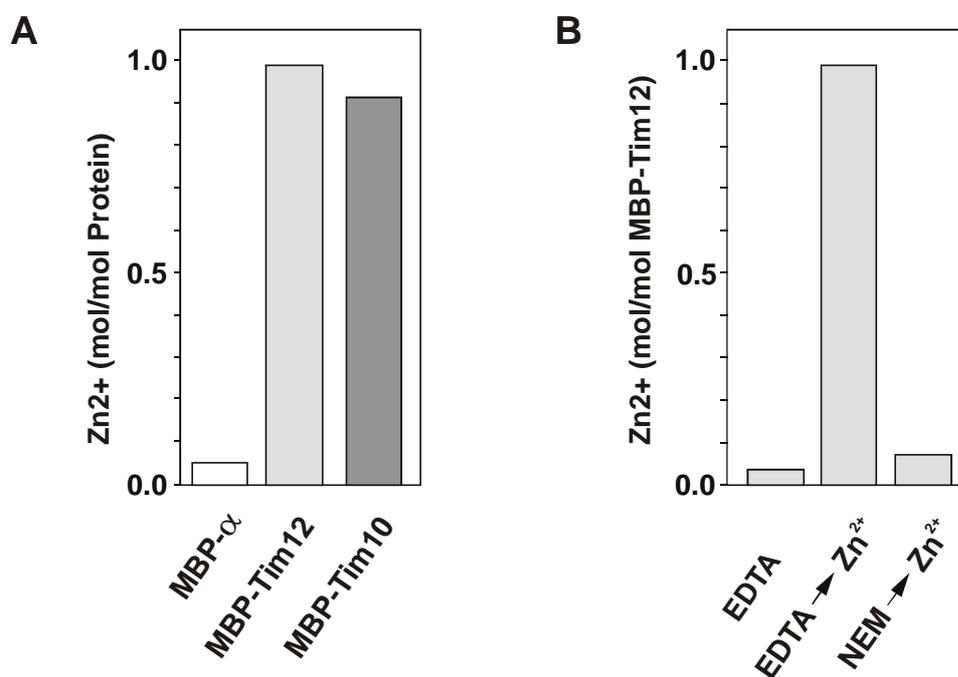


Abb. 10: Zinkbindung von Tim10 und Tim12

(A) Zn^{2+} -Gehalt der gereinigten Fusionsproteine. Je 1 mg/ml der Fusionsproteine wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) untersucht.

(B) Die Zinkbindung von MBP-Tim12 ist reversibel und wird durch die Sulfhydrylgruppen der

Cysteinseitenketten vermittelt. MBP-Tim12 wurde an Amyloseharz gebunden und in Gegenwart von 10 mM EDTA und 10 mM o-Phenanthrolin bzw. mit 2 mM NEM in Waschpuffer (20 mM HEPES, pH 7,2, 200 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol) für eine Stunde bei 4°C vorinkubiert. Die Proben wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit 1 mM Zinkacetat für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen, um nichtgebundene Zn^{2+} -Ionen zu entfernen. Die Proteine wurden mit 10 mM Maltose in Waschpuffer eluiert. Nachfolgend wurde der Proteingehalt nach Bradford und der Zn^{2+} -Gehalt mittels AAS bestimmt.

3.2 Import und Insertion des AAC in die Innenmembran

3.2.1 Modulare Struktur des AAC

Der ADP/ATP-Carrier (AAC) ist Mitglied der mitochondrialen Carrier-Familie (MCF). Das integrale Membranprotein durchspannt die Innenmembran mit sechs Transmembrandomänen. Die AAC-Sequenz ist aus drei strukturell verwandten Modulen von etwa 100 Aminosäuren aufgebaut. Jeder Modul enthält zwei Transmembransegmente, die durch einen hydrophilen Loop verbunden sind, welcher im assemblierten AAC in die mitochondriale Matrix exponiert ist. Jeder Loop enthält die sog. „Carrier-Signatur“, ein Motiv, das in allen Mitgliedern der MCF konserviert ist. Bisher war bekannt, daß der AAC keine N-terminale Signalsequenz besitzt, jedoch mindestens zwei interne Importsignale (s. Kap. 1.3.2). Aufgrund seiner modularen Struktur lag es nahe, zu untersuchen, ob jeder Modul des AAC ein unabhängiges internes Signal für den Import in Mitochondrien besitzt. Hierzu wurde jeder Modul einzeln in pGEM4 kloniert, um durch *in vitro*-Transkription und -Translation [³⁵S]-markierte Vorstufenproteine zu erhalten und diese in Mitochondrien zu importieren. Für weitere Untersuchungen wurden zwei C-terminale Deletionsmutanten konstruiert, welchen die letzte bzw. die letzten beiden Transmembrandomänen fehlen (TM1-L5 bzw. TM1-4). Abb. 11 zeigt eine schematische Darstellung aller verwendeten Konstrukte.

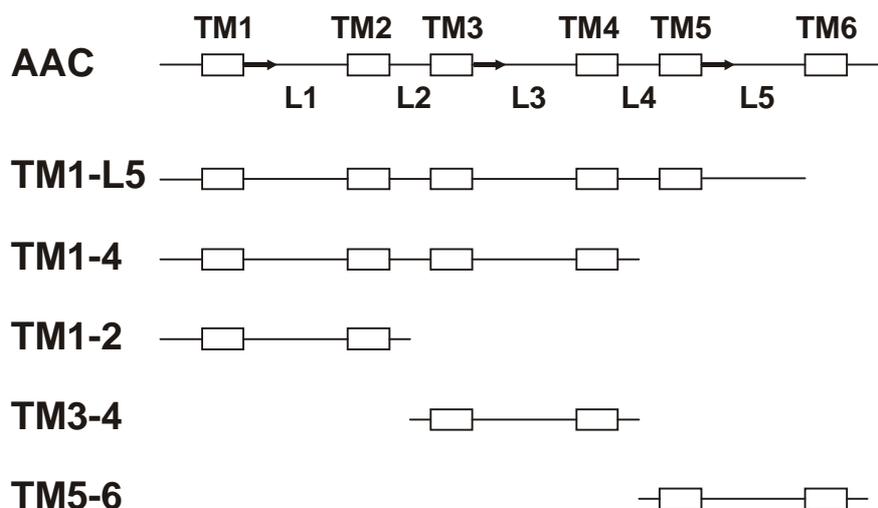


Abb. 11: Schematische Darstellung des AAC und der untersuchten Vorstufenproteine

Der ADP/ATP-Carrier (AAC) besteht aus drei repetitiven Modulen. Je zwei Transmembrandomänen (TM) eines Moduls sind durch eine hydrophile Schleife (L) verknüpft. Die konservierte „Carrier-Signatur“ ist durch Pfeile dargestellt.

3.2.2 Import der einzelnen Module des AAC

Um zu untersuchen, ob jeder Modul ein internes Signal für den Import in Mitochondrien besitzt, wurden die *in vitro* synthetisierten, radioaktiv markierten Vorstufenproteine (3.2.1, Abb. 11) in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Nach dem Import wurde der Ansatz dreigeteilt. Ein Aliquot wurde unbehandelt gelassen. Ein weiteres Aliquot wurde mit Proteinase K (PK) verdaut, um den Import über die Außenmembran zu untersuchen. Das dritte Aliquot wurde zur Erzeugung von Mitoplasten verwendet, welche ebenfalls mit PK behandelt, um die Insertion in die Innenmembran zu analysieren.

Zunächst wurde der AAC in Gegenwart eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, importiert. Das Vorstufenprotein war mit Mitochondrien assoziiert (Abb. 12). Ein signifikanter Teil des AAC war resistent gegen PK-Behandlung, also über die Außenmembran importiert (+PK). Wurden Mitoplasten mit Proteinase K verdaut, so wurde der AAC zu einem proteolytischen Fragment (*) geschnitten, das 1-2 kDa kleiner war als die Vorstufe (+MP, +PK). Dies zeigt, daß der

Ergebnisse

AAC in die Innenmembran inseriert wurde (Stufe IV, s. Kap. 3.1.4.2). In Abwesenheit von $\Delta\psi$ war die AAC-Vorstufe teilweise proteaseresistent und lieferte die für Stufe III charakteristischen Fragmente (**), die 2-4 kDa kleiner waren als das Vorstufenprotein. In Mitoplasten wurde die AAC-Vorstufe dagegen vollständig von PK abgebaut. Ohne Membranpotential akkumulierte der AAC also auf Stufe III, ein Translokationsintermediat, das teilweise über die Außenmembran transloziert und für Proteasen zugänglich ist (s. 3.1.4.2).

Die Vorstufen von TM1-2 (Modul 1) und TM3-4 (Modul 2) wurden sowohl mit als auch ohne Membranpotential importiert. Die Proteine waren in Mitochondrien gegen den Abbau durch PK geschützt (Abb. 12, +PK). Nach Öffnen der Außenmembran durch osmotisches Schwellen wurden TM1-2 und TM3-4 vollständig durch Proteinase K verdaut (+MP, +PK). Dies zeigt, daß sie über die äußere Membran in den Intermembranraum importiert, jedoch nicht in die Innenmembran inseriert. TM5-6 (Modul 3) wurde nur in Gegenwart eines Membranpotentials importiert. Es war in Mitochondrien proteaseresistent und lieferte nach PK-Behandlung von Mitoplasten ein proteolytisches Fragment (*). Dies zeigt, daß TM5-6 in die Innenmembran inseriert wurde. In Abwesenheit von $\Delta\psi$ assoziierte das Vorstufenprotein mit den Mitochondrien, war jedoch nicht vor Proteaseabbau geschützt. Dies weist darauf hin, daß es nicht vollständig über die Außenmembran transloziert wurde.

Jeder der drei Module des AAC besitzt demnach ein unabhängiges Importsignal. Modul 1 und Modul 2 enthalten ein internes Signal für den Import über die Außenmembran. Die Translokation ist dabei unabhängig von der Anwesenheit eines Membranpotentials. Modul 3 dagegen enthält ein internes Importsignal für die membranpotentialabhängige Insertion in die Innenmembran. In Abwesenheit von $\Delta\psi$ wird Modul 3 nicht oder nur teilweise über die Außenmembran transloziert. Damit verhält sich Modul 3 ähnlich wie die AAC-Vorstufe.

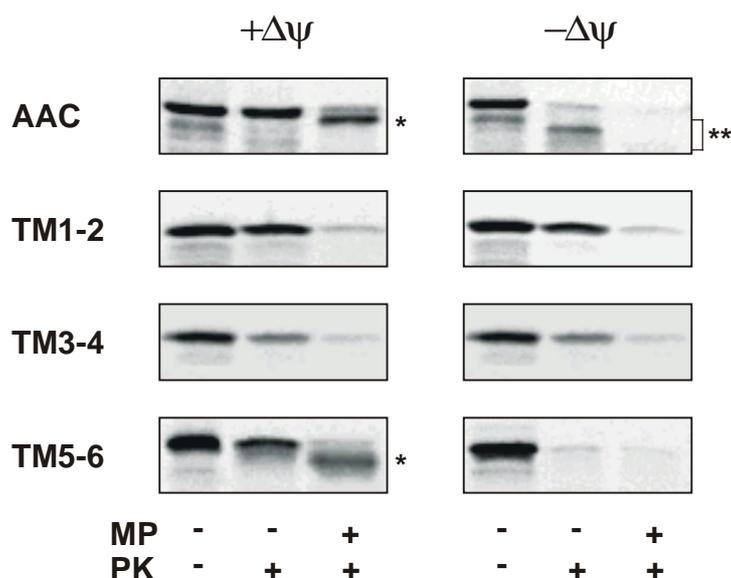


Abb. 12: Jeder Modul des AAC besitzt ein internes Importsignal.

Die [^{35}S]-markierten Vorstufenproteine (s. Abb. 10) wurden für 5 min bei 25°C mit bzw. ohne Membranpotential ($\Delta\psi$) in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Danach wurde der Ansatz dreigeteilt. Ein Aliquot wurde unbehandelt gelassen. Das zweite wurde mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) behandelt, um die Translokation über die Außenmembran zu untersuchen. Das dritte Aliquot wurde zur Erzeugung von Mitoplasten verwendet, welche mit 200 $\mu\text{g/ml}$ PK behandelt wurden, um die Insertion in die Innenmembran aufzuzeigen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

3.2.3 Interaktion des AAC auf Stufe III mit dem TOM-Komplex

Da spezifisch Modul 3 (TM5-6) die membranpotentialabhängige Insertion des AAC in die Innenmembran vermittelt, sollte dieser Bereich des AAC näher charakterisiert werden. Das Stufe III-Intermediat des AAC ist nur teilweise über die Außenmembran transloziert und interagiert mit dem TOM-Komplex (s. Kap. 1.3.2). Also könnte im Bereich von TM5-6 eine Region liegen, die für die Interaktion mit dem TOM-Komplex verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen wurden ^{35}S -markierte Vorstufenproteine von AAC sowie den C-terminalen Deletionsmutanten TM1-L5 und TM1-4 (Modul 1+2) in Wildtyp-Mitochondrien importiert.

Das AAC-Vorstufenprotein, das zur Kontrolle importiert wurde, lieferte in Abwesenheit eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, nach Proteinase K-Behandlung (+PK) die charakteristischen Stufe III-Fragmente (**). In Gegenwart von $\Delta\psi$ wurde das in die Innenmembran inserierte

Ergebnisse

Fragment (*) (Abb. 13 links, Spur 2) erhalten. TM1-L5 akkumulierte jedoch sowohl mit als auch ohne Membranpotential auf Stufe III. Bei PK-Behandlung lieferte TM1-L5 proteolytische Fragmente (**), welche die gleiche Größe hatten wie die Stufe III-Fragmente des AAC (Abb. 13). Nach Proteasebehandlung von Mitoplasten wurde TM1-L5 vollständig verdaut. Dies zeigt, daß TM1-L5 Stufe III erreicht hatte, aber nicht in die Innenmembran inseriert wurde. Im Gegensatz dazu war TM1-4 nicht zugänglich für PK. Es wurden keine proteolytischen Fragmente erhalten. TM1-4 war also von außen nicht proteasezugänglich. In Mitoplasten war es nicht proteaseresistent, wurde also in den Intermembranraum importiert. Damit verhielt sich TM1-4 wie die einzelnen Module 1 und 2 (TM1-2 bzw. TM3-4; s. Abb. 11).

