

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

**Biogenese der Innenmembran von Mitochondrien:
Funktion von Mba1 und Oxa1 bei der Insertion von
Proteinen**

von
Marc Preuß
aus
Mannheim

München
2004

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 07.09.2004

Dissertation eingereicht am: 07.09.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

Mündliche Prüfung am: 27.10.2004

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
2	EINLEITUNG	1
2.1	PROTEINTRANSPORT IN MITOCHONDRIEN	2
2.2	SORTIERUNG VON PROTEINEN IN DIE MITOCHONDRIALE INNENMEMBRAN	4
2.3	MITOCHONDRIAL KODIERTE PROTEINE	5
2.4	PROTEINTRANSLOKATION IN BAKTERIEN.....	7
2.5	YidC.....	9
2.6	ALB3.....	9
2.7	DAS OXA1-PROTEIN	10
2.8	DAS MBA1-PROTEIN	12
2.9	CYTOCHROM-OXIDASE	12
2.10	BIOGENESE DER UNTEREINHEIT 2 DER CYTOCHROM-OXIDASE	13
2.11	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	13
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	15
3.1.1	<i>Verwendete Plasmide</i>	15
3.1.2	<i>Isolierung von Plasmid-DNS aus E. coli</i>	15
3.1.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	16
3.1.4	<i>Klonierung von DNS-Fragmenten</i>	16
3.1.5	<i>Restriktionsverdau von DNS</i>	16
3.1.6	<i>Ligation</i>	17
3.1.7	<i>Zwischenklonierung</i>	17
3.1.8	<i>Präparation elektrokompetenter Zellen</i>	17
3.1.9	<i>Präparation hitzeschockkompetenter Zellen</i>	18
3.1.10	<i>Transformation mittels Elektroporation</i>	18
3.1.11	<i>Transformation mittels Hitzeschock</i>	18
3.1.12	<i>Reinigung und Analyse von DNS</i>	18
3.1.12.1	<i>Analytische und präparative Gelelektrophorese</i>	18
3.1.12.2	<i>Konzentrationsbestimmung</i>	19
3.1.13	<i>Klonierungsstrategien</i>	19
3.2	GENETISCHE METHODEN	22
3.2.1	<i>Verwendete E. coli Stämme</i>	22
3.2.2	<i>Verwendete Hefestämme</i>	23
3.2.3	<i>Anzucht von S. cerevisiae</i>	23
3.2.4	<i>Transformation von S. cerevisiae mit rekombinanter DNS</i>	24
3.2.5	<i>Test des Wachstumsphänotyps von S. cerevisiae („Tüpfeltest“)</i>	24
3.2.6	<i>Verwendete Neurospora crassa Stämme</i>	25
3.2.7	<i>Anzucht von Neurospora crassa</i>	25
3.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	26
3.3.1	<i>Elektrophoretische Methoden</i>	26

3.3.1.1 SDS-Gelelektrophorese	26
3.3.1.2 Harnstoff-Gelelektrophorese	26
3.3.1.3 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	26
3.3.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	27
3.3.2 <i>Autoradiographie und Densitometrie</i>	27
3.3.3 <i>Synthese von ³⁵S-markierten Proteinen in vitro</i>	27
3.3.4 <i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen</i>	28
3.3.5 <i>Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure</i>	28
3.3.6 <i>Reinigung von Oxa1</i>	28
3.3.7 <i>Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen durch Gelfiltration</i>	29
3.3.8 <i>Rekonstitution der Oxa1-Translokase</i>	30
3.3.8.1 Herstellung der Oxa1-Proteoliposome	30
3.3.8.2 Insertionsexperimente mit rekonstituiertem Oxa1	31
3.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.4.1 <i>Isolierung von Mitochondrien aus S. cerevisiae</i>	31
3.4.2 <i>Isolierung von Mitochondrien aus N. crassa</i>	32
3.4.3 <i>Import von Proteinen in Mitochondrien</i>	33
3.4.4 <i>Subfraktionierung von Mitochondrien</i>	33
3.4.5 <i>³⁵S-Markierung mitochondrialer Translationsprodukte in vivo</i>	34
3.4.6 <i>Proteintranslation in isolierten Mitochondrien (in organello-Translation)</i>	34
3.4.7 <i>Quervernetzung radioaktiv markierter Vorstufenproteine mit mitochondrialen Proteinen</i>	35
3.4.8 <i>Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte mit mitochondrialen Proteinen</i>	35
3.4.9 <i>Bestimmung von Enzymaktivitäten</i>	36
3.4.9.1 Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-Oxidase	36
3.4.9.2 Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktase	36
3.4.9.3 Bestimmung der Aktivität der F ₁ F ₀ -ATPase	37
3.5 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN	37
3.5.1 <i>Apparativer Aufbau</i>	37
3.5.2 <i>Erzeugung künstlicher Lipid-Doppelschichten</i>	38
3.5.3 <i>Messung der Ionenleitfähigkeit des Oxa1-Komplexes</i>	38
3.6 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	38
3.6.1 <i>Herstellung spezifischer Antisera in Kaninchen</i>	38
3.6.2 <i>Verwendete Antikörper</i>	39
3.6.3 <i>Reinigung von Antikörpern</i>	39
3.6.4 <i>Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)</i>	40
3.6.5 <i>Immunpräzipitations-Experimente</i>	41
3.7 PUFFER UND MEDIEN	41
3.8 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	42
3.9 GERÄTE	44
4 ERGEBNISSE	46
4.1 MBA1, EINE NEUE KOMPONENTE DER MITOCHONDRIALEN EXPORTMASCHINERIE	46

4.1.1	<i>Mba1 ist ein Innenmembran-assoziiertes Protein der mitochondrialen Matrix</i>	47
4.1.2	<i>Mba1 wird für die effiziente Insertion von Cox2 benötigt</i>	50
4.1.3	<i>Mba1 interagiert mit mitochondrialen Translationsprodukten</i>	54
4.1.4	<i>Mba1 interagiert mit posttranslational exportierten Proteinen</i>	58
4.1.5	<i>Oxa1 und Mba1 bilden zwei unabhängige höhermolekulare Komplexe</i>	62
4.1.6	<i>Mba1 arbeitet unabhängig von Oxa1</i>	63
4.1.7	<i>Mutationen der MBA1- und OXA-Gene verursachen synthetische Defekte in den Enzymen der Atmungskette</i>	64
4.1.8	<i>Mutationen der MBA1- und OXA1- Gene verursachen synthetische Defekte im Proteinexport</i>	66
4.1.9	<i>Mba1 kann teilweise die Funktion von Oxa1 übernehmen</i>	67
4.2	IN VITRO-CHARAKTERISIERUNG DER OXA1-TRANSLOKASE	70
4.2.1	<i>Das Oxa1-Protein aus N. crassa</i>	70
4.2.2	<i>N. crassa Oxa1 kann die Funktion seines Hefehomologen übernehmen</i>	71
4.2.3	<i>Reinigung der Oxa1-Translokase aus N. crassa-Mitochondrien</i>	73
4.2.4	<i>N. crassa-Oxa1 ist Bestandteil eines homooligomeren Komplexes</i>	75
4.2.5	<i>Rekonstitution der Oxa1-Translokase in künstliche Lipidvesikel</i>	76
4.2.6	<i>Elektrophysiologische Untersuchungen der OXA-Translokase</i>	81
5	DISKUSSION	86
5.1	MBA1, EINE NEUE KOMPONENTE DER PROTEININSERTIONSMASCHINERIE DER INNENMEMBRAN	86
5.1.1	<i>Der Oxa1-unabhängige Insertionsweg</i>	86
5.1.2	<i>Insertion mitochondrial kodierter Proteine</i>	87
5.1.3	<i>Die Rolle von Mba1 beim Export von Proteinen in die Innenmembran</i>	89
5.2	DIE OXA1-TRANSLOKASE DER MITOCHONDRIEN	91
5.2.1	<i>Die Architektur des Oxa1-Komplexes</i>	91
5.2.2	<i>Oxa1 als Translokase</i>	92
5.2.3	<i>Oxa1, eine porenbildende Insertase</i>	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATUR	98

1 Abkürzungsverzeichnis

A _{xyz}	Absorption bei xyz nm
Abb.	Abbildung
AM	Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
COX	Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
Cox2	Untereinheit 2 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
Cyt b ₂	Cytochrom b ₂
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DLD	D-Laktatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Feuchtgewicht
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IM	Innenmembran
IMR	Intermembranraum

kb	Kilobasen
LB	Medium nach Luria und Bertani
min	Minute
MOPS	n-Morpholinoethansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
mRNS	Boten-RNS
mt	mitochondrial
MTSs	mitochondriale Zielsequenzen
NAD	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nuc	kernkodiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	³⁵ Schwefelisotop
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	Signalerkennungspartikel
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Su9	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATPase von <i>N. crassa</i>
t	Zeit
TBS	mit Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

ts	temperatursensitiv
U	Einheiten
Val	Valinomycin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose-Medium
YPG	Hefeextrakt/Pepton/Glycerin-Medium
YPGal	Hefeextrakt/Pepton/Galaktose-Medium
$\Delta\psi$	Membranpotential

2 Einleitung

Der Ursprung des Lebens auf der Erde liegt vor ca. 3,5 bis 4 Milliarden Jahren. Tief unter der Oberfläche, an einer Grenzfläche zwischen einem hydrophoben und einem wässrigen Milieu nahmen einfache Lipidvesikel die ersten Proteine und Nukleinsäuren auf. Diese einfachen Moleküle waren in der Lage miteinander in Wechselwirkung zu treten und durch chemische Evolution und Selektion entstanden immer komplexere Systeme [1, 2]. Die bakteriellen Organismen entwickelten sich zunächst in zwei verschiedene Gruppen, die Eubakterien und die Archeabakterien [3].