Die Deletionsmutante TM1-L5 liefert also beim Import ohne Membranpotential nach Verdau der Mitochondrien mit Proteinase K proteolytische Fragmente, die charakteristisch für das Stufe III-Translokationsintermediat des AAC sind. TM1-4 wird dagegen in den Intermembranraum importiert und ist proteaseresistent. Diese Experimente lassen darauf schließen, daß die Interaktion der Vorstufenproteine auf Stufe III durch einen Bereich des AAC vermittelt wird, der zwischen der Transmembrandomäne 5 (TM5) und dem Ende des Loops 5 (L5) (s. Abb. 11) liegt.

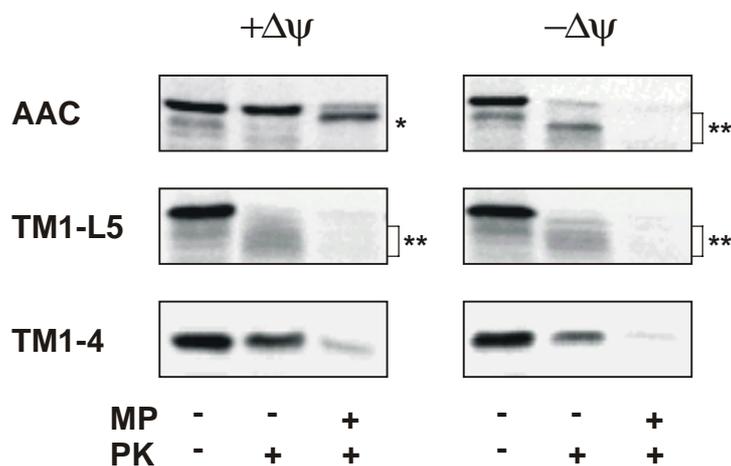


Abb. 13: Partielle Translokation des AAC über die Außenmembran

Die radioaktiv markierten Vorstufenproteine (s. Abb. 10) wurden für 5 min bei 25°C mit bzw. ohne Membranpotential ($\Delta\psi$) in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Danach wurde der Ansatz dreigeteilt. Je ein Aliquot wurde unbehandelt gelassen oder unter isoosmotischen Bedingungen bzw. hypotonen Schwellungsbedingungen (MP) mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) behandelt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

3.2.4 Charakterisierung des membranpotentialabhängigen Insertionsignals des AAC liegt in Modul 3

Wie die Importexperimente der drei Module des AAC zeigten, besitzt nur Modul 3 ein Importsignal für die membranpotentialabhängige Insertion in die Innenmembran (s. Kap. 3.2.2). Um dies weiter zu unterstützen, wurden die radioaktiv markierten Vorstufenproteine von AAC, TM1-L5, TM1-4 sowie TM5-6 in Mitochondrien importiert. Diese wurden nachfolgend mit Carbonat behandelt, um periphere Membranproteine zu extrahieren. Integrale Membranproteine sedimentieren nach Carbonatbehandlung bei Zentrifugation mit den Membranen.

Nach dem Import und Carbonatbehandlung wurden AAC und TM5-6 im Membranpellet (P) erhalten (Abb. 14). Dies bestätigt, daß sie in die Innenmembran inseriert wurden. Die C-terminal verkürzten Vorstufen TM1-L5 und TM1-4 lagen dagegen im Überstand (S) vor, wurden also nicht inseriert. Dies zeigt, daß für die membranpotentialabhängige Insertion des AAC der ganze Modul 3 (TM5-6) benötigt wird.

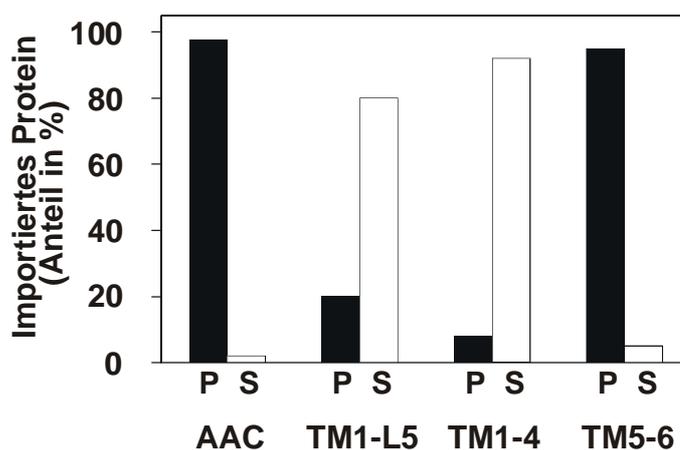


Abb. 14: Membraninsertion des AAC, der C-terminalen Deletionsmutanten TM1-L5 und TM1-4 sowie von TM5-6

Ergebnisse

Carbonatextraktion der Vorstufen von AAC, TM1-L5, TM1-4 und TM5-6. Die radioaktiv markierten Vorstufen wurden in Anwesenheit von $\Delta\psi$ für 10 min bei 25°C in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Danach wurden die Mitochondrien mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) behandelt, um nicht importierte Vorstufen zu verdauen (TM1-4; TM1-L5), oder Mitoplasten wurden erzeugt und ebenfalls mit PK verdaut, um nicht inseriertes Vorstufenprotein zu entfernen (AAC, TM5-6). Die Proben wurden sedimentiert, mit HS (1 mM PMSF) gewaschen und zur Carbonatextraktion eingesetzt. Die Membranfraktion (P) wurde durch Ultrazentrifugation (30 min, 45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor, 4°C) sedimentiert (P). Der Überstand (S) wurde mit TCA gefällt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert. Die radioaktiven Signale wurden durch Laserdensitometrie quantifiziert.

3.2.5 Der C-terminale Bereich des AAC wird für die Insertion in die Innenmembran benötigt

Nachdem gezeigt wurde, daß Modul 3 die membranpotentialabhängige Insertion des AAC in die Innenmembran vermittelt, sollte dies durch Chase-Experimente näher untersucht werden.

Mitochondrien wurden mit dem Ionophor Valinomycin und KCl behandelt. Valinomycin erhöht selektiv die Permeabilität der Innenmembran für Kaliumionen, indem es sie durch die Lipiddoppelschicht transportiert. Durch den Ausgleich der Ladungsträger auf beiden Seiten der Membran wird das Membranpotential, $\Delta\psi$, zerstört. Dann wurde ^{35}S -markierter AAC zugegeben, der auf Stufe III akkumulierte. Die Ansätze wurden geteilt. Ein Aliquot wurde unbehandelt gelassen, das andere mit Proteinase K verdaut (+PK, Abb. 15). Danach wurden die Mitochondrien in Importpuffer mit NaCl reisoliert. Dies hat zur Folge, daß K^+ von innen nach aussen fließt und somit kurzfristig ein Diffusionspotential erzeugt („Chase“). Das akkumulierte Translokationsintermediat kann nun in die Innenmembran inseriert werden. Die Membraninsertion des AAC wurde durch Carbonatextraktion untersucht. Das Vorstufenprotein wurde nur dann in die Innenmembran inseriert, wenn der C-Terminus nicht durch die Proteinase K-Behandlung abverdaut war (s. Kap. 3.2.3).

Dieses Experiment zeigt, daß nur der vollständige Modul 3 des AAC die membranpotentialabhängige Insertion des Vorstufenproteins in die Innenmembran vermitteln kann.

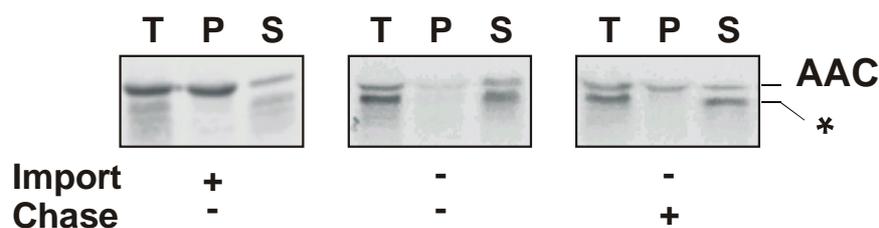


Abb. 15: Das Signal für die membranpotentialabhängige Insertion des AAC liegt am C-terminalen Bereich. Die radioaktiv markierte Vorstufe des AAC wurde mit bzw. ohne Membranpotential für 20 min bei 25°C als Translokationsintermediat (Stufe III) akkumuliert. Die Importansätze wurden halbiert und auf Eis mit 200 µg/ml Proteinase K behandelt, um nichtimportierte Vorstufenproteine zu entfernen und proteasesensitive Abschnitte zu verdauen. Nach Zugabe von 1 mM PMSF wurden die Mitochondrien sedimentiert, mit HS-Puffer (1 mM PMSF) gewaschen und in Importpuffer mit 80 mM KCl oder 80mM NaCl (Chase) resuspendiert. Die Ansätze wurden für 20 min bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Proben halbiert und zur Carbonatextraktion eingesetzt. Ein Aliquot wurde mit TCA gefällt (T). Das andere Aliquot wurde ultrazentrifugiert (45000 UpM, 30 min, Beckman TLA45-Rotor, 4°C). Das Sediment (P) enthielt die Membranfraktion, der Überstand (S) die lösliche Fraktion und periphere Membranproteine. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

3.2.6 Interaktion der AAC-Module mit Tim10, Tim12 und Tim22

Der Import des AAC in die mitochondriale Innenmembran erfolgt über die TIM22-Translokase. Dabei wird der lösliche TIM9·10-Komplex für die Translokation des AAC über die Außenmembran benötigt. Der TIM22-Komplex vermittelt die nachfolgende membranpotentialabhängige Insertion des AAC in die mitochondriale Innenmembran (Sirrenberg *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1999). Es sollte untersucht werden, ob Tim10, Tim12 und Tim22 für den Import von TM1-4 (Modul 1+2 und TM5-6 (Modul 3) benötigt werden.

Hefestämme, in denen das jeweilige TIM-Gen unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promoters stand (s. Kap. 3.1.3) wurden 15 h in galaktosefreiem Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet und Mitochondrien präpariert. Diese Mitochondrien enthielten drastisch reduzierte Mengen des jeweiligen Tim-Proteins (↓).

Ergebnisse

Die ^{35}S -markierten Vorstufenproteine von AAC, TM1-4, TM5-6 wurden in Anwesenheit eines Membranpotentials in Tim10 \downarrow -, Tim12 \downarrow und Tim22 \downarrow -Mitochondrien importiert. Die AAC-Vorstufe konnte an die Tim10 \downarrow -Mitochondrien binden (Abb 16, -PK), wurde jedoch durch Proteinase K abgebaut (Abb. 15, +PK). Die Assoziation fand also an der Oberfläche der Mitochondrien statt. In Tim12 \downarrow - und Tim22 \downarrow -Mitochondrien akkumulierte der AAC als Stufe III-Translokationsintermediat, bei der die Vorstufe nur teilweise über die Außenmembran transloziert und daher bei PK-Verdau charakteristische Fragmente (***) liefert. Ohne Tim12 und Tim22 kann der AAC also nicht in die Innenmembran inseriert werden. TM1-4 assoziierte wie der AAC mit der Oberfläche der Mitochondrien, wurde aber nicht über die Außenmembran transloziert. In Tim12 \downarrow - und Tim22 \downarrow -Mitochondrien wurde TM1-4 in den Intermembranraum importiert. TM5-6 assoziierte mit Tim10 \downarrow -, Tim12 \downarrow und Tim22 \downarrow -Mitochondrien, war jedoch von außen zugänglich für Proteinase K. Tim10, Tim12 und Tim22 werden also für den weiteren Import von TM5-6 in die Innenmembran benötigt.

Diese Importexperimente zeigen, daß Tim10 ausreicht, um die AAC-Vorstufe auf Stufe III zu akkumulieren und um TM1-4 in den Intermembranraum zu importieren. TM5-6 dagegen benötigt Tim10, Tim12 und Tim22, also einen funktionalen TIM22-Komplex, um membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert zu werden.

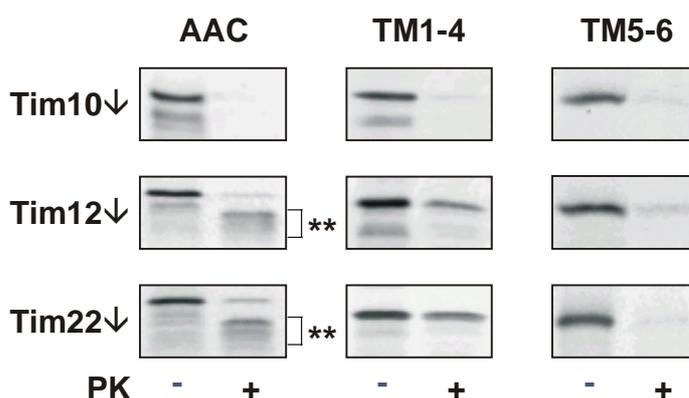


Abb. 16: Interaktion von AAC, TM1-4 und TM5-6 mit Tim10, Tim12 und Tim22

Die radioaktiv markierten Vorstufenproteine wurden für 5 min bei 25°C in Wildtyp-, Tim22 \downarrow -, Tim12 \downarrow - und Tim10 \downarrow -Mitochondrien importiert. Die Importansätze wurden bei 0°C halbiert. Je ein Aliquot wurde unbehandelt gelassen, das andere mit 30 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

3.2.7 Interaktion von Stufe III-Translokationsintermediaten der AAC-Module mit Tim10

Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen lassen sich mit Hilfe von chemischen Quervernetzern („Crosslinkern“) nachweisen, die eine kovalente Verknüpfung der Interaktionspartner erlauben. Es sollte die Wechselwirkung zwischen Tim10 und den Stufe III-Translokationsintermediaten der einzelnen Module, TM1-4 und AAC untersucht werden.

Die radioaktiv markierten Vorstufenproteine wurden in Wildtyp-Mitochondrien in Abwesenheit eines Membranpotentials auf Stufe III akkumuliert (Abb. 17, -MBS). Sie wurden durch den Crosslinker MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester; Pierce) quervernetzt (Abb. 17, +MBS). Nachfolgend wurden die Mitochondrien solubilisiert und die Quervernetzungsprodukte mit Antikörpern gegen Tim10 immungefällt (α Tim10). Addukte von verschiedenen radioaktiven Vorstufen mit Tim10 traten mit hoher Effizienz auf. Die Vorstufe des AAC lieferte ein Addukt von 42 kDa, was einer Vernetzung mit einem Tim10-Molekül entspricht. Mit deutlich geringerer Effizienz trat ein zweites Quervernetzungsprodukt von 52 kDa auf, das auf ein Addukt von AAC und zwei Molekülen Tim10 schließen lässt. TM1-2, TM3-4 sowie TM5-6 lieferten Addukte mit einer Größe von 22 kDa, was die Quervernetzung mit jeweils einem Tim10-Molekül anzeigt. Mit TM1-4 wurde ein Produkt von 34 kDa erhalten, was einer Verknüpfung mit einem Molekül Tim10 entspricht.

Diese Experimente zeigen, daß auf Stufe III des Importwegs des AAC jeder der drei Module in den Intermembranraum exponiert ist und dort mit einem Molekül Tim10 in Kontakt tritt. Jeder Modul des AAC besitzt also einen Bereich für die Wechselwirkung mit Tim10. Das Addukt von TM5-6 mit Tim10 zeigt, daß ein Teil des Vorstufenproteins in den Intermembranraum exponiert ist. Daraus kann geschlossen werden, daß TM5-6 in Abwesenheit eines Membranpotentials Stufe III des AAC-Importwegs erreicht.

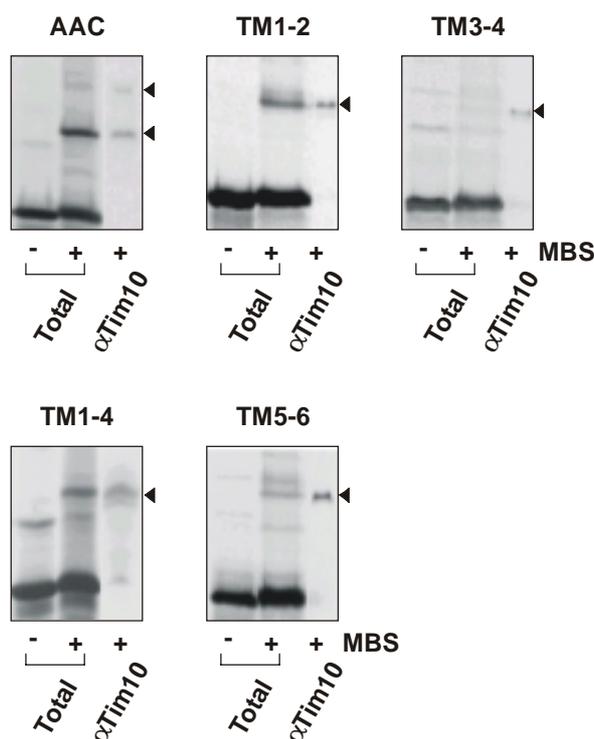


Abb. 17: Jeder Modul des AAC ist auf Stufe III in Kontakt mit Tim10.

Die ^{35}S -markierten Vorstufenproteine wurden für 20 min bei 25°C in Abwesenheit eines Membranpotentials in Wildtyp-Mitochondrien importiert (-MBS). Jeder Ansatz wurde dreigeteilt. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, in HS-Puffer resuspendiert und nachfolgend 30 min auf Eis ohne oder mit 1 mM MBS inkubiert (+MBS). Freie reaktive Gruppen des Quervernetzungsreagenz wurden mit 0,1 M Glycin, pH 8,0 für 15 min auf Eis gequenchet. Die Mitochondrien wurden sedimentiert und mit HS-Puffer gewaschen. Ein Aliquot wurde lysiert und zur Immunfällung mit Antikörpern gegen Tim10 eingesetzt (+MBS, αTim10). Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert. Die Quervernetzungsprodukte der Vorstufen zu Tim10 sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

3.2.8 Wechselwirkung des AAC mit dem löslichen Tim9·10-Komplex

Das Stufe III-Translokationsintermediat des AAC steht in Kontakt mit mindestens zwei Tim10-Molekülen. Diese können sowohl aus dem löslichen TIM9·10-Komplex (70kDa) als auch aus dem TIM22-Komplex von 300 kDa stammen (s. Kap. 3.1.3). Dies sollte mit Hilfe der Blauen Nativgelelektrophorese von Tim10-Addukten verschiedener AAC-Vorstufenproteine untersucht werden.

TM1-2, TM1-4 und AAC wurden in Abwesenheit von $\Delta\psi$ auf Stufe III akkumuliert. TM1-2 wurde zusätzlich in Tim9 \downarrow -, Tim10 \downarrow - und Tim12 \downarrow -Mitochondrien ohne $\Delta\psi$ importiert. Anschließend wurden sie MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccimidester; Pierce) kovalent mit Tim10 verbunden. Die Vernetzung erfolgt mit hoher Effizienz (s. Kap. 3.2.5). Die Mitochondrien wurden solubilisiert und durch Blaue Nativgelelektrophorese untersucht.

TM1-2 lag als niedermolekulare Spezies vor (Abb. 18). Durch die Vernetzung mit Tim10 wurde ein Addukt mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 75 kDa erhalten. In Tim9 \downarrow - und Tim10 \downarrow -Mitochondrien trat dieses Addukt nur in drastisch reduzierter Menge auf. In Tim12 \downarrow -Mitochondrien, die normale Mengen an Tim9 und Tim10 enthalten, entstand es mit ähnlicher Effizienz wie in Wildtyp-Mitochondrien (Abb. 18). Die Größe des Addukts zeigt, daß TM1-2 mit einem Tim10-Molekül quervernetzt wurde, das aus dem TIM9·10-Komplexes stammte. Das apparente Molekulargewicht des TIM9·10-Komplex wurde auch durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim10 nach Transfer des Gels auf Nitrozellulose bestätigt (nicht gezeigt). Das native, Tim10-spezifische Addukt von TM1-4 hatte eine Größe von etwa 95 kDa. Durch Quervernetzung des AAC-Translokationsintermediats mit Tim10 wurde ein Addukt mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 85 kDa erhalten (Abb. 18).

Diese Ergebnisse zeigen, daß ein AAC-Molekül auf Stufe III mit einem löslichen TIM9·10-Komplex in Wechselwirkung steht. Die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der Addukte von TM1-2, TM1-4 bzw. des AAC entspricht der zunehmenden Länge des Vorstufenproteins. Dies läßt darauf schließen, daß die Wechselwirkung mit Modulen des AAC-Translokationsintermediats nicht zu einer Dissoziation des TIM9·10-Komplexes führt. Addukte mit höheren Molekulargewichten wurden nicht gefunden, was darauf hinweist, daß je ein AAC-Vorstufenprotein nur mit jeweils einem TIM9·10-Komplex in Wechselwirkung steht.

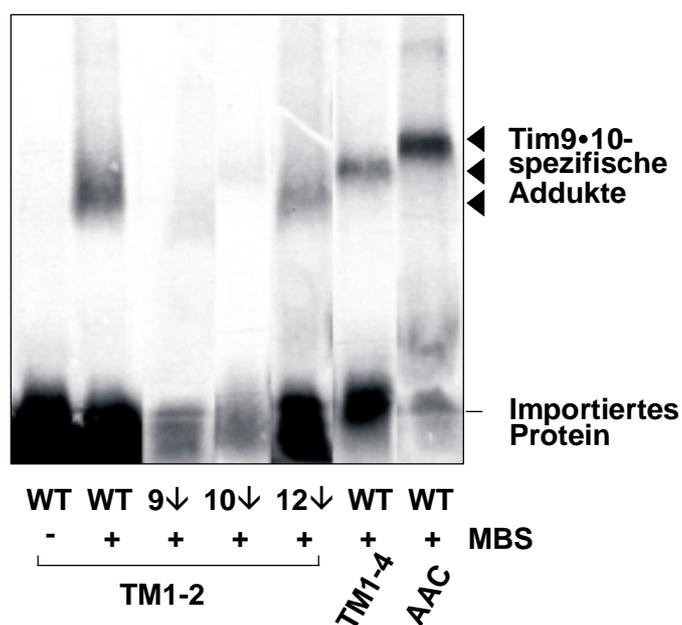


Abb. 18: Wechselwirkung der Vorstufenproteine von TM1-2, TM1-4 und AAC mit dem TIM9-10-Komplex (apparentes Molekulargewicht 70 kDa)

Die radioaktiv markierten Vorstufenproteine wurden ohne Membranpotential für 10 min bei 25°C in Wildtyp-Mitochondrien importiert. TM1-2 wurde zusätzlich in Tim9↓-, Tim10↓- und Tim12↓-Mitochondrien in Abwesenheit eines Membranpotentials importiert. Nicht importierte Proteine wurden durch Inkubation mit 50 µg/ml Trypsin für 20 min auf Eis verdaut. Die Protease wurde mit 1 mg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI) inaktiviert, die Mitochondrien reisoliert und in HS-Puffer (0,1 mg/ml STI) mit 1 mM MBS 20 min auf Eis inkubiert. Restliche reaktive Gruppen wurden 30 min mit 100 mM Glycin, pH 8,0 auf Eis gequenchet. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, mit HS-Puffer (0,1 mg/ml STI, 1 mM PMSF) gewaschen und in Digitonin-Puffer (1% Digitonin, 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 50 mM Kaliumacetat, pH 7,4, 1 mM PMSF) lysiert. Die Proben wurden zentrifugiert (30 min, 45000 UpM, Beckman-TLA45-Rotor, 4°C) und der Überstand durch Blaue Nativgelelektrophorese, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der Quervernetzungsprodukte wurden folgende Markerproteine auf das Blaue Nativgel aufgetragen: Rinderthyroglobulin (669 kDa), Apoferritin aus *S. cerevisiae* (443 kDa), und Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* (150 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa). Die Quervernetzungsprodukte der Vorstufen zum Tim9·Tim10-Komplex sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

3.2.9 Interaktion von Stufe III- Intermediaten mit Tim12

Die Wechselwirkung des Translokationsintermediats mit Tim12 auf der Außenseite der Innenmembran sollte durch chemische Quervernetzung und anschließende Immunfällung der Addukte mit Antikörpern gegen Tim12 untersucht werden.

Hierzu wurden die ^{35}S -markierten Vorstufenproteine TM1-4 und AAC ohne Membranpotential in Anwesenheit von 1 mM BMH (1,6-Bismaleimidohexan; Pierce) importiert. Es wurden mehrere Quervernetzungsprodukte von TM1-4 und AAC erhalten. Um diese Addukte (nicht gezeigt) näher zu charakterisieren, wurden die Mitochondrien mit Detergenz solubilisiert und eine Immunfällung durchgeführt. Mit Antikörpern gegen Tim12 wurde ein AAC-Addukt von 44 kDa erhalten, was einer Vernetzung mit einem Molekül Tim12 entspricht (Abb. 19, +BMH). Dies zeigt, daß das AAC-Translokationsintermediat Tim12 an der Außenseite der Innenmembran erreicht. Die Vorstufe von TM1-4 lieferte ein Immunpräzipitat von 36 kDa (Abb. 19, +BMH). Mit TM5-6 konnte kein Quervernetzungsprodukt zu Tim12 erhalten werden (nicht gezeigt).

Dieses Experiment zeigt, daß die Stufe III-Translokationsintermediate von AAC und TM1-4 mit Tim12 auf der Außenseite der Innenmembran in Wechselwirkung treten. Eine Interaktion von Tim12 mit TM5-6 wurde nicht gefunden.

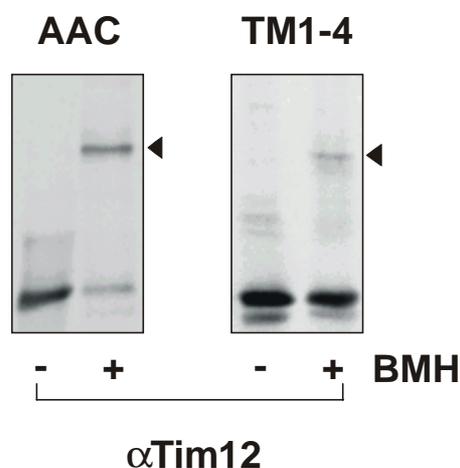


Abb. 19: Das Stufe III-Translokationsintermediat von AAC und TM1-4 ist in Kontakt mit Tim12.

Ergebnisse

Die ^{35}S -markierten Vorstufenproteine (5% Retikulozytenlysat) wurden für 20 min bei 25°C ohne Membranpotential in Wildtyp-Mitochondrien in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 mM BMH importiert. Freie reaktive Gruppen des Quervernetzungsreagenz wurden danach 15 min auf Eis mit 10 mM β -Mercaptoethanol gequenchet. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, mit HS-Puffer gewaschen, in Lysis-Puffer (0,5% Triton-X100 in TBS, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) resuspendiert und 15 min auf Eis lysiert. Nicht solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation (30 min, 45000 UpM, Beckman-TLA45-Rotor, 4°C) abgetrennt und der Überstand zur Immunfällung mit Antikörpern gegen Tim12, die zuvor an Protein A-Sepharose gekoppelt worden waren, eingesetzt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert. Die Quervernetzungsprodukte der Vorstufen zu Tim12 sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

3.2.10 Das Stufe III-Intermediat des AAC akkumuliert an Kontaktstellen

Die [^{35}S]-markierten Vorstufen von AAC, TM1-4 sowie TM5-6 wurden auf Stufe III akkumuliert und durch den Crosslinker MBS mit Tim10 bzw. durch BMH mit Tim12 vernetzt (s. Kap. 3.2.6 bzw. 3.2.8). Nachfolgend wurden die Mitochondrien mit Proteinase K behandelt und analysiert. Das Quervernetzungsprodukt von AAC mit Tim10 (Abb. 20A -PK) wurde durch Proteinase K verdaut, sodaß kleinere Fragmente entstanden (Abb. 20A, +PK). Dies zeigt, daß das AAC-Translokationsintermediat die Außenmembran durchspannt und von außen zugänglich ist, während es in Kontakt mit Tim10 im Intermembranraum steht. Im Gegensatz dazu war das Addukt von TM1-4 und Tim10 nicht zugänglich für Proteinase K. Dies bestätigt, daß es vollständig über die Außenmembran transloziert war. Das Addukt von TM5-6 und Tim10 wurde durch PK vollständig abverdaut, durchspannte also die Außenmembran. Zur Analyse von Tim12 spezifischen Addukten wurden die Mitochondrien mit Detergenz solubilisiert und Immunfällungen mit Antikörpern gegen Tim12 durchgeführt. Diese lieferte ein AAC-Tim12-Addukt von 44 kDa (Abb. 20B, -PK). Durch Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K wurde ein kleineres Fragment erhalten (Abb. 20B, +PK).