Früh in der Evolution wurde die Sonne als Energiequelle genutzt. Durch die Entwicklung des Photosyntheseapparates konnten Bakterien die Lichtenergie nutzen, um Kohlendioxid und Wasser in organische Verbindungen und Sauerstoff umzuwandeln. So stieg vor etwa zwei Milliarden Jahren langsam der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre an und erlaubte die Entstehung der ersten Bakterien, die ihre Energie aus der aeroben Atmung erlangen konnten.

Etwa zur gleichen Zeit, 1-2 Milliarden Jahre nach den ersten Bakterien, entwickelte sich eine neue Art von Zellen, die eukaryotischen Zellen. Sie entstanden höchstwahrscheinlich durch Fusion von Archeabakterien mit Eubakterien. Ob die Entstehung des Zellkerns und der Mitochondrien ein gleichzeitiges Ereignis war, oder Zellkern und Mitochondrien durch sequentielle Verschmelzungen entstanden, ist unklar. Als Vorläufer der Mitochondrien gelten aerobe Bakterien, die den heutigen α -Proteobakterien nahe stehen.

Mitochondrien sind essenzielle Organellen eukaryotischer Zellen, die von zwei Lipidmembranen umgeben sind. Die äußere Membran enthält neben verschiedenen Phospholipiden, wie die meisten tierischen Zellmembranen, Cholesterol, wohingegen die innere Membran das sonst nur in Prokaryoten vorkommende Cardiolipin enthält. Durch diese zwei Membranen werden Mitochondrien in vier Kompartimente unterteilt: die Matrix, die Innenmembran, den Intermembranraum und die Außenmembran. Es findet keine *de novo*-Synthese der Mitochondrien statt, sondern sie werden durch Teilung an die Tochterzellen weitergegeben. Mitochondrien besitzen, wie ihre prokaryotischen Vorläuferorganismen, ein eigenes Genom. Die mitochondrialen Genome der derzeit lebenden Organismen unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe als auch der Anzahl der kodierenden Gene. *Reclinomonas americana* besitzt das bislang größte bekannte mitochondriale Genom eines Einzellers. Es umfasst fast 70 kb und 97 kodierende Gene. Das mitochondriale Genom von *Plasmodium falciparum* ist mit weniger als 6 kb und 3 kodierten Proteinen das kleinste

bekanntes Genom [4]. Das humane mitochondriale Genom kodiert 13 Proteine, die ausschließlich Untereinheiten der Atmungskette darstellen, und das mitochondriale Genom der Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* kodiert acht Proteine (Tabelle 2-1). Im Laufe der Evolution wurde die genetische Information in den Mitochondrien auf ein Minimum reduziert und auf den Zellkern übertragen. Als Konsequenz ist der größte Teil der mitochondrialen Proteine in den heute existierenden eukaryotischen Zellen durch nukleäre DNS kodiert. Der Großteil der mitochondrialen Proteine gelangt somit erst nach Synthese im Zytosol posttranslational über die Membranen an ihren Bestimmungsort in den Mitochondrien. Somit benötigt das Organell spezifische Transportsysteme, welche die Proteine in das Organell transportieren und an den richtigen Ort sortieren.

Tabelle 2-1 Mitochondrial kodierte Proteine in *Sacharomyces cerevisiae*

Gen	kodiertes Protein
ATP6	F ₀ -ATP-Synthase Untereinheit 6
ATP8	F ₀ -ATP-Synthase Untereinheit 8
ATP9	F ₀ -ATP-Synthase Untereinheit 9
COX1	Cytochrom-Oxidase Untereinheit 1
COX2	Cytochrom-Oxidase Untereinheit 2
COX3	Cytochrom-Oxidase Untereinheit 3
COB1	Cytochrom <i>b</i> -Untereinheit des <i>bc₁</i> -Komplexes
VAR1	Protein der kleinen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms

2.1 Proteintransport in Mitochondrien

Der für die Biogenese der Mitochondrien essenzielle Importprozess wurde bisher überwiegend in der Hefe *S. cerevisiae* und dem roten Brotschimmelpilz *Neurospora crassa* studiert [5-7]. Bis zum heutigen Tag sind fünf Membrankomplexe bekannt, die an der Translokation von Polypeptidketten über oder in die Mitochondrienmembranen beteiligt sind. In der Außenmembran befindet sich ein Proteinkomplex, der für den Transport über und in die Außenmembran zuständig ist, die *translocase of the outer membrane* (TOM). Ebenfalls in der Außenmembran befindet sich der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outermembrane β -barrel proteins*), welcher die Sortierung und Insertion von β -Faltblatt-

Proteinen der Außenmembran vermittelt. In der Innenmembran befinden sich drei Komplexe, die TIM23- und TIM22-Komplexe (*translocase of the inner membrane*) sowie der Oxa1-Komplex. Der TIM23-Komplex übernimmt die Translokation aller präsequenzhaltigen Proteine über die Innenmembran. TIM23 inseriert auch monotope Membranproteine in die innere Membran. Der TIM22-Komplex inseriert eine Klasse von polytopischen Membranproteinen in die innere mitochondriale Membran, die interne Zielsequenzen enthalten. Oxa1 vermittelt die Insertion von Membranproteinen in die Innenmembran von der Matrixseite aus.

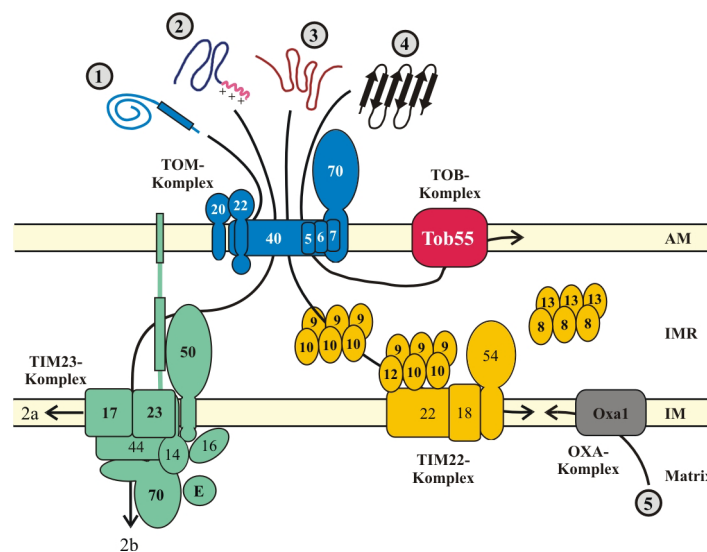


Abbildung 1 Mitochondriale Translokasen: Importwege (1) von Außenmembranproteinen mit N- oder C-terminalen Membranankern, (2) von Proteinen mit N-terminaler Zielsequenz, (3) von Proteinen der Innenmembran mit internen Zielinformationen, (4) von β -Barrel-Proteinen der Außenmembran und (5) von mitochondrial kodierten Proteinen. Konservativ sortierte Innenmembranproteine kombinieren die Transportwege (2b) und (5). AM: Außenmembran; IMR: Intermembranraum; IM: Innenmembran. Weitere Details: siehe Text.

Der TOM-Komplex in der Außenmembran von Mitochondrien ist ein multimerer Komplex von etwa 450 kDa. Er setzt sich aus sieben unterschiedlichen Membranproteinen zusammen, die nach ihrem Molekulargewicht Tom5, Tom6, Tom7, Tom 20, Tom 22 und Tom 70 benannt wurden [8]. Der TOM-Komplex vermittelt die Translokation aller kernkodierten mitochondrialen Proteine über die äußere Membran.