Dies zeigt, daß das Stufe III-Intermediat des AAC Tim12 auf der Außenseite der Innenmembran erreicht, während es den TOM-Komplex der Außenmembran durchspannt und daher von außen proteasezugänglich ist. In Abwesenheit eines Membranpotentials akkumuliert die AAC-Vorstufe also an Kontaktstellen zwischen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran. TM1-4 ist zwar in Kontakt mit Tim10 und Tim12, durchspannt jedoch die Außenmembran nicht. TM5-6 steht ebenfalls in Wechselwirkung mit Tim10 und ist von außen proteasezugänglich, also membrandurchspannend. Dies bestätigt, daß Modul 3 für die

Interaktion mit dem TOM-Komplex benötigt wird.

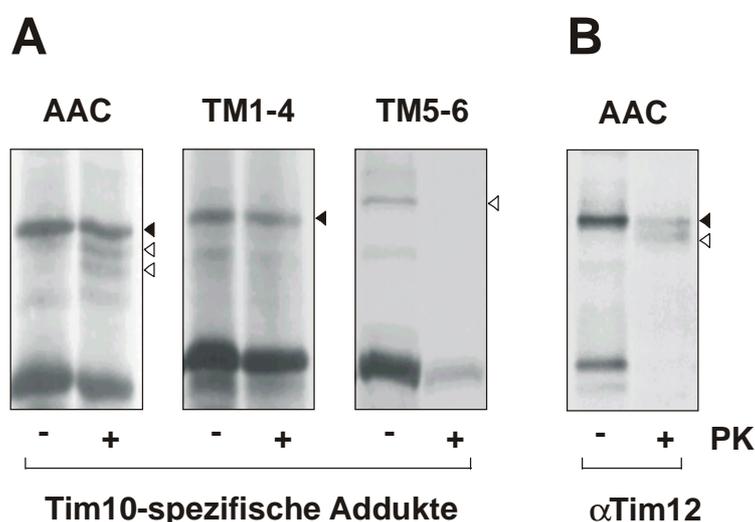


Abb. 20: Akkumulation des Stufe III-Intermediats von AAC und TM5-6 an Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran.

Die radioaktiv markierten Vorstufen von AAC, TM1-4 und TM5-6 wurden ohne Membranpotential auf Stufe III akkumuliert und durch MBS mit Tim10 bzw. durch BMH mit Tim12 vernetzt (s. 3.2.6 bzw. 3.2.8). Der Ansatz wurde zweigeteilt. Ein Aliquot wurde nachfolgend mit 50 μ g/ml Proteinase K (PK) behandelt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

3.2.11 Topologie des AAC auf Stufe III

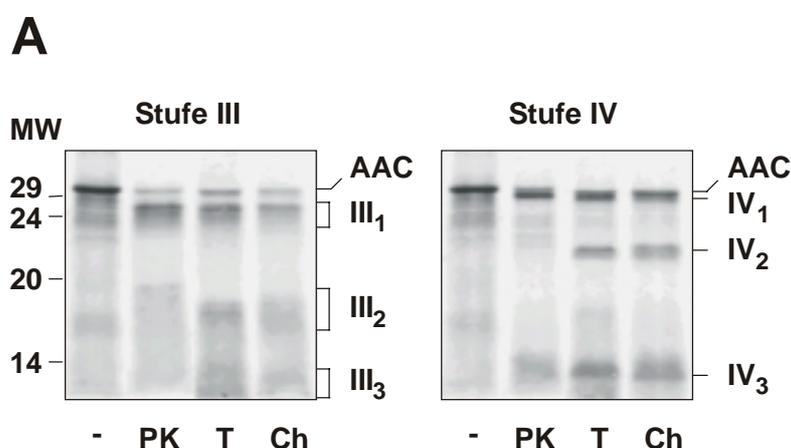
Das Stufe III-Translokationsintermediat des AAC wurde durch seine partielle Resistenz gegen 30 μ g/ml Proteinase K (PK) in HS-Puffer und gegen 200 μ g/ml PK in Importpuffer definiert (Pfanner und Neupert, 1987; Kübrich *et al.*, 1998). Durch die PK-Behandlung wurden Fragmente erhalten, die 4-6 kDa kleiner als die AAC-Vorstufe waren.

Um die Konformation des AAC auf Stufe III zu untersuchen, wurde die radioaktive Vorstufe in Wildtyp-Mitochondrien ohne Membranpotential akkumuliert. Nachfolgend wurde die Reaktionsansätze mit Proteinasen unterschiedlicher Substratspezifität behandelt. Proteinase K

Ergebnisse

schneidet bevorzugt nach unpolaren, Trypsin nach basischen Aminosäureresten; Chymotrypsin dagegen schneidet nach aromatischen Seitenketten. Trotz der unterschiedlichen Substratspezifität lieferten die drei Proteasen ein ähnliches Fragmentmuster (Abb. 21A, Stufe III). Es wurden jeweils Fragmente im Größenbereich um 27 kDa (III₁), 18 kDa (III₂) und 9 kDa (III₃) erhalten. Dies zeigt, daß definierte Bereiche des Stufe III-Intermediats an der Oberfläche der Mitochondrien exponiert waren. Die erhaltenen Fragmente III₁ und III₂ entsprechen einer proteolytischen Spaltung in den Loop-Regionen L3 und L5. Die Fragmente (III₃) im 9 kDa-Bereich können aus der Spaltung des AAC in L1, L3 und L5 stammen. Abbildung 18B zeigt die Bereiche des Stufe III-Intermediats, in denen proteolytische Spaltung stattfand (schwarze Pfeile). Zum wurde der in Anwesenheit Membranpotentials importiert. Anschließend wurden Mitoplasten erzeugt und ebenfalls mit PK, Trypsin und Chymotrypsin verdaut. Das Fragmentmuster des inserierten AAC (Abb. 21A, Stufe IV) unterscheidet sich deutlich von dem des Stufe III-Intermediats. Jede der drei Proteasen lieferte Fragmente von etwa 30 kDa (IV₁), 22 kDa (IV₂) und 12 kDa (IV₃). Dieses Muster läßt sich aus der Topologie des in die Innenmembran inserierten Carriers erklären. Der AAC wurde an Stellen gespalten, die in den Intermembranraum exponiert und damit proteasezugänglich sind. Diese liegen am N-Terminus des Proteins, in den Loops L2 und L4 sowie am C-Terminus (Abb. 21B).

Diese Experimente zeigen, daß der AAC bereits auf Stufe III eine definierte Konformation besitzt. Das Translokationsintermediat durchspannt die Außenmembran. Dabei sind bestimmte Bereiche des Proteins an der Oberfläche der Mitochondrien zugänglich für Proteasen. Dies sind die Loopregionen L1, L3 und L5.



B

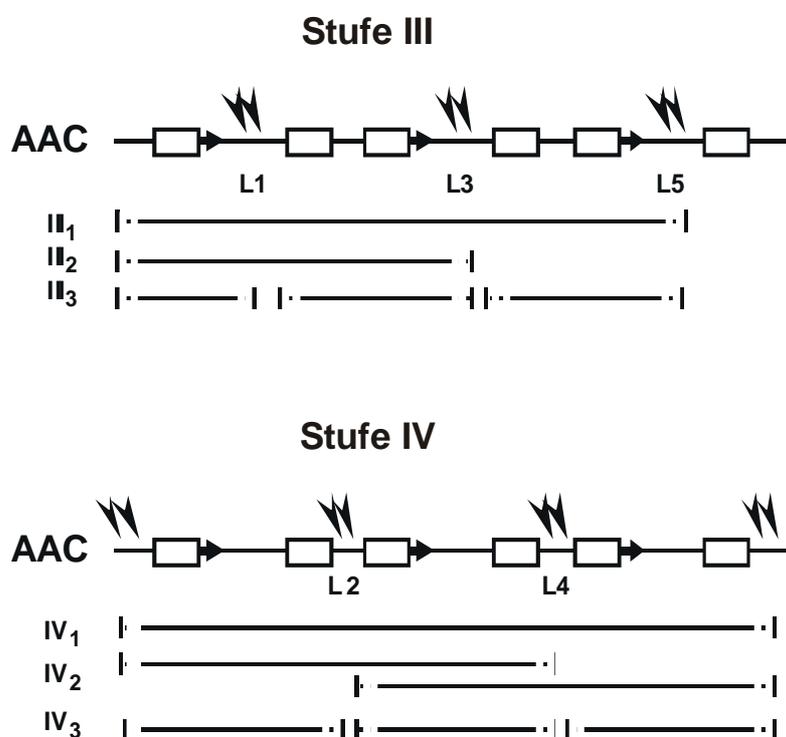


Abb. 21: Topologie des Stufe III-Translokationsintermediats und des inserierten AAC (Stufe IV).

(A) Proteolytische Fragmente des Stufe III-Intermediats des AAC. Das [^{35}S]-markierte Vorstufenprotein des AAC wurde in Ab- bzw. Anwesenheit eines Membranpotentials (Stufe III bzw. Stufe IV) für 15 min bei 25°C in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Der Ansatz wurde in vier Aliquots aufgeteilt. Stufe III: Die Mitochondrien wurden sedimentiert, in Importpuffer (PK) bzw. HS-Puffer (Trypsin und Chymotrypsin) resuspendiert und anschließend 20 min auf Eis ohne Protease (-), mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK), 100 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin (T) oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Chymotrypsin (Ch) inkubiert. Stufe IV: Nach der Importreaktion wurden Mitoplasten erzeugt wie oben beschrieben behandelt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

(B) Schematische Darstellung des AAC auf Stufe III bzw. Stufe IV und seiner zugänglichen Trypsin-Schnittstellen (schwarze Pfeile). Es sind jeweils die möglichen proteolytischen Fragmente gezeigt. Die unmittelbare Nachbarschaft einiger Schnittstellen ergibt mehrere Fragmente ähnlicher Größe (gestrichelte Linien).

3.2.12 Die proteolytischen Fragmente des AAC auf Stufe III resultieren aus der Spaltung eines Translokationsintermediats an alternativen Schnittstellen

Das Stufe III-Translokationsintermediat des AAC lieferte nach Proteasebehandlung ein definiertes Fragmentmuster. Die Fragmente könnten durch Proteolyse eines Intermediats an verschiedenen Schnittstellen, jedoch auch aus der proteolytische Spaltung von verschiedenen, sequentiellen Translokationsintermediaten resultieren.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Kinetik untersucht, mit der Stufe III-Intermediate gebildet wurden. Die ³⁵S-markierten Vorstufen von AAC und TM1-L5, eine C-terminale Deletionsmutante, der die letzte Transmembrandomäne fehlt, wurden in Abwesenheit eines Membranpotentials für unterschiedliche Zeiten importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Proteinase K, Trypsin und Chymotrypsin behandelt. Beide Vorstufen lieferten das gleiche Fragmentmuster (Abb. 22). Die Menge der proteolytischen Fragmente nahm mit steigender Importdauer zu, Mengenverhältnis III₁ : III₂ : III₃ blieb dagegen gleich. Daraus kann geschlossen werden, daß die erhaltenen Fragmente durch Proteolyse einer Intermediat-Spezies an verschiedenen Schnittstellen entstanden waren, nicht aber durch Verdau verschiedener, sequentieller Intermediate. Der Vergleich der Fragmente von AAC und TM1-L5 zeigt, daß die Stufe III-Intermediate an denselben Stellen gespalten wurden. Es wurden Fragmente mit einem Molekulargewicht von 27 kDa (III₁), 18 kDa (III₂) und 9 kDa (III₃) erhalten. Da sich die beiden Vorstufen am C-Terminus unterscheiden, handelt es sich bei III₁, III₂ und III₃ wahrscheinlich um N-terminale Fragmente (s. Abb. 22B). In Tim10↓-Mitochondrien wurde unter gleichen Bedingungen keine Fragmente erhalten, was bestätigt, daß die hier erhaltenen Fragmente spezifisch für das Stufe III-Intermediat des AAC sind (nicht gezeigt).

Beim Import von AAC auf Stufe III liegt also nur ein Translokationsintermediat vor.

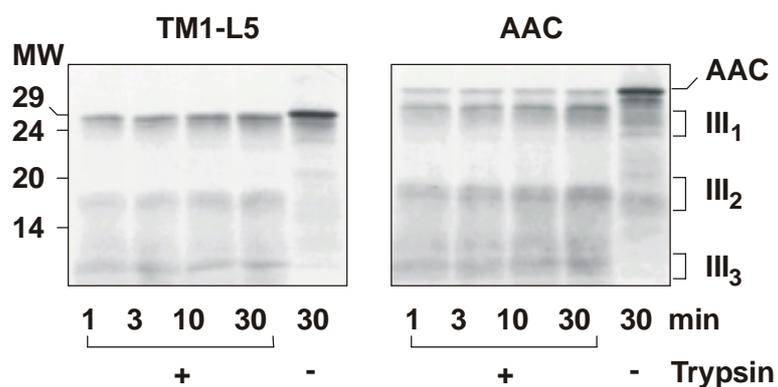


Abb. 22: Die proteolytischen Fragmente des AAC auf Stufe III resultieren aus der Spaltung eines einzigen Translokationsintermediats an verschiedenen Schnittstellen.

(A) Die radioaktiven Vorstufen von TM1-L5 und AAC wurden für die angegebenen Zeiten bei 25°C in Wildtyp-Mitochondrien ohne Membranpotential auf Stufe III akkumuliert. Anschließend wurden die Proben mit oder ohne 100 µg/ml Trypsin auf Eis verdaut (+ bzw. -). Der Verdau wurde mit 1 mg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI) 5 min auf Eis gestoppt. Die Mitochondrien wurden mit HS-Puffer (0,1 mg/ml STI, 1 mM PMSF) gewaschen und durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Autoradiographie analysiert.

4 Diskussion

4.1 Tim9, Tim10 und Tim12 sind Komponenten des TIM22-Komplexes

4.1.1 Tim9, Tim10 und Tim12 sind mit Tim22 in einem Komplex assoziiert

Die Gene TIM10/MRS11 und TIM12/MRS5 wurden in einem genetischen Screening als Suppressoren zweier Hefemutanten mit mitochondrialem Splicing-Defekt identifiziert (Waldherr *et al.*, 1993). Die Überexpression der beiden Tim-Proteine, die 35% Sequenzähnlichkeit besitzen, unterdrückte den mitochondrialen RNA-Splicing-Defekt von Gruppe II-Introns, der zum Verlust der Atmungsfähigkeit der Hefe führt. TIM10 und TIM12 sind, im Gegensatz zu anderen MRS-Genen, essentiell für das Zellwachstum von *S. cerevisiae*. Da das mitochondriale Splicing nicht essentiell ist, weist dies auf eine andere oder weitere Funktion der beiden Proteine hin. Zudem ist es aufgrund ihrer Lokalisierung im Intermembranraum nicht wahrscheinlich, daß sie direkt am RNA-Splicing beteiligt sind. In Mitochondrien mit verminderter Expression von Tim10 und Tim12 wurde eine signifikant reduzierte Menge an Cytochromen, Akkumulation von Hsp60 im Cytosol und eine veränderte Morphologie der Mitochondrien beobachtet. Daher wurde angenommen, daß Tim10 und Tim12 an der Biogenese von Mitochondrien beteiligt sind (Jarosch *et al.*, 1996 und 1997).

Tim9 wurde aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu Tim10 und Tim12 untersucht. Mit Antikörpern gegen Tim10 wurde neben Tim10 und Tim12 ein drittes Protein kopräzipitiert, das durch als Tim9 identifiziert wurde (Adam *et al.*, 1999). Dies gab den entscheidenden Hinweis darauf, daß Tim9 mit Tim10 interagiert und somit eine Komponente des TIM22-Komplexes sein könnte. Tim9 ist ebenfalls essentiell für das Wachstum von *S. cerevisiae* (Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1998b).

Tim9 ist ebenso wie Tim10 und Tim12 für die Aufrechterhaltung normaler Mengen an Tim22 notwendig. Gelfiltrationsanalysen und Untersuchungen zur Membranassoziation wiesen

Diskussion

darauf hin, daß der größte Teil von Tim9 und Tim10 in löslicher Form im Intermembranraum als TIM9-10-Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa assoziiert sind. Ein Teil von Tim9 und Tim10 ist mit Tim12 in einem 70 kDa-Komplex organisiert, dem TIM9-10-12-Komplex. Dieser TIM9-10-12-Komplex ist mit Tim22 in der Innenmembran assoziiert.

Weitere Komponenten des TIM22-Komplexes sind die integralen Membranproteine Tim18 und Tim54. Eine direkte Rolle der beiden Proteine beim Import wurde nicht beobachtet (Kerscher *et al.*, 1997 und 2000; Koehler *et al.*, 2000). Sie könnten lediglich strukturelle Komponenten des TIM22-Komplexes darstellen.

4.1.2 Tim9, Tim10 und Tim12 werden für den Import von Proteinen mit internem Sortierungssignal benötigt

Der Import von verschiedenen Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien mit stark reduziertem Gehalt an Tim9, Tim10 bzw. zeigte, daß diese Proteine am gleichen Importweg beteiligt sind wie Tim22. Sie werden für den Import von Vorstufenproteinen mit internem Erkennungssignal benötigt, die durch den TIM22-Komplex in die Innenmembran inseriert werden. Dazu gehören Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie wie z.B. der AAC sowie Tim23 und Tim22 selbst. Am Import von Vorstufenproteinen mit N-terminaler Präsequenz, die über die TIM23-Translokase in die Matrix importiert werden, sind Tim9, Tim10 und Tim12 dagegen nicht beteiligt.

4.1.3 Sequentielle Interaktion von Tim9, Tim10 und Tim12 beim Import des AAC in die Innenmembran

Der Import des AAC in die Innenmembran wurde durch Pfanner und Neupert (1987) in fünf Stufen unterteilt: Die kernkodierte AAC-Vorstufe wird im Cytosol synthetisiert und wird durch cytosolische Hilfsproteine in einer importkompetenten Konformation gehalten (Stufe I). Auf Stufe II bindet das Vorstufenprotein auf der Oberfläche der Mitochondrien an Rezeptoren des TOM-Komplex. In Anwesenheit von cytosolischem ATP wird es teilweise

über die Außenmembran transloziert (Stufe III). Dabei ist der AAC in den Intermembranraum exponiert, in Kontakt mit Tim22, gleichzeitig aber noch in stabiler Wechselwirkung mit dem TOM-Komplex (Söllner *et al.*, 1992). Nur in Gegenwart eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, wird der AAC vom TIM22-Komplex in die mitochondriale Innenmembran inseriert (Stufe IV) und assembliert dort zum funktionellen Dimer (Stufe V). Tim10 wird für die Translokation über die Außenmembran, also für das Erreichen von Stufe III benötigt, Tim12 und Tim22 dagegen für die membranpotentialabhängige Insertion der Vorstufenproteine in die Innenmembran, Stufe IV.

Es wurde gezeigt, daß Tim9 für den Import des ADP/ATP-Carriers auf Stufe III benötigt wird. In Mitochondrien, die drastisch verminderte Mengen Tim9 erhalten, konnte der AAC zwar an Mitochondrien binden, wurde aber durch Proteinase K-Behandlung der Mitochondrien vollständig abgebaut. Der AAC hatte also Stufe II erreicht, konnte jedoch ohne Tim9 nicht über die Außenmembran transloziert werden. Daher kann angenommen werden, daß Tim9 wie auch Tim10 für die Stufe III des AAC-Importwegs benötigt wird.

Die Ergebnisse dieses und der vorangegangenen Kapitel gehen in das Modell des sequentiellen Imports der AAC-Vorstufe in die Innenmembran ein und werden zusammen mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeit in Kapitel 4.3 diskutiert.

4.1.4 Das Zinkfinger-Motiv von Tim10 und Tim12 könnte eine Rolle beim Proteinimport von Proteinen mit internem Sortierungssignal spielen

Auffallend in der Sequenz von Tim9, Tim10 und Tim12 sind vier konservierte Cysteinreste, die ein zinkbindendes Cys₄-Motiv ausbilden könnten (Zinkfinger-Motiv). Durch ein Zinkfinger-Motiv kann eine Domäne stabilisiert werden, die ansonsten zu klein wäre, um eine stabile Faltungseinheit auszubilden (Klug und Schwabe, 1995; Berg und Shi, 1996). Der Zinkfinger stellt das intrazelluläre Äquivalent einer Disulfidbrücke dar. Diese wäre im reduzierenden Milieu der Zelle nicht stabil. Daher ist die Stabilisierung von kleinen Domänen durch die Koordination von Cystein- oder Histidinseitenketten um Zink-Ionen ideal geeignet.

Diskussion

Tim10 und Tim12 sind in der Lage, äquimolare Mengen an Zink-Ionen reversibel zu binden. Die Zinkbindung wird durch Cysteinseitenketten vermittelt. Tim 10 und Tim12 können daher als Zinkfinger-Proteine bezeichnet werden.

Zinkfinger-Domänen können DNA binden oder Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen (Berg und Shi, 1996; Mackay und Crossley, 1998). Dies könnte auch für Tim10 und Tim12 zutreffen. Nachdem die Interaktion von Tim10 und Tim12 mit der AAC-Vorstufe von der Gegenwart zweiwertiger Ionen abhängt, nicht aber die Bindung von Tim10 und Tim12 an den TIM22-Komplex (Sirrenberg *et al.*, 1998), können Tim10 und Tim12 als metallabhängige Rezeptoren bezeichnet werden, die im Intermembranraum mit den hydrophoben Vorstufenproteinen in Wechselwirkung treten.

Die Zinkfinger-Domänen von Tim10 und Tim12, nicht aber Tim9, besitzen ein Sequenzmotiv, das komplementär zur sog. „Carrier-Signatur“ der mitochondrialen Carrier-Familie ist. Die Carrier-Signatur ist in allen Mitgliedern der Familie in jedem der drei repetitiven Module enthalten (s. Kap. 1.2.1 und 1.3.2). Zusätzlich zu diesem Sequenzmotiv könnten weitere, interne Signale existieren, die beispielsweise für die Bindung der Vorstufenproteine an die Rezeptoren des TOM-Komplexes sowie für die Insertion in die Innenmembran verantwortlich sind.

Die Interaktion des Ladungsmotivs von Tim10 und Tim12 mit der Carrier-Signatur würde die Abhängigkeit des AAC-Imports von Zink-Ionen erklären: Metall-Ionen stabilisierten die korrekte Faltung der Zinkfinger-Domäne und erlauben somit die Wechselwirkung zwischen Ladungsmotiv und Carrier-Signatur des AAC (Abb. 23). Tim9 besitzt dieses Ladungsmotiv nicht. Daher wird vermutet, daß es eher eine strukturelle Komponente des TIM22-Komplexes und nicht direkt am Import beteiligt ist. Tim9 könnte auch an ein anderes, bisher nicht bekanntes Motiv binden, mit Komponenten des TOM-Komplex interagieren oder für den Transfer des Vorstufenproteins vom TIM9-10-Komplex auf den TIM9-10-12-Komplex benötigt werden. Nachdem Tim9 für die Aufrechterhaltung normaler Mengen an Tim10 und Tim12 benötigt wird, könnte es am Import dieser Proteine in den Intermembranraum beteiligt sein.

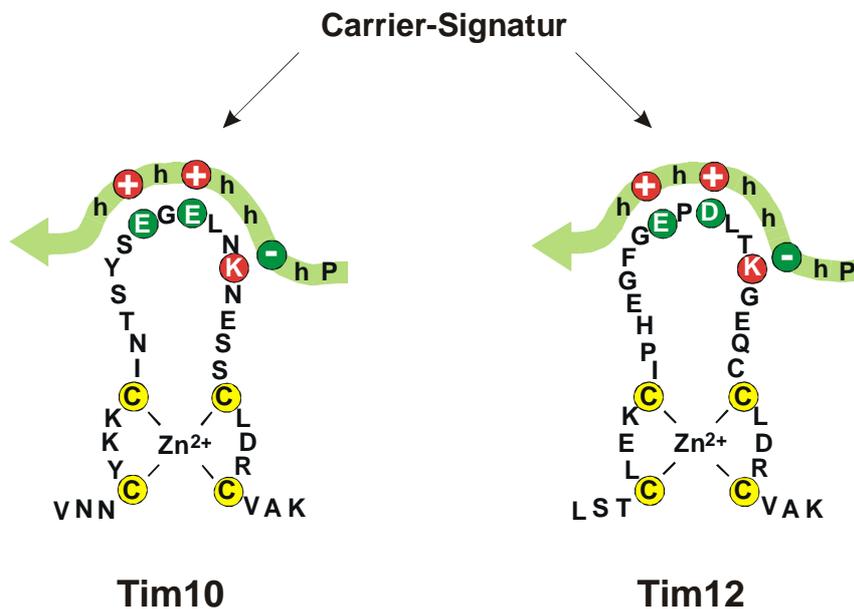


Abb. 23: Modell zur Wechselwirkung der Zinkfinger-Domänen von Tim10 und Tim12 mit der Carrier-Signatur

Schematische Darstellung der Wechselwirkung der Zinkfinger-Domänen von Tim9, Tim10 und Tim12 mit der Carrier-Signatur. h: hydrophobe Seitenketten; + / -: Seitenkette mit positiver bzw. negativer Ladung.

4.2 Transport des ADP/ATP-Carriers vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex

4.2.1 Jedes Modul des AAC besitzt ein unabhängiges Importsignal

Der ADP/ATP-Carrier (AAC) ist Mitglied der mitochondrialen Carrier-Familie (MCF). Diese umfasst in *S. cerevisiae* etwa 35 Transporterproteine. Die Carrier sind in der Innenmembran lokalisiert und besitzen interne Importsignale, die bisher nicht näher charakterisiert wurden (Palmieri, 1994; Nelson *et al.*, 1998). Alle Mitglieder der MCF bestehen aus sechs Transmembrandomänen und können in drei repetitive Module unterteilt werden. Jeder Modul besteht aus zwei Transmembrandomänen, die durch einen langen, hydrophilen Loop verbunden sind. Dieser Loop enthält die sog. „Carrier-Signatur“ und ist in die mitochondriale Matrix exponiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorgeschlagen, daß die Carrier-Signatur mit einem dazu komplementären Ladungsmotiv in Tim10 und Tim12 interagieren könnte.

Es war bekannt, daß der AAC mehr als ein Importsignal besitzt (Adrian *et al.*, 1986; Pfanner *et al.*, 1987a; Smagula und Douglas, 1988 a und b). Aufgrund der modularen Struktur des AAC sollte untersucht werden, ob jeder Modul ein unabhängiges Importsignal besitzt.

Modul 1 (TM1-2) und Modul 2 (TM3-4) werden unabhängig von der Anwesenheit eines Membranpotentials, $\Delta\psi$, über die Außenmembran in den Intermembranraum importiert, jedoch nicht in die Innenmembran inseriert. Im Gegensatz dazu wird Modul 3 (TM5-6) membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert. In Abwesenheit von $\Delta\psi$ assoziiert Modul 3 mit den Mitochondrien, wird jedoch von außen durch Proteinase K-Behandlung abgebaut. Es verhält sich damit ähnlich wie die AAC-Vorstufe, die im TOM-Komplex akkumuliert. Modul 3 beinhaltet also ein Signal für die membranpotentialabhängige Insertion in die Innenmembran. Dieser Schritt ist gekoppelt mit der vollständigen Translokation der Vorstufe über die Außenmembran.

4.2.2 Die Interaktion des Stufe III-Intermediats des AAC mit dem TOM-Komplex wird durch Modul 3 vermittelt

Modul 3 wird wie der ganze AAC membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert. In Abwesenheit eines Membranpotentials ist das Translokationsintermediat von außen proteasezugänglich, akkumuliert also im TOM-Komplex (Stufe III). Es sollte untersucht werden, wo die Bindungsstelle für die Interaktion mit dem TOM-Komplex liegt. C-terminale Deletionsmutanten gaben darüber Aufschluß: TM1-L5, der die letzte Transmembrandomäne des AAC fehlt, akkumuliert unabhängig von einem Membranpotential im TOM-Komplex. Nach Proteinase K-Behandlung liefert es proteolytischen Fragmente, die charakteristisch für Stufe III-Intermediate des AAC sind. Im Gegensatz dazu wird TM1-4, der die letzten beiden Transmembrandomänen fehlen, vollständig in den Intermembranraum importiert und ist nicht proteasezugänglich. Die Bindungsstelle für den TOM-Komplex liegt also zwischen Transmembrandomäne 5 (TM5) und dem Loop 5 (L5) des AAC-Vorstufenproteins, also im Bereich der Aminosäuren 210-277.