Außenmembranproteine mit einer nichtabspaltbaren N-terminalen Zielsequenz, welcher direkt eine Transmembrandomäne (*signal-anchor*) folgt (Abbildung 1, (1)), werden über den TOM-Komplex transportiert. Wahrscheinlich inseriert die Transmembrandomäne lateral in die Außenmembran. Membranproteine die eine β -barrel-Struktur ausbilden (Abbildung 1 (5)), werden durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum transportiert,

wo sie wahrscheinlich von den Tim8/13-Komplex in Empfang genommen und durch den Tob55-Komplex in die Außenmembran inseriert werden [9, 10].

Mitochondriale Matrixproteine besitzen typischerweise eine N-terminale Zielsequenz (Abbildung 1 (2)), die in den meisten Fällen in der Matrix von der *mitochondrial processing peptidase* (MPP) prozessiert wird. Diese Zielsequenzen sind meist zwischen 20-60 Aminosäurereste lang und enthalten mehrere positive Ladungen sowie hydroxylierte Aminosäurereste. Zielsequenzen sind in der Lage amphipathische α -Helices mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite auszubilden. Mitochondriale Proteine mit einer solchen Zielsequenz werden von den Rezeptorproteinen Tom20 und Tom22 erkannt und die entfaltete Polypeptidkette wird dann durch den Translokationskanal des TOM-Komplexes transportiert. Der Translokationskanal wird hauptsächlich von Tom40 gebildet und auch *general import/insertion pore* (GIP) genannt [7, 11] [12]. Sobald die Präsequenz den Intermembranraum erreicht hat, wird die zu transportierende Polypeptidkette von der N-terminalen Intermembranraumdomäne von Tim23 übernommen. Die Polypeptidkette wird in einem membranpotentialabhängigen Prozess durch den TIM23-Komplex transportiert. Der TIM23-Komplex besteht aus Tim17, Tim23 und Tim50 [13]. Auf der Innenseite der Innenmembran ist der mitochondriale Importmotor über Tim44 mit dem TIM23-Komplex assoziiert. Der Importmotor besteht aus Tim44, Ssc1 (mitochondrialem Hsp70), Tim14 und Tim16 sowie Mge1, dem Nukleotidaustauschfaktor für Ssc1 [14-17]. Tim44 rekrutiert Ssc1 an die Translokase, welches die aus der Translokase kommende Polypeptidkette bindet und so ein Zurückgleiten der Polypeptidkette verhindert (Abbildung 1 (2b)). Die Brownsche Molekularbewegung der Polypeptidkette und die erneute Bindung von Ssc1-Molekülen erscheint ausreichend, um das Protein in die Matrix zu transportieren (*Brownian ratchet-* oder *Trapping-*Modell). Ein aktiver Transport des Präproteins durch eine Konformationsänderung in Ssc1 (*Power stroke-*Modell) scheint dagegen wenig wahrscheinlich [18, 19].

2.2 Sortierung von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran

Mitochondriale Proteine, die im Zytosol synthetisiert werden und deren Bestimmungsort die Innenmembran ist, werden auf drei unterschiedlichen Wegen dorthin sortiert. Proteine mit einer einzigen Transmembrandomäne, die eine $N_{\text{innen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie in der Innenmembran einnehmen und eine N-terminale Zielsequenz enthalten, werden über den TIM23-Komplex sortiert (Abbildung 1 (2a)). Hierbei scheinen die Proteine während des Transports in der Translokationspore arretiert zu werden und dann lateral in die Innenmembran zu inserieren. Beispiele für diese Proteine sind die Untereinheit 5a der

Cytochrom-Oxidase (Cox5a) [20], die D-Laktat-Dehydrogenase (DLD) [21] und das Sco1-Protein [22, 23].

Die mitochondrialen Transporterproteine der *Carrier*-Proteinfamilie (Abbildung 1 (3)), werden durch den TOM-Komplex mit Hilfe des TIM9/10/12-Komplexes zum TIM22-Komplex transportiert. Der TIM22-Komplex besteht aus Tim22, Tim18 und Tim54 und vermittelt die Insertion dieser Gruppe polytooper Membranproteine in die Innenmembran. Die Insertion in die Membran erfolgt in einem membranpotentialabhängigen Schritt [24].

Die dritte Gruppe von Innenmembranproteinen wird zuerst vollständig in die Matrix importiert. Dort wird die Zielsequenz proteolytisch entfernt und die Polypeptidkette anschließend von der Matrix in die innere Membran exportiert (Abbildung 1(5)). Dieser Exportprozeß hat große Ähnlichkeit mit der Proteininsertion in die Innenmembran von Prokaryoten. Die Insertion ist membranpotentialabhängig und die Proteintopologie folgt wie in Bakterien der *Positiv-Inside-Rule* [25, 26]. Daher wurde dieser Weg ‚konservative Sortierung‘ genannt [5, 6, 27]. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Untereinheit 9 der F_1F_0 -ATPase (Su9) aus *N. crassa* [28]. Su9 besitzt zwei Transmembrandomänen, die in der Innenmembran eine $N_{\text{außen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie einnehmen. Während in *S. cerevisiae* das Protein im mitochondrialen Genom kodiert ist, ist es in *N. crassa* im Zellkern kodiert und mit einer N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz ausgestattet. Nach Synthese im Zytosol wird das Su9-Vorläuferprotein komplett in die Matrix importiert und von MPP prozessiert. Anschließend wird der N-Terminus des reifen Su9-Protein in den Intermembranraum exportiert und die erste Transmembrandomäne inseriert in die Innenmembran [28]. Dieser Exportprozess ist abhängig vom Membranpotential, insbesondere vom pH-Gradienten über die Innenmembran. Der N-Terminus muss dabei eine negative Nettoladung tragen um exportiert zu werden. Wird diese Nettoladung durch *in vitro*-Mutagenese neutralisiert oder in eine positive umgewandelt, ist der Export vollständig inhibiert [25, 28]. Oxa1 ist die bisher einzige identifizierte Komponente dieser Exportmaschinerie. In Mitochondrien gibt es weder Homologe zu der bakteriellen Sec-Maschinerie noch zu dem bakteriellen Signalerkennungspartikel (SRP) (2.4 und [29]).

2.3 Mitochondrial kodierte Proteine

Größe und Struktur mitochondrialer Genome verschiedener Organismen sind sehr unterschiedlich [4]. Das humane mitochondriale Genom mit 16 kb kodiert neben zwei rRNS-Molekülen (12S und 16S) und 22 tRNS für 13 Proteine, welche alle Untereinheiten der Atmungskette bilden. Das Genom von *S. cerevisiae* hat, je nach Stamm, eine Größe von 74

bis 85 kb und kodiert für zwei rRNS-Molekülen (21S und 15S), 24 tRNS, den 9S RNS-Anteil der Rnase P und acht Proteine (Tabelle 2-1) [30].

Die acht Haupttranslationsprodukte des mitochondrialen Genoms in *S. cerevisiae* sind bis auf Var1 sämtlich Proteine der Innenmembran. Var1 ist Bestandteil der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen. Die mitochondrial kodierten Innenmembranproteine sind Untereinheiten der Atmungskette. Alle mitochondrialen Translationsprodukte assemblieren mit kernkodierten Proteinen zu oligomeren Proteinkomplexen. Dabei muss die Menge der mitochondrial synthetisierten und kernkodierten Proteine genau ausbalanciert werden. Hierfür wird die Synthese der Proteine durch einen sogenannten ‚cross-talk‘ zwischen den beiden Genomen reguliert. An der direkten Kommunikation vom Kern zum Mitochondrium sind vor allem NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*) und NRF-2 (*nuclear respiratory factor-2*) beteiligt. NRF-1 und NRF-2 regulieren die Expression der kernkodierten Atmungskettenproteine und Faktoren, welche am Metabolismus der mitochondrialen DNS beteiligt sind. Die Atmungskettenproteine sowie die regulatorischen Faktoren werden in die Mitochondrien importiert, wo sie in die Biogenese der Atmungskette oder in die Kontrolle der Replikation bzw. Transkription der mitochondrialen DNS involviert sind. Die retrograde Kommunikation vom Mitochondrium zum Kern ist nur wenig charakterisiert (zur Übersicht: [31]).