4.2.3 Modul 3 vermittelt die Insertion des AAC in die Innenmembran

Für die Eingrenzung des membranpotentialabhängigen Insertionssignals in Modul 3 wurden der AAC und die C-terminale Deletionsmutanten TM1-L5 und TM1-4 in Mitochondrien importiert und mit alkalischem Carbonat behandelt. Im Gegensatz zum AAC werden die beiden Deletionsmutanten nicht in die Innenmembran inseriert, sondern mit der löslichen Fraktion und den peripheren Membranproteinen extrahiert. Für die Insertion des AAC wird also das ganze Modul 3 benötigt, der Bereich zwischen Transmembrandomäne 5 und Loop 5 reicht nicht aus. Der dritte Modul des AAC vermittelt also nicht nur seine eigene Insertion in die Innenmembran, sondern auch die Membraninsertion der N-terminal gelegenen Module 1 und 2, die dafür kein ausreichendes Signal besitzen.

4.2.4 Interaktion von Tim-Komponenten mit Stufe III-Translokationsintermediaten

Es sollte untersucht werden, welche Tim-Proteine für den Import der AAC-Module benötigt werden. Dafür wurden die einzelnen Module in Mitochondrien mit stark vermindertem Gehalt an Tim10, Tim12 bzw. Tim22 importiert. Tim10 ist für den Import von Modul 1 und Modul 2 in den Intermembranraum ausreichend. Für den Import von Modul 3 in die Innenmembran werden Tim10, Tim12 und Tim22 benötigt. Es ist also ein funktioneller TIM22-Komplex erforderlich, um den AAC membranpotentialabhängig in die Innenmembran zu inserieren. Fehlt eine dieser Tim-Komponenten, bindet das Vorstufenprotein an Rezeptoren auf der Oberfläche der Mitochondrien und kann aber nicht vollständig über die Außenmembran transloziert werden.

Durch Quervernetzungsexperimente mit nachfolgender Immunfällung konnte gezeigt werden, daß auf Stufe III des AAC-Importwegs jedes der drei Module in den Intermembranraum exponiert ist und dort mit einem Molekül Tim10 in Kontakt treten kann. Jeder Modul besitzt also einen Bereich für die Wechselwirkung mit Tim10. TM5-6 ist in der Abwesenheit eines Membranpotentials von außen proteasezugänglich. Es bestand also die Möglichkeit, daß es auf Stufe II auf der Außenseite der Mitochondrien an Rezeptoren des TOM-Komplexes gebunden war oder Stufe III erreicht hatte, bei der es den TOM-Komplex durchspannt und in den Intermembranraum exponiert ist. Das Addukt mit Tim10 zeigt, daß ein Teil von TM5-6 in den Intermembranraum exponiert ist, während die Vorstufe von außen durch Proteasen abverdaut werden kann. Daraus kann geschlossen werden, daß das dritte Modul des AAC in Abwesenheit eines Membranpotentials auf Stufe III akkumuliert. Die AAC-Vorstufe und TM1-4 sind auf Stufe III auch in Kontakt mit Tim12 an der Außenseite der Innenmembran. Für TM5-6 konnten jedoch keine quervernetzten Addukte erhalten werden.

Durch Blaue Nativgelelektrophorese wurde gezeigt, daß ein Molekül des AAC-Vorstufenproteins mit einem TIM9-10-Komplex interagiert. Nachdem jeder Modul des AAC eine Bindungsstelle für Tim10 besitzt und Quervernetzungsexperimenten zwei Addukte des AAC mit Tim10 lieferten, kann davon ausgegangen werden, daß auf Stufe III mindestens zwei der AAC-Module in Kontakt mit je einem Molekül Tim10 des hexameren TIM9-10-

Komplexes stehen.

4.2.5 Akkumulation des AAC an Kontaktstellen

Um zu zeigen, daß der AAC auf Stufe III an Kontaktstellen zwischen dem TOM-Komplex und der TIM22-Translokase akkumuliert, wurden AAC, TM1-4 bzw. TM5-6 mit Tim12 quervernetzt.

Das AAC·Tim12-Addukt war von außen für Protease zugänglich. Daraus läßt sich schließen, daß das Stufe III-Intermediat des AAC an Kontaktstellen zwischen dem TOM-Komplex und der TIM22-Translokase akkumuliert.

In Abwesenheit eines Membranpotentials durchspannen die letzten beiden Transmembrandomänen des AAC, TM5-6, den TOM-Komplex, während TM1-4 in Kontakt mit Tim12 an der Außenseite der Innenmembran tritt. Dies verhindert die vollständige Translokation des AAC über die Außenmembran. Der AAC kann den TOM-Komplex offensichtlich nur dann verlassen, wenn er durch den TIM22-Komplex membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert werden kann. Durch die Interaktion mit dem TIM9·10-Komplex ist das AAC-Vorstufenprotein vor dem Eintritt in die Innenmembran vor Missfaltung, und Aggregation geschützt. Tim10 und Tim12 können daher als Chaperone des Intermembranraums bezeichnet werden.

4.2.6 Topologie von AAC-Translokationsintermediaten

Auf Stufe III durchspannt der AAC den TOM-Komplex. Durch Verdau des Translokationsintermediats mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität wurde ein ähnliches Fragmentmuster erhalten. Das AAC-Intermediat wird nur an den Schnittstellen gespalten, die an der Oberfläche der Mitochondrien proteasezugänglich sind. Beim Verdau der C-terminalen Deletion TM1-L5 wurde dasselbe Fragmentmuster erhalten wie mit dem vollständigen AAC. Die Fragmente III₁, III₂ und III₃ (Abb. 20B) entsprechen N-terminalen Segmenten des AAC in den Loopregionen L1, L3 und L5. Bei unterschiedlich langer Akkumulation des AAC auf

Diskussion

Stufe III entstanden die Fragmente III₁, III₂ und III₃ im gleichen Verhältnis zueinander, was darauf schließen läßt, daß sie durch Spaltung eines Intermediats entstehen und nicht aus dem Verdau sequentieller Intermediate. Der in die Innenmembran inserierte AAC (Stufe IV) liefert dagegen Fragmente, die einem Verdau in den Loop-Regionen L2 und L4 sowie im N- und C-Terminus des Proteins entsprechen.

Die Loops L1, L3 und L5 des AAC auf Stufe III „schwingen“ vermutlich durch den TOM-Komplex und sind daher an der Oberfläche von Mitochondrien proteasezugänglich. Nach Spaltung durch Protease kann der N-terminale Teil vollständig in den Intermembranraum importiert werden und erscheint als proteaseresistentes Fragment. Der C-terminale Teil bleibt über Modul 3 am TOM-Komplex gebunden und kann weiter von der Protease abgebaut werden. Der AAC liegt also auf Stufe III in einer definierten Konformation vor, welche die modulare Struktur des AAC widerspiegelt.

4.3 Modell des Imports des AAC

Die Ergebnisse der Untersuchung von Tim9, Tim10 und Tim12 (s. Kap. 4.1) sowie des Transports des AAC vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex (s. Kap. 4.2) führen zum Modell des sequentiellen AAC-Imports in die Innenmembran:

Die cytosolische AAC-Vorstufe (Stufe I) bindet an Rezeptoren des TOM-Komplexes auf der Oberfläche der Mitochondrien (Stufe II). Die teilweise Translokation des AAC über die Außenmembran wird durch den TIM9·10-Komplex vermittelt, der auf der *trans*-Seite der Generellen Importpore an das Translokationsintermediat bindet (Stufe IIIa). Dabei ist Modul 3 in Wechselwirkung mit dem TOM-Komplex. Nachdem der N-Terminus des AAC-Vorstufenproteins über den TOM-Komplex transloziert ist, sind die Carrier-Signaturen aller drei Module mit Tim10 eines Tim9·10-Hexamers im Intermembranraum in Kontakt. Das Stufe III-Intermediat besitzt eine geordnete Konformation, die ähnlich dem inserierten AAC ist: Die Loops L1, L3 und L5 können durch die Pore des TOM-Komplexes schwingen und sind an der Oberfläche der Mitochondrien proteasezugänglich. Das Intermediat wird auf den TIM9·10·12-Komplex übertragen, der mit Tim22 auf der Aussenseite der Innenmembran assoziiert ist. Dabei bleibt Modul 3 des AAC mit dem TOM-Komplex assoziiert; Segmente der Loops L1, L3 und L5 sind immer noch an der Oberfläche der Mitochondrien exponiert.

Erst die Anwesenheit eines Membranpotentials und eines funktionalen TIM22-Komplexes ermöglicht das Loslösen vom TOM-Komplex und die Insertion des AAC-Vorstufenproteins in die Innenmembran. Die vollständige Translokation des AAC über die Außenmembran und die nachfolgende Membraninsertion findet also an Kontaktstellen zwischen den beiden Translokasen statt. Es existiert kein lösliches Translokationsintermediat des AAC im Intermembranraum. Modul 3 arretiert den AAC im TOM-Komplex, bis ein funktioneller TIM22-Komplex die membranpotentialabhängige Insertion vermitteln kann. Das AAC-Intermediat wird durch die Interaktion mit dem TIM9-10-Komplex vor Aggregation im Intermembranraum geschützt. Dieser übernimmt die Funktion der cytosolischen Hilfsproteine, die beim Durchtritt durch den TOM-Komplex vom AAC-Vorstufenprotein abdissoziieren. Desweiteren verhindert die Bindung des TIM9-10-Komplexes an die AAC-Vorstufe deren Missfaltung oder proteolytischen Abbau im Intermembranraum.

Die sog. Carrier-Signatur vermittelt wahrscheinlich die direkte Interaktion der AAC-Vorstufe mit einem Molekül des Tim9-10-Komplexes.

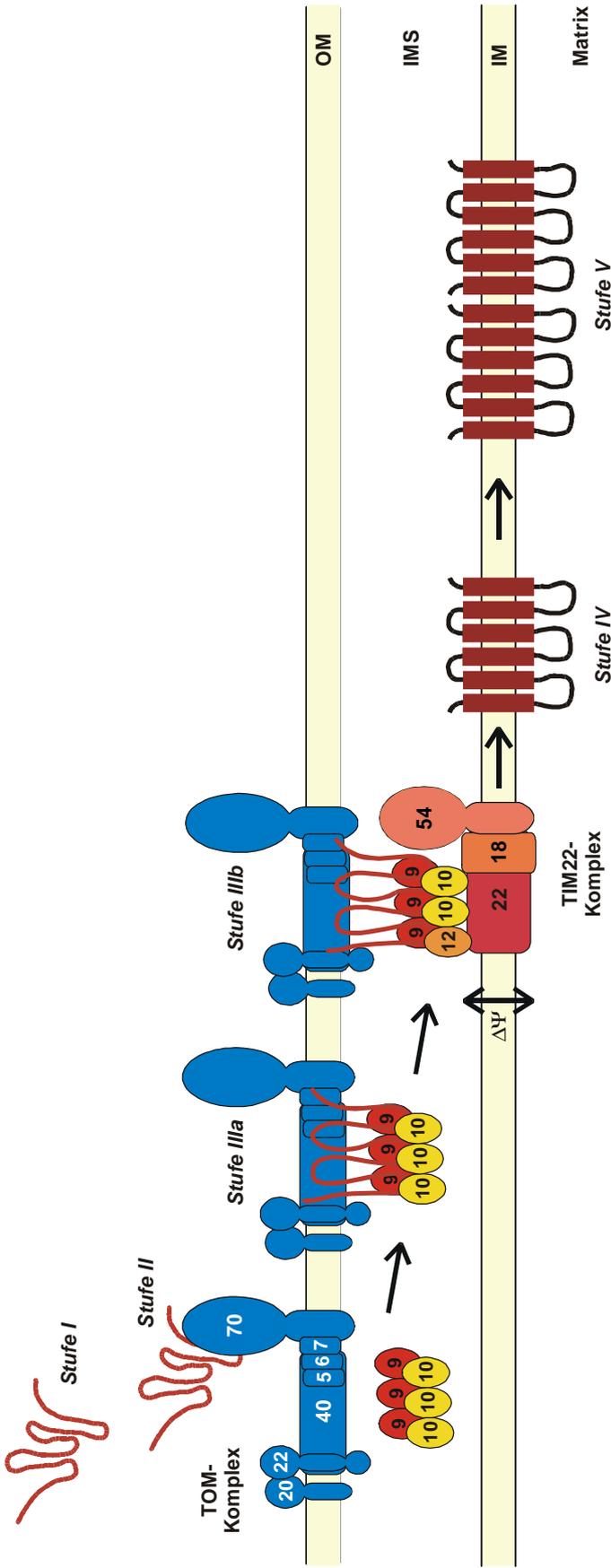


Abb. 24: Modell des sequentiellen AAC-Imports in die mitochondriale Innenmembran über die TIM22-Translokase

Das Vorstufenprotein des ADP/ATP-Carriers (AAC) wird im Cytosol synthetisiert (Stufe I) und bindet an den Rezeptor Tom70 (Stufe II). Der AAC wird zum Importkanal geleitet und teilweise über die Außenmembran transloziert (Stufe IIIa). Dabei werden die cytosolischen Chaperone „abgestreift“. Die vollständige Translokation wird durch die Interaktion des dritten AAC-Moduls mit dem TOM-Komplex verhindert. Die N-terminalen Segmente des AAC binden an den hexameren TIM9·10-Komplex. Nachfolgend wird das Vorstufenprotein auf den TIM9·10·12-Komplex auf der Außenseite der Innenmembran übertragen (Stufe IIIb). Der dritte Modul bleibt dagegen an den TOM-Komplex gebunden. Für die Freisetzung des AAC aus dem TOM-Komplex und die Insertion des AAC in die Innenmembran sind sowohl ein Membranpotential, $\Delta\psi$, als auch die Rekrutierung eines funktionalen TIM22-Komplexes an den TOM-Komplex erforderlich. Der funktionale AAC liegt als Dimer in der mitochondrialen Innenmembran vor (Stufe V). Ausführlichere Erläuterungen im Text.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Import von Carrierproteinen über die TIM22-Translokase näher zu charakterisieren. Die Arbeit befasst sich mit der funktionellen Charakterisierung von drei neuen Komponenten des TIM22-Komplexes, Tim9, Tim10 und Tim12. Insbesondere wurde der Import des AAC-Vorstufenproteins über den TOM-Komplex zum TIM22-Komplex in die mitochondriale Innenmembran untersucht.

Tim9, Tim10 und Tim12 sind Untereinheiten der TIM22-Translokase, die im Intermembranraum lokalisiert sind. Sie liegen in zwei hexameren Komplexen vor, dem TIM9·10-Komplex und dem TIM9·10·12-Komplex. Der TIM9·10-Komplex liegt löslich im Intermembranraum vor, während der TIM9·10·12-Komplex peripher mit dem TIM22-Komplex assoziiert ist. Dieser vermittelt die membranpotentialabhängige Insertion von Präproteinen mit internen Importsignalen in die mitochondriale Innenmembran.

Tim9, Tim10 und Tim12 sind strukturell verwandt und in der Lage, mittels konservierter Cysteinreste ein Zinkfinger-Motiv auszubilden. Die Interaktion der AAC-Vorstufe mit dem TIM9·10- und dem TIM9·10·12-Komplex wird vermutlich durch die Wechselwirkung der Zinkfinger mit der Carrier-Signatur vermittelt. Diese ist in allen Mitgliedern der mitochondrialen Carrier-Familie konserviert.

Der Import des AAC erfolgt in definierten Stufen: Das Vorstufenprotein wird im Cytosol synthetisiert (Stufe I) und bindet an Rezeptoren des TOM-Komplexes (Stufe II). Der AAC wird zum Importkanal geleitet und teilweise über die Außenmembran transloziert (Stufe IIIa). Die vollständige Translokation wird durch die Interaktion des dritten Moduls des AAC mit dem TOM-Komplex verhindert. Segmente des AAC, die in den Intermembranraum exponiert sind, binden an den hexameren TIM9·10-Komplex. Jeder der drei Module kann mit dem TIM9·10-Komplex interagieren. Nachfolgend wird das Vorstufenprotein auf den TIM9·10·12-Komplex auf der Außenseite der Innenmembran übertragen. Der dritte Modul bleibt noch fest an den TOM-Komplex gebunden. Es enthält das Signal für die membranpotentialabhängige Insertion des AAC in die Innenmembran. Für die Freisetzung des AAC aus dem TOM-

Komplex und seine Membraninsertion sind sowohl ein Membranpotential als auch die Rekrutierung eines funktionellen TIM22-Komplexes an die Kontaktstelle zwischen Außen- und Innenmembran erforderlich.

6 Literatur

Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* **18**, 313-319.

Adrian, G.S., McCammon, M.T., Montgomery, D.L. und Douglas, M.G. (1986). Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell Biol.* **6**, 626-634.

Alconada, A., Kübrich, M., Moczko, M., Hönliger, A. und Pfanner, N. (1995) The mitochondrial receptor complex: the small subunit MOM8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 6196-6205.

Arends, H. und Sebald, W. (1984). Nucleotide sequence of the cloned mRNA and gene of the ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **3**, 377-382.

Arkowitz, R.A., Joly, J.C. und Wickner, W. (1993) Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *EMBO J.* **12**, 243-253.

Ahting, U., Thun, C., Hegerl R., Typke D., Nargang F.E., Neupert W. und Nussberger S. (1999) The TOM Core Complex. The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.*, **147**, 959-968.

Arkowitz, R.A., Joly, J.C. und Wickner, W. (1993) Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *EMBO J.*, **12**, 243-253.

Arnold, I., Fölsch, H., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998). Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome *c*₁. *J. Biol. Chem.* **273**, 1469-1476.

Attardi, G. und Schatz, G. (1988). The biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333.

Atenico, D.P. und Yaffe, M. (1992). MAS5, a yeast homologue of DnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol. Cell Biol.* **12**, 283-291.

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

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

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

Berg, J.M. und Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the role of zinc. *Science* **271**, 1081-1085.

Bereiter-Hahn, J. (1990). Dynamics of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1-63.

Bereiter-Hahn, J. und Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res.* **27**, 198-219.

Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**, 1127-1155.

Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.-C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. und Brunner, M. (1995). The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* **81**, 1085-1093.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blom, J., Kübrich, M., Rassow, J., Voos, W., Dekker, P.J., Maarse, A.C., Meijer, M. and Pfanner, N. (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**, 7364-7371.

Blom, J., Dekker, P. and Meijer, M. (1995). Functional and physical interactions of components of the yeast mitochondrial inner-membrane import machinery (MIM). *Eur. J. Biochem.* **232**, 309-314.

Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B.S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. und Schatz, G. (1994). A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial Hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.* **13**, 1998-2006.

Borst, P., und Grivell, L.A. (1978). The mitochondrial genome of yeast. *Cell* **15**, 705-723.

Literatur

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.

Branda, S.S. and Isaya, G. (1995). Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 27366-27373.

Brandolin G., Le Saux, A., Roux, P., Trezeguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Lauquin, G.J. und Vignais, P.V. (1996). The ADP/ATP transport system: a paradigm of metabolite transport in mitochondria. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **51**, 173-185.

Brix, J., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J. Biol. Chem.* **272**, 20730-20735.

Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. und Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a noncleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16522-16530.

Buchner, J. (1996). Supervising the fold: functional principles of the molecular chaperones. *FASEB J.* **10**, 10-20.

Camacho, J.A., Obie, C., Biery, B., Goodman, B.K., Chien-An., H., Almashanu, S., Steel, G., Basey, R., Lambert, M., Mitchell, G.A. und Valle, D. (1999). Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullin syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat. Genet.* **22**, 151-158.

Caplan, A.J., Cyr, D.M., Douglas und M.G. (1992). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**, 1143-1155.

Chaconas, J. und van de Sande, J. (1980). 5'-[³²P]-labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth. Enzymol.* **65**, 75-85.

Chen, L.B. (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 155-181.

Chirico, W.J., Waters, M.G., und Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-809.

Craig, E.A. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 402-414.

Creighton, A.M., Hulford, A., Mant, A., Robinson, D. und Robinson, C. (1995) A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the delta pH-dependent thylakoidal protein transport pathway. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1663-1669.

Cyr, D.M., Stuart, R.A. and Neupert, W. (1993). A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 23751-23754.

Dalbey, R.E. und Robinson, C. (1999) Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 17-22.

Daum, G., Böhni, P.C. und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033.

Dekker, P.J.T., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993). Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett.* **330**, 66-70.

Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1998). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissociation and assembly of the general import pore complex. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6515-6524.

del Arco, A und Strustegui, J. (1998). Molecular cloning of aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain. *J. Biol. Chem.* **36**, 23327-2334.

Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**, 800-805.

Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B. und Lill, R. (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11752-11757.

Dietmeier, K., Zara, V., Palmisano, A., Palmieri, F., Voos, W., Schlossmann, J., Moczko, M., Kispal, G. und Pfanner, N. (1993). Targeting and translocation of the phosphate carrier/p32 to the inner membrane of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 25958-25964.

Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. und Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* **388**, 195-200.

Literatur

Dolce, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F. und Walker, J.E. (1994). The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* **269**, 10451-10460.

Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.

Duee, E.D. und Vignais, P.V. (1965). Echange entre adenine-nucleotides extra- et intramitochondriaux. *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 312-315.

Eilers, M. und Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**, 228-232.

El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J. und Sluse, F.E. (1996). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 573-581.

Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J. Cell Biol.* **122**, 1003-1012.

Endres, M., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* **18**, 3214-3221.

Erdmann, R., Veenhuis, M. und Kunau, W.H. (1997) Peroxisomes: organelles at the crossroads. *Trends Cell Biol.*, **7**, 400-407.

Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Noel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., und Vignais, P.V. (1998). The mitochondrial ADP/ATP carrier: Structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* **80**, 137-150.

Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J.* **15**, 479-487.

Fölsch, H., Gaume, B., Brunner, M., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998). C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J.* **17**, 6508-6515.

Fujiki, Y.H.A., Fowler, S. und Lazarow, P.B. (1982a). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to ER. *J. Cell Biol.* **93**, 97-102.

Fujiki, Y.H.A., Shio, H., Hubbard, A.L. und Lazarow, P.B. (1982b). Polypeptide and phospholipide composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with ER and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.* **93**, 103-110.

Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J.*, **17**, 6497-6507.

Gawaz, M., Douglas, M.G. und Klingenberg, M. (1990). Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 14202-14208.

Glick, B.S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* **80**, 11-14.

Gray, M.W., Burger, G, und Lang, F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.

Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 121-164.

Gruhler, A., Ono, H., Guiard, B., Neupert, W and Stuart, RA. (1995). A novel intermediate on the import pathway of cytochrome b2 into mitochondria: evidence for conservative sorting. *EMBO J.* **14**, 1349-1359.

Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K. and Omura, T. (1993). A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J.*, **12**, 1579-1586.

Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T. and Mihara, K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.*, **13**, 5146-5154.

Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980). Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* **19**, 548-55.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Harlow, E. und Lane, D. (1988). In „Antibodies: A laboratory manual“ Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hartl F.-U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.

Literatur

Heard, T.S., und Weiner., H. (1998). A regional net charge and structural compensation model to explain how negatively charged amino acids can be accepted within a mitochondrial leader sequence. *J. Biol. Chem.* **273**, 29389-29393.

Heldt, H.W., Jacobs, H. und Klingenberg, M. (1965). Endogenous ADP of mitochondria, an early phosphate acceptor of oxydative phosphorylation as disclosed by kinetic studies with ¹⁴C- labeled AdP and ATP and with atractylside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 174-179.

Heldt H.W., und Klingenberg, M. (1965). Endogenous nucleotides of mitochondria participating in phosphate transfer reactions as studied with ³²P labelled orthophosphate and ultramicro scale ion exchange chromatography. *Biochem. Z.* **343**, 433-435.

Herrmann, R.G. (1997). Eukaryotism, toward a new interpretation. In Schenk, HEA, Hermann, RG, Jeon, KW, Müller, NE und Schwemmler, W (eds.), *Eukaryotism and symbiosis*, Springer, Heidelberg, New York, 73-118.

Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., martin, F., Wagner, R. und Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516-521.

Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brutsch, H. und Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J.* **9**, 3191-3200.

Höhfeld, J. and Hartl, F.U. (1994). Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **126**, 305-315.

Hönlinger, A., Kübrich, M., Moczko, M., Gartner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. und Jacquet, M. (1995). The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins.

Mol. Cell. Biol. **15**, 3382-3389.

Hönlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* **15**, 2125-2137.

Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schonfeld, H.J., Schatz, G. und Azem, A. (1997). Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J.* **16**, 1842-1849.

Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellmann, I. and Rosenberg, L.E. (1985). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J.* **4**, 1129-1135.

Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. und Scalafani, R.A. (1989). Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene-expression in yeast growing on glucose. *Gene* **83**, 57-64.

Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B. and Schatz, G. (1984). The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* **178**, 306-310.

Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Opplinger, W. and Schatz, G. (1985). The first twelve aminoacids (less than half of the presequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. *EMBO J.* **4**, 2061-2068.

Hurt, E.C. und Schatz, G. (1987). A cytosolic protein contains a cryptic mitochondrial targeting signal. *Nature* **325**, 499-503.

Huizing, M., Ruitenbeek, W., van den Heuvel, L. P., Dolce, V., Iacobazzi, V., Smeitink, J.A., Palmieri, F. und Trijbels, J.M. (1998). Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 277-284.

Hurt, E.C. und Schatz, G. (1987). A cytosolic protein contains a cryptic mitochondrial targeting signal. *Nature* **325**, 499-503.

Iacobazzi, V., Lauria G, Palmieri F (1997). Organization and sequence of the human gene for the mitochondrial citrate transport protein. *DNA Sequence* **7**, 127-139.

Isaya, G., Kalousek, F., Fenton, W.A. und Rosenberg, L.E. (1991). Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J. Cell Biol.* **133**, 65-76.

Isaya, G., Kalousek, F. und Rosenberg, L.E. (1992). Amino-terminal octapeptides function as a recognition signal for the mitochondrial intermediate peptidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 7904-7910.

Jarosch, E., Tuller, G., Daum, G., Waldherr, M., Voskova, A., und Schweyen, R.J. (1996). Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**, 17219-17225.

Literatur

Jarosch, E., Rödel, G., und Schweyen, R.J. (1997). A soluble 12-kDa protein of the mitochondrial intermembrane space, Mrs11p, is essential for mitochondrial biogenesis and viability of yeast cells. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 157-165.

Jarvis, J.A., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Craik, D.J. und Hoj, P.B. (1995). Solution structure of the acetylated and noncleavable mitochondrial targeting signal of rat chaperonin 10. *J. Biol. Chem.* **270**, 1323-1331.

Jensen, R.E. und Johnson, A.E. (1999). Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain?. *Curr. Biol.* **9**, 779-782.

Johnson, A.E. (1997) Protein translocation at the ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends Cell Biol.*, **7**, 90-95.

Káldi, K., Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1998). Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix targeted proteins. *EMBO J.* **17**, 1569-1576.

Kassenbrock, C.K., Cao, W. and Douglas, M.G. (1993). Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J.* **12**, 3023-3034.

Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. und Jensen, R.E. (1997). The Tim54p.Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **139**, 1663-1675.

Kerscher, O., Sepuri, N.B. und Jensen, R.E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **11**, 103-116.

Kiebler, M., Pfaller, R., Sollner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, **348**, 610-6.

Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I.J., Pfanner, N. und Neupert, W. (1993).

The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* **74**, 483-492.

Klingenberg, M. (1989). Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 1-14.

Klingenberg, M. (1993). Mitochondrial carrier family: ADP/ATP carrier as a carrier paradigm. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **48**, 201-212.

Klöggen, R.B. (1997). Protein translocation into and across the thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **38**, 1-9.

Klug, A. & Schwabe, J.W.R. (1995). Zinc fingers. *FASEB J.* **9**, 597-604.

Knudsen, K.A. (1985). Proteins transferred to nitocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.* **147**, 285-288.

Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. und Schatz, G. (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**, 369-373.

Koehler, C.M., Merchant, S. und Schatz, G. (1999). How membrane proteins travel the across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Cell Biol.* **24**, 428-432.

Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und Or. E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1187-1193.

Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G., und Mihara, K. (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the „acid chain“ hypothesis. *EMBO J.* **17**, 3886-3898.

Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8125-8148.

Krämer, R. und Klingenberg, M. (1980). Enhancement of reconstituted ADP,ATP exchange activity by phosphatidylethanolamine and by anionic phospholipids. *FEBS Lett.* **119**, 257-60.

Kronidou, N.G., Opplinger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. und Horst, M. (1994). Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12818-12822.

Kuan, J. und Saier Jr., H. (1993). The mitochondrial carrier family of transport proteins: Structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.* **28**, 209-233.

Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M. and Pfanner, N. (1994) The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the

Literatur

same preprotein import site. *Febs Lett.* **349**, 222-228.