Die hydrophoben mitochondrial kodierten Proteine inserieren wahrscheinlich kotranslational in die Innenmembran. Hinweise hierfür kommen von verschiedenen unabhängigen Beobachtungen. Die mitochondriale Proteinsynthese findet direkt an der Innenmembran statt. Die aktiven Ribosomen sind mit der Membran assoziiert, was sich durch elektronenmikroskopische Lokalisation nachweisen ließ [32-34]. Diese Interaktion der Ribosomen mit der Innenmembran kann auf der einen Seite durch die Interaktion der 5'-*untranslated leader*-Sequenzen der mRNA mit ihren membranständigen Translationsaktivatoren vermittelt werden [35]. Auf der anderen Seite wurde kürzlich eine direkte Interaktion der Ribosomen mit Oxa1 nachgewiesen [36, 37]. Darüberhinaus inserieren die an Ribosomen gebundenen Proteinketten bereits während der Synthese in die Membran. Sie sind nach der Freisetzung durch Behandlung mit Puromycin nicht mit Natriumcarbonat extrahierbar [38, 39] und keine detektierbaren Mengen dieser Proteine konnten löslich in der Matrix beobachtet werden [40-43]. Dennoch ist in manchen Fällen auch eine posttranslationale Membrantranslokation möglich und die mechanistische Kopplung von Translation und Translokation nicht immer notwendig [44, 45]. Die Insertion mitochondrialer Translationsprodukte zeigt deutlich Parallelen zu dem Export konservativ sortierter

Membranproteine, so dass beiden Prozessen wohl ein gemeinsamer Transportmechanismus zu Grunde liegt [44, 46-49].

2.4 Proteintranslokation in Bakterien

Die Proteintranslokation in Bakterien wurde eingehend am Modellorganismus *E. coli* untersucht. Bakterien besitzen membranständige Translokationssysteme, die im Zytosol synthetisierte Proteine in oder über die Innenmembran in den periplasmatischen Raum transportieren. Die meisten Proteine der Innenmembran, des Periplasmas oder der Außenmembran werden als Präproteine mit einer abspaltbaren N-terminalen Zielsequenz synthetisiert. Diese Zielsequenzen bestehen in der Regel aus 16-23 Aminosäureresten. Die ersten Aminosäurereste bilden eine basische Domäne aus, welcher eine 8-12 Aminosäurereste große apolare zentrale Domäne folgt. In der C-terminalen Domäne liegt schließlich die Erkennungssequenz für die bakterielle *leader peptidase*. Diese entfernt die Zielsequenz und das reife Protein faltet sich in seine aktive Form. Diese Zielsequenzen haben mehrere Funktionen. Sie inhibieren die Faltung der reifen Domänen der Proteine [50]. Das ermöglicht den Chaperonen im Zytoplasma, wie z.B. SecB, an die Polypeptidkette zu binden und sie in einem translokationskompetenten Zustand zu halten. Somit wird verhindert, dass sich schon im Zytoplasma stabile Strukturen ausbilden, die die Translokase verstopfen könnten [51]. Des Weiteren binden die Zielsequenzen an Komponenten der Translokase, z.B. SecA [52]. Letztlich können Zielsequenzen auch ohne die Hilfe der Translokase spontan in Lipidbilayer inserieren [53, 54]. Es ist allerdings noch unklar, ob das spontane Eintauchen der Zielsequenz in die Lipidmembran auch *in vivo* eine Rolle spielt.

In *E. coli* vermittelt die SecYEG-Maschinerie den Export von Proteinen über die Innenmembran. Die SecYEG-Maschinerie ist ein integraler Membrankomplex und bildet eine Translokationspore in der Plasmamembran. Die Untereinheiten SecY und SecE sind essenziell für das Überleben der Zelle. Dieser Minimalkomplex aus SecY und SecE interagiert mit den weiteren Untereinheiten SecG, SecD, SecF und yajC. Eine weitere essenzielle Komponente der Sec-Translokationsmaschinerie ist SecA. SecA ist eine periphere Komponente der Translokase und findet sich sowohl im Zytoplasma, als auch mit der Membran assoziiert.

In *E. coli* werden Proteine der Außenmembran und des Periplasmas wohl vornehmlich posttranslational über die Membran transportiert, wohingegen Innenmembranproteine hauptsächlich kotranslational in die Membran zu inserieren scheinen. Periplasmatische Proteine sowie die Außenmembranproteine werden typischerweise im Zytoplasma mit

Zielsequenzen synthetisiert. Schon während oder kurz nach der Synthese binden SecB Chaperone diese und halten sie in einem translokationskompetenten Zustand. SecB bildet einen tetrameren Komplex und bindet an den reifen Teil der Polypeptidkette. Dieser Chaperon/Protein-Komplex interagiert mit SecA. In einem ATP-abhängigen Schritt wird die Polypeptidkette an SecA überführt und SecB in Zytosol entlassen. Mittels mehrerer ATP-abhängiger SecA-Insertionszyklen in den SecYEG-Membrankomplex wird das Vorläuferprotein über die Membran transportiert. Dabei fädelt SecA während eines Insertions- und Deinsertionszyklus ca. 20-30 Aminosäurereste der Polypeptidkette durch den Membrankanal [55]. Während SecA deinsertiert, gleitet die Polypeptidkette durch die integrale Domäne der Translokase über die Innenmembran. Die treibende Kraft ist das Membranpotential [56, 57]. Nach oder während der Translokation wird die Zielsequenz entweder von der *leader peptidase* oder der *lipoprotein signal peptidase* entfernt.

Eine Gruppe von bakteriellen Innenmembranproteinen wird mittels des SRP-Translokationsweges zur Innenmembran transportiert [58-61]. Das SRP (*signal recognition particle*) setzt sich aus einer 4.5S RNS und dem Protein Ffh (*Fift four homologue*), dem Homolog zur Untereinheit 54 des eukaryotischen SRP, zusammen [62]. Die Synthese von Membranproteinen beginnt an freien Ribosomen im Zytosol der Bakterien. Das SRP erkennt die Signalsequenz oder eine hydrophobe Transmembrandomäne, sobald sie das Ribosom verlässt. Dieser Komplex aus translatierendem Ribosom und SRP bindet nun an FtsY, den bakteriellen SRP-Rezeptor. Die Bindung zwischen SRP und FtsY ist GTP reguliert. Der SRP/FtsY-Komplex dirigiert das Ribosom an den SecYEG-Komplex [63]. Die Polypeptidkette wird mit Hilfe der Sec-Translokase in die Membran inseriert. Vor kurzer Zeit wurde eine weitere Komponente der bakteriellen Translokationsmaschinerie identifiziert, YidC [64]. Dieses Protein scheint an der Proteininsertion von Membranproteinen beteiligt zu sein (siehe 2.5).

Neben diesen Sec-abhängigen Insertionswegen gibt es auch Sec-unabhängige Transportwege. Die Bakteriophagenhüllproteine Pf3 [65] und M13 sind die bekanntesten Proteine, die weder Komponenten des SRP-Translokationsweges noch der Sec-Maschinerie benötigen [61]. Für die Insertion beider Proteine ist YidC absolut notwendig [66]. Somit vermittelt YidC die Insertion von Membranproteinen je nach Substrat abhängig oder unabhängig von der Sec-Translokase.

Letztlich ist in *E. coli* noch der TAT-Translokationsweg bekannt [67]. Proteine, die über den TAT-Translokationsweg transportiert werden, tragen in ihrer Signalsequenz ein

charakteristisches ‚*twin-arginine-motive*‘ aus zwei aufeinanderfolgenden Argininresten. Diese Proteine binden üblicherweise Redox-Cofaktoren und falten oder oligomerisieren bereits bevor sie über die Membran transportiert werden.

2.5 YidC

Das bakterielle YidC-Protein wurde ursprünglich als Oxa1-Homolog in *E. coli* identifiziert [68]. Es besitzt 6 Transmembrandomänen und nimmt in der Plasmamembran eine N_{innen}-C_{innen}-Topologie ein [69]. Die erste Transmembrandomäne besitzt die Funktion des Membranankers. Vergleiche der Hydrophobizitätsprofile von YidC und Oxa1 zeigen, dass die C-terminalen Transmembrandomänen in Anzahl und Abstand übereinstimmen [69]. YidC ist sowohl an der Sec-unabhängigen als auch an der Sec-abhängigen Translokation beteiligt. Die Beteiligung von YidC an der Sec-unabhängigen Membraninsertion von Proteinen wurde anhand der Phagenhüllproteine M13 und Pf3 gezeigt. In Abwesenheit von YidC ist die Insertion dieser Proteine inhibiert [66, 70]. Die YidC-abhängige Insertion von Pf3 und M13 wird von dem elektrochemischen Membranpotential über die bakterielle Innenmembran stimuliert. Für Pf3 wurde gezeigt, dass zwei negative Ladungen im N-Terminus direkt in die Translokation involviert sind [71, 72]. Weitere Untersuchungen an Pf3 zeigten, dass YidC direkt mit hydrophoben Segmenten in Pf3 interagiert [73].

YidC spielt darüberhinaus für die Membraninsertion von Sec-abhängigen Innenmembranproteinen eine Rolle [64]. Bei der Insertion des Membranproteins FtsQ steht YidC im direkten Kontakt mit der hydrophoben *signal anchor sequence* von FtsQ. Ebenfalls mit Hilfe von YidC integriert die erste Transmembrandomäne der *leader peptidase*, einem weiteren Sec-abhängigen Substrat [66, 74]. Es wird angenommen, dass YidC bei der lateralen Insertion der Polypeptidkette aus dem SecYEG-Translokationskanal in die Membran assistiert. Zum einen interagiert FtsQ während seiner Insertion zuerst mit SecY und anschließend mit YidC, zum anderen verstopfen Sec-abhängige Membranproteine die Translokase, wenn YidC abwesend ist [70].

2.6 Alb3

Das Protein Alb3 (Albino3) ist das Oxa1-Homolog in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten. Es wurde in einer pigmentdefizienten *Arabidopsis thaliana*-Mutante identifiziert [75]. Die Deletion des *alb3*-Gens führt zur Reduktion des Chlorophyllgehaltes und zur Veränderung der Morphologie der Chloroplasten [75]. Alb3 vermittelt die Insertion von Vertretern der LHCP-Familie (LHCP steht für *light-harvesting chlorophyll-binding*

protein). Präinkubation von Thylakoidmembranen mit anti-Alb3 Antikörpern inhibiert die Integration der LHCPs Lhcb1, Lhcb4.1 und Lhcb5 [76, 77]. Chloroplasten verfügen im Gegensatz zu Mitochondrien noch über SRP- und Sec-abhängige Transportwege. Substrate, die den Sec-Translokationsweg oder den Δ pH-Weg nutzen, werden durch Antikörperbehandlung gegen Alb3 nicht beeinflusst [76]. LHCPs werden posttranslational in die Thylakoidmembran integriert und sind abhängig von cpSRP und cpFtsY [78-80]. Dabei bildet Alb3 einen Komplex mit cpSRP/cpFtsY aus [81]. Im selben Komplex wurde zusätzlich cpSecY gefunden. Eine weitere Studie identifizierte Alb3 zusammen mit cpSecY in einem ca. 200 kDa-Komplex nach Solubilisation von Thylakoidmembranen in Digitonin und Trennung der Proteinkomplexe mittels Gelfiltration [82]. Bisher wurden jedoch noch keine Substrate identifiziert, die sowohl cpSecY als auch Alb3 zur Membraninsertion benötigen.

2.7 Das Oxa1-Protein

Das mitochondriale Oxa1-Protein ist ursprünglich in zwei unabhängigen Screens zur Identifizierung von Proteinen, die zur Assemblierung der Cytochrom-Oxidase benötigt werden, entdeckt worden (*Oxidase assembly mutant 1*) [83, 84]. Nachfolgende Untersuchungen der *oxa1*-Mutanten zeigten, dass zusätzlich zur Beeinträchtigung der Cytochrom-Oxidase auch die Assemblierung der F_1F_0 -ATPase und des *bc₁*-Komplexes betroffen war [85, 86]. Oxa1 scheint somit eine zentrale Rolle in der Assemblierung von Innenmembran-Komplexen zu spielen. Oxa1 selbst ist ein integrales Membranprotein der inneren mitochondrialen Membran [87].

Oxa1 wird als Vorstufenprotein mit einer mitochondrialen Präsequenz im Zytoplasma synthetisiert und zuerst vollständig in die Matrix importiert. Nach Prozessierung der Präsequenz werden der N-Terminus des Proteins und die im Intermembranraum lokalisierten Domänen über die Innenmembran exportiert. Das fünf Transmembrandomänen umfassende Protein nimmt in der Innenmembran eine N_{außen}-C_{innen}-Topologie ein [85, 87, 88] und assembliert in der Innenmembran zu einem oligomeren Komplex [48]. Oxa1 ist an seiner eigenen Biogenese beteiligt: In *in vitro* Importexperimenten wird Oxa1 in Abwesenheit von endogenem Oxa1 zwar noch in die mitochondriale Matrix importiert, der Export der hydrophilen Intermembranraumdomänen von der Matrix über die Innenmembran ist ohne funktionellen Oxa1-Komplex allerdings gestört [48].

Studien mit den *oxa1*-Mutanten in *S. cerevisiae* zeigten eine Beteiligung von Oxa1 an der Insertion von Membranproteinen von der Matrix in die Innenmembran [46-49]. Wie oben erwähnt, ist die Integrität der Cytochrom-Oxidase in *oxa1*-Deletionsmutanten beeinträchtigt

und somit können diese Mutanten auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen nicht überleben. Oxa1 ist direkt an der Biogenese der Cytochrom-Oxidase beteiligt. Es vermittelt die Insertion der mitochondrial kodierten Untereinheit 2 der Cytochrom-Oxidase, bei der zwei Transmembrandomänen in die Membran inseriert werden [44, 47] (siehe 2.10), so dass beide Enden des Proteins in den Intermembranraum ragen.

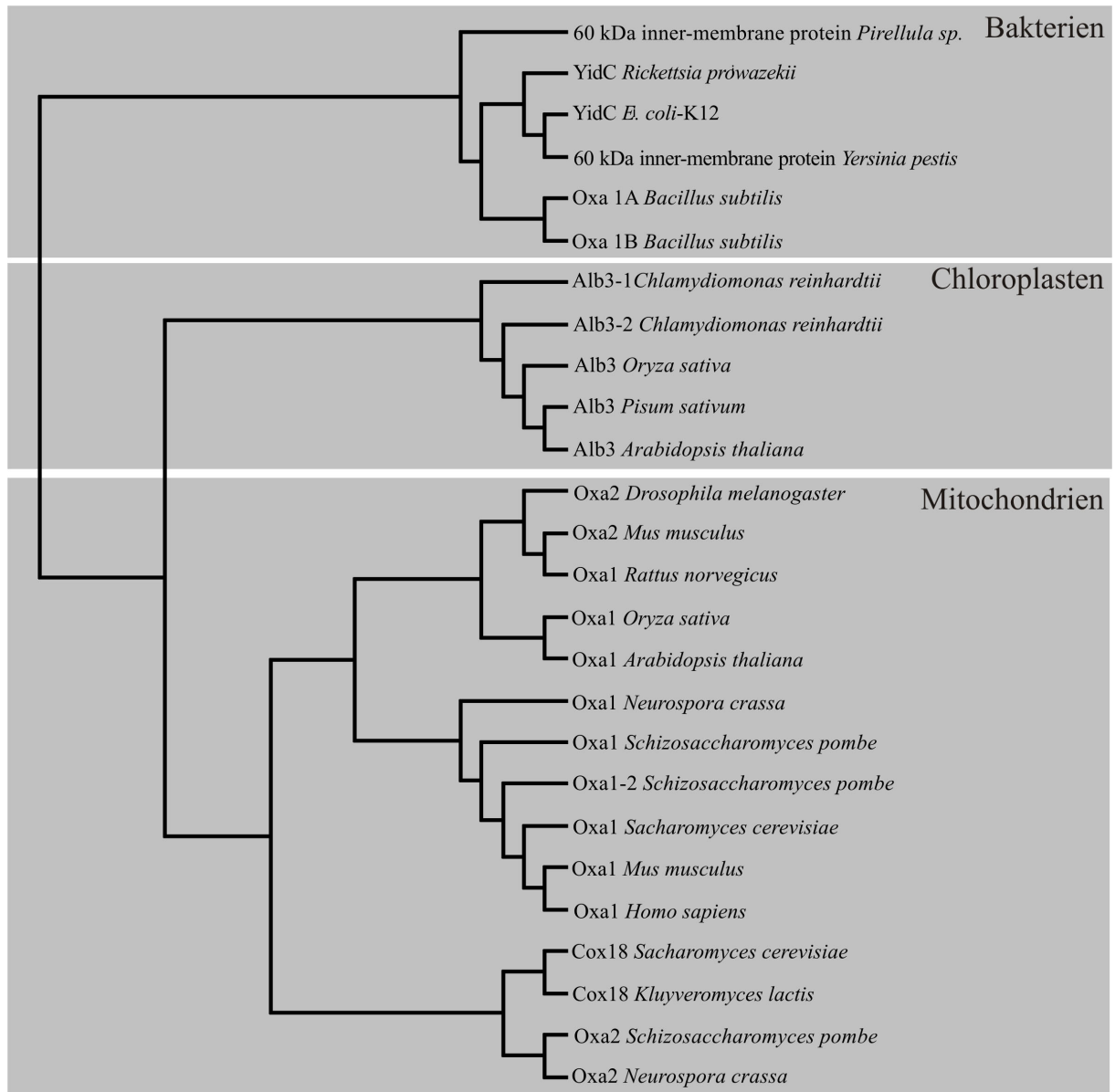


Abbildung 2 Familie der Oxa1-Homologen in verschiedenen Organismen: Das Diagramm wurde auf der Basis von Sequenzvergleichen erstellt und zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Oxa1-Homologen.