Kübrich, M., Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. und Hönlinger, A. (1998). The import route of ADP/ATP carrier into mitochondria separates from the general import pathway of cleavable preproteins at the *trans* side of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 16374-16381.

Künkele, K.-P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. und Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* **93**, 1009-1019.

Kyhse-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. Meth.* **10**, 203-207.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Laloraya, S., Dekker, P.J.T., Voos, W., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1995). Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 7098-7105.

Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1999) The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20937-20942.

Lill, R. und Neupert, W. (1996). Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* **6**, 56-61.

Luciano, P., Tokatlidis, K., Chambre, I., Germanique, J.C. und Geli, V. (1998). The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metalloproteinase. *J. Mol. Biol.* **280**, 193-199.

Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. und Meijer, M. (1992). MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* **11**, 3619-3628.

Maarse, A.C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. und Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *Febs Lett.* **349**, 215-221.

Mackay, J.P. & Crossley M. (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 1-4.

Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.M. und Terada, H. (1994). Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent eosin-5-maleimide. *Biochem.* **33**, 9530-9536.

Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y. und Terada, H. (1995). Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline. *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554.

Martin, J., Mahlke, K. und Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* **266**, 18051-18057.

Matouschek, A., Azem, A., Ratliff, K., Glick, B.S., Schmid, K., und Schatz, G. (1997) Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein import. *EMBO J.* **16**, 6727-36.

Mayer, A., Lill, R. and Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol*, **121**, 1233-43.

Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995). Mitochondrial protein import: Reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell* **80**, 127-137.

Mayinger, P., Winkler, E. und Klingenberg, M. (1989). The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett.* **244**, 421-426.

McBride, H.M., Millar, D.G., Li, J.M. and Shore, G.C. (1992). A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* **119**, 1451-1457.

Melton, D., Krieg, P., Rebagliati, M., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7035-7056.

Merrifield, R. (1963). Solid phase synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2179-2154.

Mihara, K. and Omura, T. (1996) Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria - the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol*, **6**, 104-108.

Modrow, S. und Wolf, H. (1986). Characterization of two related Epstein-Barr virus-encoded membrane proteins that are differentially expressed in Burkitt lymphoma and *in vitro*

Literatur

transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5703-5707.

Modrow, S., Höflacher, B., Gürtler, L. und Wolf, H. (1989). Carrier bound synthetic oligopeptides in ELISA test systems for distinction between HIV-1 and HIV-2 infection. *J. Acq. Immun. D.* **2**, 141-148.

Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. und Brunner, M. (1999). The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J.* **18**, 3667-3675.

Mullis, K.B., Falcoona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, A.H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.

Nakai, M., and Endo, T. (1995). Identification of yeast MAS17 encoding the functional counterpart of the mitochondrial receptor complex protein MOM22 of *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **357**, 202-206.

Nelson, D.R. (1996). The yeast ADP/ATP carrier. Mutagenesis and second site revertants. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 133-137.

Nelson, D.R., Felix, C.M. und Swanson, J.M. (1998). Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* **277**, 285-308.

Neumann, E., Schaefer-Rider, W., Wang, Y. & Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**, 841-845.

Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.

Ohno, M., Fornerod, M. und Mattaj, I.W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**, 327-336.

Palmieri, F. (1994). Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* **346**, 48-54.

Palmieri, F., Bisaccia, F., Capobianco, L., Dolce, V., Fiermonte, G., Iacobazzi, V., Indiveri, C. und Palmieri, L. (1996). Mitochondrial metabolite transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 127-132.

Palmisano, A., Zara, V., Hönlinger, A., Voza, A., Dekker, P.J.T. und Pfanner, N. (1998). Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* **333**, 151-158.

Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247-256.

Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M. und Neupert, W. (1987a). The carboxy-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 14581-14584.

Pfanner, N., Tropschug, M. und Neupert, W. (1987b). Mitochondrial protein import: Nucleotide triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell* **49**, 815-823.

Pfanner, N. und Neupert, W. (1987c). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 7582-7536.

Pfanner, N. und Meijer, M. (1997). The Tom and Tim machinery. *Curr. Biol.* **7**, R100-103.

Pfanner, N., Craig, E.A. und Honlinger, A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 25-51.

Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications and instrumentation. *Anal. Biochem.* **174**, 361-373.

Pratt, R.D., Ferreira, G.C. und Pedersen, P.L. (1991). Mitochondrial phosphate transport. Import of the H⁺/Pi symporter and role of the presequence. *J. Biol Chem* **266**, 1276-1280.

Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. und Schatz, G. (1993). Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J.* **12**, 4115-4123.

Rapaport, D., Künkele, K.-P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W. und Lill, R. (1998) Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5256-5262.

Rassow, J., Hartl, F.-U., Guiard, B., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.* **275**, 190-194.

Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: Biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell Biol.* **127**, 1547-1556.

Literatur

Rassow, J. and Pfanner, N. (1996). Protein genesis: chaperones for nascent polypeptides. *Curr. Biol.*, **6** 115-118.

Rassow, J., Dekker, P.J.T., van Wilpe, S., Meijer, M. und Soll, J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* **286**, 105-120.

Riccio, P., Aquila, H., und Klingenberg, M.. (1975). Purification of the carboxy-tractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett.* **56**, 133-138.

Roise, D. und Schatz, G. (1988). Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* **263** , 4509-4511.

Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rospert, S., Glick, B.S., Jenö, P., Schatz, G., Todd, M.J., Lorimer, G.H. and Viitanen, P.V. (1993a). Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10967-10971.

Rospert, S., Junne, T., Glick, B.S. and Schatz, G. (1993b). Cloning and disruption of the gene encoding yeast mitochondrial chaperonin 10, the homolog of E. coli groES. *FEBS Lett.* **335**, 358-360.

Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B.S. and Schatz, G. (1996). Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J.* **15**, 764-774.

Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-83.

Roux., P., Le Saux, A., Trezeguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Vignais, P.V., Lauquin, G.J. und Brandolin, G. (1996). Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. Assignment of tryptophanyl residues of the carrier to the responses to specific ligands. *Biochemistry* **35**, 16125-16131.

Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. and Neupert, W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell* **77**, 249-259.

Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S. and Jensen, R.E. (1994). SMS1, a high-copy

suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell* **5**, 529-38.

Ryan, K.R. and Jensen, R.E. (1995). Protein translocation across mitochondrial membranes: What a long, strange trip it is. *Cell* **83**, 517-519.

Ryan, M.T. und Pfanner, N. (1998). The preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *Biol. Chem.* **379**, 289-294.

Ryan, M.T., Müller, H. und Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.* **274**, 20619-20627.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Saiki, R., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *In Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Press).

Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. und Wu, L.F. (1998) A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **17**, 101-112.

Sanyal, A. und Getz, G.S. (1995). Import of transcription factor MTF1 into the yeast mitochondria takes place through an unusual pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 11970-11976.

Saraste, M. und Walker, J.E. (1982). Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* **144**, 250-254.

Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. und Palmer, T. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.*, **17**, 3640-3650.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.

Schatz, G. (1996). The protein import system of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**, 31763-31766.

Literatur

Scherer, P.E., Manning, K.U., Jenö, P., Schatz, G. and Horst, M. (1992). Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11930-11934.

Schlenstedt, G., Zimmermann, M. und Zimmermann, R. (1994) A stably folded presecretory protein associates with and upon unfolding translocates across the membrane of mammalian microsomes. *FEBS Lett.* **340**, 139-144.

Schleyer, M., und Neupert, W. Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. (1985). *Cell* **43**, 339-350.

Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N. and Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J. Biol. Chem.* **269**, 11893-901.

Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W. and Court, D.A. (1996). Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J. Biol. Chem.* **271**, 17890-17895.

Schneider, H.-C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. und Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**, 768-774.

Schneider, H.-C., Westermann, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996). The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *EMBO J.* **15**, 5796-5803.

Schülke, N, Sepuri, N.B.V., und Pain, D. (1997). In vivo zippering of inner and outer mitochondrial membranes by a stable translocation intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7314-7319.

Schwaiger, M., Herzog, V. und Neupert, W. (1987). Characterization of translocation contact sites in the import of mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* **105**, 235-246.

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

Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**, 582-585.

Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. und Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**, 912-915.

Smagula, C. und Douglas, M-G. (1988a). Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation. *J. Biol. Chem.* **14**, 6783-6790.

Smagula, C. und Douglas, M-G. (1988b). ADP-ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mitochondrial import signal between amino acids 72 and 111. *J. Cell. Bioch.* **36**, 323-327.

Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. und Neupert, W. (1989). MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* **59**, 1061-1070.

Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* **62**, 107-115.

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

Steger, H.F., Söllner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K.A., Pfaller, R., Trulzsch, K.S., Tropschug, M., Neupert, W. und Pfanner, N. (1990). Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J. Cell Biol.* **111**, 2353-2363.

Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995). Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast - Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem* **270**, 22842-22849.

Stuart, R.A., Cyr, D.M. und Neupert, W. (1994a) Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 87-92.

Stuart, R.A., Gruhler, A., van der Klei, I., Guiard, B., Koll, H. and Neupert, W. (1994b). The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. *Eur J Biochem* **220**, 9-18.

Stueber, D., Ibrahimi, I., Culter, D., Dobberstein, B. und Bujard, H. (1984). A novel *in vitro* transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned cDNA sequences. *EMBO J.* **3**, 3143-3148.

Literatur

Telford, J., Kressmann, A., Koski, R., Müller, F., Clarkson, S. und Birnstiel, M. (1979). Delimitation of a promotor for RNA polymerase III by means of a functional test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2590-2594.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 267-271.

Tzagoloff, A., und Meyers, A.M. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 249-285.

Ullman, K.S., Powers, M.A. und Forbes, D.J. (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**, 967-970.

Ungermann, C., Neupert, W. und Cyr. D.M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on prtein translocation into mitochondria. *Science* **266**, 1250-1253.

Vestweber, D., Brunner, J., Baker, A. and Schatz, G. (1989). A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site. *Nature* **341**, 205-209.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 615-619.

Von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, **5**, 1335-1342.

Von Heijne, G., Steppuhn, J., und Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545.

Von Heijne, G. (1998). Life and death of a signal peptide. *Nature* **396**, 111-113.

Voos, W., von Ahsen, O., Müller, H., Guiard, B., Rassow, J. und Pfanner, N. (1996). Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *EMBO J.* **15**, 2668-2677.

Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. und Pfanner, N. (1999). Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Bioch. Biophys. Acta* **1422**, 235-254.

Waldherr, M., Ragnini, A., Jank, B., Teply, R., Wiesenberger, G., und Schweyen, R.J. (1993). A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr. Genet.* **24**, 301-306.

Waltner, M. and Weiner, H. (1995). Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* **270**, 26311-26317.

Waltner, M., Hammen, P.K. und Weiner, H. (1996). Influence of the mature portion of a precursor protein on the mitochondrial signal sequence. *J. Biol. Chem.* **271**, 21226-30.

Walton, P.A., Hill, P.E. and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 675-683.

Weber, F.E., Ministrini, G., Dyer, J.H., Werder, M., Boffelli, D, Compassi, S., Wherli, E., Thomas, R.M., Schulthess, G. und Hauser, H. (1997). Molecular cloning of a peroxisomal Ca²⁺-dependent member of the mitochondrial carrier superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8509-8514.

Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A. und Turner, R.J. (1998) A novel und ubiquitous system for membrane targeting und secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, **93**, 93-101.

Westermann, B., Prip-Buus C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and folding in mitochondria. *EMBO J.* **14**, 3452-3460.

Yaffe, M.P. (1996). The division and inheritance of mitochondria. *Adv. Mol. Cell Biol.* **17**, 341-350.

Yaffe, M.P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behaviour. *Science* **283**, 1493-1497.

**Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende
Veröffentlichungen:**

Sirrenberg, C., **Endres, M.**, Becker, K., Bauer, M.F., Walther, E., Neupert, W. und Brunner, M. (1997). Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**, 29963-29966.

Sirrenberg, C., **Endres, M.**, Fölsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. und Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**, 912-915.

Adam, A., **Endres, M.**, Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Tim9, a new component of the TIM22-54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* **18**, 313-319.

Endres, M., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22-54 complex. *EMBO J.* **18**, 3214-3221.

Teile dieser Arbeit wurden im Nato Advances Study Institute, Cargese, Corsica auf dem Meeting „Protein, Lipid and Membrane Traffic: Pathways and Targeting“ vorgestellt.

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich sehr herzlich Prof. Dr. Dr. Neupert für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen. Viele fachliche und auch persönliche Diskussionen haben mein Leben nicht nur im Labor wesentlich bereichert. Sein stetes Interesse am Fortgang meiner Projekte („Was gibt´s Neues?“) war eine große Unterstützung.

Ich danke besonders Prof. Dr. Michael Brunner, der durch konstruktive Diskussionen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Besonders in Erinnerung sind mir die „Ich hole mal kurz Kaffee“-Tage geblieben, an denen ich ihn meist nie wieder sah. Auch für seine Korrekturen an meiner Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises Brunner und der anderen Gruppen, die immer für gute Laune an hellen wie dunklen Tagen des Laboralltags gesorgt haben.

Besonders danken möchte ich Christiane Kotthoff und Colette Zobywalski, die mir Arbeit abgenommen und in kritischen Situationen stets Ruhe bewahrt haben.

Nicht zu vergessen sind alle Mitarbeiter der Werkstatt, der Tierpflege und der Verwaltung, die es ermöglicht haben, den Laboralltag reibungslos ablaufen zu lassen.

Namentlich erwähnen möchte ich Ruth Neumayer, Klaus Leonhard, Brigitte Gaume, Herrn Hartl für Zinkmessungen und nicht zuletzt Frau Döge, die angeblich schuld an meiner gelegentlichen Neigung zum Nikotingenuss ist.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey danke ich herzlich für die Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Maxi Susanne Karina Endres
Geburtsdatum	1. 2. 1971
Geburtsort	München

Schulbildung

1977-1981	St. Canisius-Grundschule in München
1981-1983	Ludwigsgymnasium in München
1983-1990	Goethegymnasium in Freiburg im Breisgau
1990	Abitur

Hochschulstudium

1990-1996	Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau
1991	Praktikum am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg im Breisgau
1992	Vordiplom
1995	Diplomprüfungen in Chemie
1995-1996	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Georg E. Schulz
1995-1997	am Institut für Organische Chemie und Biochemie: „Umklonierung, Mutagenese, Präparation, Charakterisierung und kinetische Untersuchungen an der Cyclodextrin-Glycosyltransferase aus <i>Bacillus circulans</i> Stamm Nr. 8“
Sept. 1996	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München