Oxa1 gehört zu einer ubiquitär verbreiteten Proteinfamilie, deren Vertreter die Proteininsertion in Membranen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien vermitteln (Abbildung 2) [66, 68, 76, 83]. Alle Oxa1-Homologen zeigen einen einheitlichen Aufbau aus

einem konservierten Kernbereich mit fünf Transmembrandomänen und flankierenden Domänen geringer Homologie. Die Homologie zeigt sich auch auf funktioneller Ebene. Die Oxa1-Proteine von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und *Homo sapiens* (*H. sapiens*) sind in der Lage, den Phänotyp der Hefe-Disruptionsmutanten zu komplementieren [68, 89]. Die Proteine der Cox18/Oxa2-Familie sind entferntere Verwandte von Oxa1. Die Deletion des *COX18*-Gens in Hefe scheint den Export des C-Terminus der Untereinheit 2 der Cytochrom-Oxidase zu inhibieren [90].

2.8 Das Mba1-Protein

Das *MBA1*-Gen (*Multi-copy Bypass of AFG3*) der Hefe wurde gemeinsam mit Oxa1 und der Protease Pim1 als Suppressor von *afg3* (*yta10*)- und *rca1* (*yta12*)-Deletionsmutanten identifiziert [91]. Yta10 und Yta12 sind membranständige Proteasen, welche an der Biogenese der Atmungskettenkomplexe beteiligt sind [92-95].

Mutanten in *mba1* zeigen eine verminderte Wachstumsrate auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dieser Phänotyp ist bei erhöhter Temperatur stärker ausgeprägt. Des Weiteren sind die Mengen an Cytochrom aa₃ in den Mutanten stark vermindert. Das lässt auf Defekte in der Atmungskette schließen [96]. Somit scheint auch Mba1 an der Biogenese der Atmungskettenkomplexe beteiligt zu sein [96].

2.9 Cytochrom-Oxidase

Die mitochondrial kodierten Proteine Cox1, Cox2 und Cox3 assemblieren zusammen mit einer Reihe von kernkodierten Untereinheiten in einen oligomeren Komplex der Atmungskette, die Cytochrom-Oxidase (COX).

Die Cytochrom-Oxidase ist der Komplex der Atmungskette in Mitochondrien, welcher molekularen Sauerstoff zu Wasser reduziert. Dies geschieht durch Übertragung von Elektronen des Cytochrom *c* auf den molekularen Sauerstoff bei gleichzeitigem Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum.

Die Cytochrom-Oxidase aus dem Rinderherzen enthält 13 Untereinheiten [97, 98]. In *S. cerevisiae* zeigen die Aminosäuresequenzen aller 11 identifizierten Untereinheiten hohe Homologie zu denen in Säugern [99, 100]. Die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom-Oxidase werden in *S. cerevisiae*, wie in den meisten Eukaryoten, im mitochondrialen Genom kodiert. Diese Untereinheiten sind in allen Organismen hoch konserviert und bilden den katalytischen Kern der Cytochrom-Oxidase. Die Architektur der Untereinheiten ist durch die

Röntgenstruktur geklärt [97, 98, 100]. Cox1 ist ein Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen [98]. Sowohl N- als auch C-Terminus ragen in die Matrix. Cox2 besitzt zwei Transmembrandomänen und nimmt in der Membran eine $N_{\text{außen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie ein, während Cox3 mit sieben Transmembrandomänen eine $N_{\text{innen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie aufweist.

Alle mitochondrial kodierten sowie die meisten der kernkodierten Untereinheiten der Cytochrom-Oxidase werden für die Assemblierung und zur Stabilität der Cytochrom-Oxidase benötigt. Wenn die Cytochrom-Oxidase wegen der Disruption eines der strukturellen Gene nicht assembliert, sind die endogenen Proteinmengen der mitochondrial kodierten Untereinheiten drastisch reduziert.

Neben den strukturellen Untereinheiten gibt es eine Vielzahl weiterer kernkodierter Proteine, die spezifisch für die Biogenese einer funktionellen Cytochrom-Oxidase wichtig sind (zur Übersicht: [101, 102]).

2.10 Biogenese der Untereinheit 2 der Cytochrom-Oxidase

Die Untereinheit 2 (Cox2) der Cytochrom-Oxidase (COX) ist ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen und nimmt in der Membran eine $N_{\text{außen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie ein. Um diese Topologie zu erreichen, müssen zwei Transmembrandomänen in die Membran inseriert werden und die hydrophilen und geladenen Termini über die Membran exportiert werden. Cox2 wird als Vorläuferprotein (pCox2) mit einer 15 Aminosäurereste langen Präsequenz synthetisiert. Die Insertion von pCox2 zu einer endgültigen $N_{\text{außen}}-C_{\text{außen}}$ -Topologie ist membranpotentialabhängig [44, 46]. Speziell der lange und stark negativ geladene C-Terminus zeigt eine starke Abhängigkeit von einem hohen Membranpotential über die innere Membran [44, 46]. Während oder direkt nach dem Export von pCox2 bindet das Chaperon Cox20 das Vorläuferprotein [103]. Die Assoziation zwischen Cox20 und pCox2 ist essenziell für die Prozessierung durch die Protease Imp1 [103], welche auf der dem Intermembranraum zugewandten Seite der Innenmembran lokalisiert ist.

Die Insertion von Cox2 in die Innenmembran erfolgt kotranslational [48, 49, 104]. Die Insertion von Cox2 und der Export des N- und C-Terminus ist kein spontanes Ereignis, sondern wird durch den Oxa1-Proteinkomplex vermittelt [46, 47].

2.11 Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten tiefere Einsichten in den Proteinexport aus der mitochondrialen Matrix gewonnen werden. Zum einen sollten neue bzw. fehlende

Komponenten identifiziert werden und zum anderen sollte der Exportmechanismus *in vitro* untersucht werden. Die Identifizierung von Mba1 zusammen mit Oxa1 im gleichen *muticopy suppressor screen* und der teilweisen Defekte in der Biogenese der Atmungskette in *mba1*-Mutanten, machte Mba1 zu einem möglichen Kandidat für eine weitere Komponente der Exportmaschinerie. Eine mögliche Rolle von Mba1 im Proteinexport sollte untersucht und näher charakterisiert werden.

Des Weiteren sollte die schon bekannte Komponente der Exportmaschinerie, das Protein Oxa1, in Bezug auf Architektur und Funktionsweise untersucht werden. Hierzu sollte der Oxa1-Komplex aus Mitochondrien von *N. crassa* isoliert und dessen Funktion und Struktur durch biochemische, chromatographische und elektrophysiologische Verfahren analysiert werden. Ist Oxa1 das einzige Protein des Komplexes? Aus wievielen Untereinheiten besteht der Oxa1-Komplex? Bildet die Oxa1-Translokase eine Pore in der Membran und ist diese reguliert? Der isolierte Komplex sollte in Liposomen rekonstituiert werden, um einen Assay zu entwickeln, der die biochemische Charakterisierung der Insertion von Substratproteinen durch den Oxa1-Komplex ermöglicht.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das entsprechende DNS-Fragment in den Vektor pGEM3, pGEM4 oder pGEM-T kloniert. In Tabelle 3-1 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Kurzbeschreibung aufgeführt. Die Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind unter 3.1.13 beschrieben.

Tabelle 3-1 Verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Vektor</i>	<i>Referenz</i>
pMP1	codiert für Mba1p	pGem4	diese Arbeit
pMP2	codiert für Mba1p	pYX122	diese Arbeit
pMP3	codiert für ATPase8	pGEM3	diese Arbeit
pMP4	codiert für Met-His ₆ YidC ²⁻²⁶³ - TEV-Oxa1 ^{Sc 43-402}	pEH1	diese Arbeit
pMP5	codiert für Met-Oxa1 ⁴³⁻¹⁴⁹ - Met ₃ Lys ₃	pGEM4	diese Arbeit
pMP6	codiert für Cox2 ^{Nc 1-77} - Met ₃ Lys ₃	pGEM4	diese Arbeit
pMP7	codiert für Met ₄ -Oxa1 ^{Sc 43-200}	pGEM4	diese Arbeit
pMP8	codiert für Oxa1 ¹⁻¹¹⁹ -YidC ³⁴⁶⁻⁵⁴⁰	pRS426	diese Arbeit
pMP9	codiert für Oxa1 ^{Sc 1-119} - YidC ³⁴⁶⁻⁵⁴⁰ -Oxa1 ^{Sc 311-401}	pRS426	diese Arbeit
pOxa1p	codiert für Oxa1	pGEM3	[88]
pSu9-1-112DHFR	codiert für Su9 ^{Nc 1-112} - Dehydrofolatreduktase(DHFR)	pGEM4	[28]
pSu9-CoxII-DHFR	codiert für Su9 ^{Nc 1-64} -Cox2 ^{Nc 1-77} - DHFR	pGEM4	[44]
pUC9Su9Su9ATPase8	Su9 ₂ ^{Nc 1-64} -ATPase8 ^{Sc}	pUC9	Dr. Phillip Nagly

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

Kleine Mengen DNS wurden durch enzymatische und alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen gewonnen [105]. Dazu wurden 2 ml LB^{Amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1 ml Kultur wurden für 1 min bei 7500 g (RT) sedimentiert und in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym, 25

mM Tris/HCl pH 8) durch Schütteln resuspendiert (5 min, RT). Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde für 5 min bei 65°C lysiert. Die Probe wurde anschließend mit 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat pH 4,5) neutralisiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine und die chromosomale DNS wurden bei 35000 g (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt, die Plasmid-DNS für 15 min bei -80°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen im Vakuum wurde die Plasmid-DNS in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS wurde das Kit Jetstar (Midi-Säulen) verwendet. 50 ml einer Übernachtskultur in LB^{Amp} wurde nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet und die Plasmid-DNS isoliert.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden als DNS-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert [106, 107]. Die als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNS komplementäre Sequenz.

Für eine Standard-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1-100 ng Matrizen-DNS sowie 20 pmol von jedem Primer eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate, 2,5 U Taq-DNS-Polymerase, 0,25 U Pfu-DNS-Polymerase und den vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Der Reaktionsansatz wurde solange auf Eis gelagert, bis der PCR-Block 94°C erreicht hatte. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit 35 Temperaturzyklen durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus dem Schmelzen der DNS bei 96°C für 60 s, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide typischerweise bei 48-64°C für 60 s und Synthese der DNS bei 72°C für 60 s. Meist wurden die ersten 5 Zyklen bei einer um 5-10°C niedrigeren Anlagerungstemperatur durchgeführt. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 5 minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNS-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNS-Fragmente wurde durch Gelelektrophorese (3.1.12.1) kontrolliert.

3.1.4 Klonierung von DNS-Fragmenten

3.1.5 Restriktionsverdau von DNS

Für die Präparation von DNS-Fragmenten und für die Identifizierung positiver Transformanten bei der Neukonstruktion von Plasmiden, wurde die Plasmid-DNS mit

Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurde das Puffersystem von New England Biolabs verwendet.

Der Restriktionsansatz im präparativen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Je 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme wurde zu dem vom Hersteller empfohlen 10×Puffer mit 5 bis 15 µg DNS und sterilem Wasser gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h bei der empfohlenen Temperatur.

Die Spaltung im analytischen Maßstab erfolgte mit je 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1 µl DNS-Lösung in 20 µl Gesamtvolumen. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei der empfohlenen Temperatur.

Im Anschluss an die Restriktion wurden die Ansätze der präparativen bzw. analytischen Gelelektrophorese unterzogen (3.1.12.1).

3.1.6 Ligation

Für die Neukonstruktion von Plasmiden wurden die durch Spaltung mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNS-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft.

Die Reaktion wurde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 50-200 ng DNS des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNS-Fragment gemischt und bei einer Temperatur von 16°C über Nacht inkubiert.

3.1.7 Zwischenklonierung

Um die vollständige Restriktion eines DNS-Fragmentes zu gewährleisten, wurde das durch PCR amplifizierte Fragment in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5α oder in *E. coli* XL1-blue Zellen transformiert. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNS präpariert, aus der das DNS-Fragment mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten wurde.

3.1.8 Präparation elektrokompetenter Zellen

Um elektrokompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 g (4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen hintereinander mit 400 ml, 200 ml und 4 ml kaltem 10%igem Glycerol (mit Milipore-Wasser angesetzt) gewaschen. Nach dem

letzten Waschschrift wurde die Probe in 400 μ l 10%iger Glycerollösung resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren (45 μ l Aliquots) und bei -80°C gelagert.

3.1.9 Präparation hitzeschockkompetenter Zellen

Um hitzeschockkompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 100 ml LB Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 0,6 wurde die Kultur bei 600 g (4°C) für 10 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 40 ml eisgekühltem Tfb 1 (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl , 10 mM CaCl_2 , 12% (w/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (600 g, 4°C , 10 min), das Sediment in 4 ml Tfb 2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl , 12% (w/v) Glycerin) resuspendiert und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. 200 μ l Aliquots der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.10 Transformation mittels Elektroporation

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde 1 μ l Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45 μ l kompetenter Zellen gemischt. Von diesem Ansatz wurden 40 μ l in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann einem Stromstoß (2,5 kV, 400 Ω , 25 μF) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor sie dann auf einer LB-Platte ausgestrichen wurden.

3.1.11 Transformation mittels Hitzeschock

Nach Auftauen eines 200 μ l Aliquots (siehe 3.1.9) wurden 90 μ l kompetente *E. coli*-Zellen mit 9-15 μ l Ligationsansatz oder 1-2 μ l Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 2 min auf 42°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein Kulturröhrchen überführt, für 1 h bei 37°C und 160 rpm inkubiert und auf eine LB^{Amp} -Kulturplatte ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.12 Reinigung und Analyse von DNS

3.1.12.1 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNS-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im

analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden, als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNS-Fragmenten durchgeführt.

Das Bettvolumen der verwendeten Gele betrug 30-100 ml und das Taschenvolumen 20-120 µl. Je nach Größe der DNS-Fragmente wurde eine 0,8-3%ige Agaroselösung in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,5) zum Gießen der Gele verwendet. Die Agarose wurde vor dem Gießen auf eine Ethidiumbromidkonzentration von ca. 0,5 µg/ml eingestellt. Die Proben wurden mit 5×Auftragspuffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und aufgetragen. Falls die Proben störende Mengen an RNS, enthielten, wurde ein 5×Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml Rnase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 10 V/cm durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht.

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

3.1.12.2 Konzentrationsbestimmung

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

3.1.13 Klonierungsstrategien

pMP1 (pGEM4-Mba1)

Die kodierende Sequenz von *MBAl* wurde mittels PCR mit den Primern HH38 und HH39 aus genomischer Hefe-DNS amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die im Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *HindIII* in den Vektor pGEM4 kloniert.

HH38 5'-GGG TCT AGA ATG AGT GTA TTA AGA TC-3'

HH39 5'-GGG AAG CTT GCC TTA GCT TGG AGG TAA ACG-3'

pMP2 (pYX122-Mba1)

Die kodierende Sequenz von *MBAl* wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Plasmid pMP1 herausgeschnitten und in den Hefeexpressionsvektor pYX122 (Triosphosphatisomerase-Promotor; *HIS3*; CEN-Plasmid) kloniert.

pMP3 (pGEM3-ATPase8)

Die kodierende Sequenz des Proteins ATPase8 wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* aus dem Plasmid pUC9Su9Su9ATPase8 isoliert und in den Vektor pBluescript zwischenkloniert. Die kodierende Sequenz der ATPase8 wurde aus diesem Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SacI* herausgeschnitten und in den mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *SacI* linearisierten Vektor pGEM3 kloniert.

pMP4 (pEH1-Met-His₆-YidC²⁻²⁶³-TEV-Oxa1^{Sc43-402})

Die kodierende DNS-Sequenz des maturen Oxa1 wurde mit den Primern MP26 und MP27 aus genomischer Hefe-DNS amplifiziert und über die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SmaI* in den Vektor pEH1 [108] kloniert. Der Primer MP26 enthielt neben der *XbaI*-Schnittstelle vor der *OXAI*-Sequenz eine *KpnI*-Schnittstelle. Das resultierende Zwischenprodukt wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *KpnI* linearisiert und mit der für den N-Terminus von YidC kodierenden DNS-Sequenz (Aminosäuren 2-263) ligiert. Die YidC-Sequenz war hierfür mit den Primern MP24 und MP25 aus *E. coli* amplifiziert worden. Der Primer MP24 enthielt unterhalb der *NcoI*-Schnittstelle die kodierende Sequenz für 6 N-terminale Histidine.

MP24 5'-GGG GCC ATG GCC CAT CAC CAT CAC CAT CAT GAT TCG CAA CGC
AAT-3'

MP25 5'-GGG GGT ACC AGA GAT GTT CAG GTT TTC GTT-3'

MP26 5'-GGG T CTA GAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGT ACC GAG AAT TTG
TAT TTT CAG-3'

MP27 5'-CCC CCC GGG TCA TTT TTT GTT ATT AAT GAA-3'

pMP5 (pGEM4-Oxa1^{Sc 43-149})

Das Fragment von Nukleotid 127 bis 428 der kodierenden Sequenz des *OXAI*-Gens wurde mit den Primern MP1 und MP2 von dem Plasmid pOxa1p amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor pGEM4 kloniert. Der 3'Primer enthielt außerdem die kodierende Sequenz für 3 Methionine und 3 Lysine vor dem Stopcodon.

MP1 5'-GGG GAA TTC ATG AAT TCG ACG GGC CCA AAT-3'

MP2 5'-GGG GGA TCC TCA TTT TTT TTT CAT CAT CAT CTT GAC ATA GAG GGG
AAA

pMP6 (pGEM4-CoxII^{Nc 1-77})

Das Fragment von Nukleotid 1 bis 231 der kodierenden Sequenz des *COXII*-Gens wurde mit den Primern MP3 und MP4 von dem Plasmid pSu9-CoxII-DHFR amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor pGEM4 kloniert. Der 3'Primer enthielt außerdem die kodierende Sequenz für 3 Methionine und 3 Lysine vor dem Stopcodon.

MP3 5'-GGG GAA TTC ATG GGA TTA TTA TTT AAT AAT TTA-3'

MP4 5'-GGG GGA TCC TCA TTT TTT TTT CAT CAT CAT ACC GTG ATT TAA ATA
TTT ATG TG-3'

pMP7 (pGEM4-Oxa1^{Sc 43-200})

Das Fragment von Nukleotid 127 bis 600 der kodierenden Sequenz des *OXAI*-Gens wurde mit den Primern MP34 und MP35 von dem Plasmid pOxa1p amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *BamHI* und *HindIII* in den Vektor pGEM4 kloniert. Der 5'Primer enthielt außerdem die kodierende Sequenz für 3 Methionine vor dem Start ATG.

MP34 5'-GGG GGA TCC GCC ATG ATG ATG ATG AAT TCG ACG GGC CCA AAT
GCC-3'

MP35 5'- CCC AAG CTT TCA CCA TCT GTT CTT AAT GCC GTG CGA GGA GAG-3'

pMP8 (pRS426-Oxa1¹⁻¹¹⁹-YidC³⁴⁶⁻⁵⁴⁰)

Die kodierende Sequenz für den N-terminus von Oxa1 (AS 1-119) einschließlich Promotors wurde mit den Primern GS01 und GS02 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *XhoI* und *NotI* in den Vektor pRS426 kloniert. Die kodierende Sequenz für den C-terminalen Teil von YidC (AS 346-540) wurden mit den Primern GS03 und GS04 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *NotI* und *SacI* in den das n-terminale Fragment von Oxa1 enthaltenen Vektor pRS426 kloniert.

GS01 5'-GGG CTC GAG GCA TCG GAC ATT TTC CCG-3'

GS02 5'-GGG CGC GGC CGC CTC CAA GAC CTG TTG-3'

GS03 5'-GGG GCG GCC GCA TGG ATC CAT AGC TTT GTG-3'

GS04 5'-GGG GAG CTC CTG ACC GCC CTT ATT TTA GCG-3'

pMP9 (pRS426-Oxa1¹⁻¹¹⁹-YidC³⁴⁶⁻⁵⁴⁰-Oxa1³¹¹⁻⁴⁰¹)

Die kodierende DNS-Sequenz des Fusionsproteins Oxa1¹⁻¹¹⁹-YidC^{core} wurde mit den Primern GS01 und MP38 vom Plasmid pOxa1¹⁻¹¹⁹-YidC^{core} amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Schnittstellen *XhoI* und *XbaI* in den Vektor pBluescript kloniert (pBS-1). Das Fragment von Nukleotid 931 bis 1209 der kodierenden Sequenz des *OXA1*-Gens wurde mit den Primern MP39 und MP40 von dem Plasmid pOxa1p amplifiziert. Es wurde über die in die Primer eingebauten Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SacI* in den Vektor pBS-1 kloniert (pBS-2). Die kodierende DNS-Sequenz für das komplette Fusionsprotein Oxa1¹⁻¹¹⁹-YidC^{core}-Oxa1³¹¹⁻⁴⁰¹ wurde über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SacI* aus dem Plasmid pBS-2 in das Hefepiasmid pRS426 kloniert.

MP38 5'-5'-CCC TCT AGA GGA TTT TTT CTT CTC GCG GC-3'

MP39 5'-GGG TCT AGA CTA CAG ACA ATG ATT TTG AGA AAC-3'

MP40 5'-CCC GAG CTC TCA TTT TTT GTT ATT AAT GAA-3'

3.2 Genetische Methoden

3.2.1 Verwendete *E. coli* Stämme

In der Regel wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Φ 80 *lacZ* Δ M15 Δ [*lacZYA-argF*] U196 *recA1 endA1 hsdR17 r⁻ m⁺ supE44 thi gyrA relA1*) oder XL1blue (*endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44, thi-1, λ^- , recA1, gyrA96, relA1, Δ (*lacZYA-argF*) U169 [F⁺: *proAB, lacI^qZ* Δ M15, Tn10(Tet^r)]]) zur Transformation mit rekombinanten Abkömmlingen der Plasmide pGEM3 und pGEM4 verwendet.*

3.2.2 Verwendete Hefestämme

In Tabelle 3-2 sind alle verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* mit ihren Genotypen aufgelistet.

Tabelle 3-2 Verwendete Hefestämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
YPH499 [109]	<i>a ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
W303 [110]	<i>a/α ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1</i>
<i>Δoxa1</i> [48]	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 oxa1::HIS3</i>
<i>oxa1-ts</i> [111]	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 oxa1-1</i>
<i>Δmba1</i> [111]	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 mba1::HIS3</i>
<i>Δimpl</i> [112]	<i>α leu2-1 trp1-1 pet2858::LEU2</i>

3.2.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefekulturen erfolgte bei 30°C in Lactatmedium, Selektivmedium oder in YPD-Medium. Hefen aus Glycerol-Stammkulturen wurden auf einer YPD-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurde von dieser Platte 20 ml Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Enthielten die Hefen Plasmide, wurden die Zellen von der YPD-Platte auf eine entsprechende Selektivmediumsplatte überimpft, weitere 2-3 Tage bei 30°C inkubiert und dann 20 ml Selektivmedium angeimpft. Die Kultur wurde durch Passagieren für mindestens zwei Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 1,2 bis 1,8 geerntet.

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

3.2.4 Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNS

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert und die Kultur am nächsten Morgen auf eine OD_{578} von ungefähr 0,1 verdünnt (50 ml Kulturvolumen). Die Zellen wurden bis zu einer OD_{578} von 0,5 inkubiert und in einen sterilen 50 ml-Greiner-Röhrchen bei 1000 g sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml 100 mM Lithiumacetat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 400 μ l 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50 μ l aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden nicht eingefroren, sondern sofort transformiert.

DNS (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelagert. Ein 50 μ l-Aliquot kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Folgende Lösungen wurden in dieser Reihenfolge auf das Zellsediment gegeben: 240 μ l PEG 3350 (50% (v/v)), 36 μ l 1 M Lithiumacetat, 25 μ l einzelsträngige Lachsspermien-DNS (2 mg/ml), 50 μ l steriles Wasser, in dem 0,1-10 μ g der zu transformierenden DNS gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Darauf folgte eine 20minütige Inkubation bei 42°C. Dann wurden die Hefezellen 15 s bei 6000 bis 8000 rpm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf den entsprechenden SC-Platten.

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

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

3.2.6 Verwendete *Neurospora crassa* Stämme

In Tabelle 3-3 sind alle verwendeten Stämme von *N. crassa* aufgelistet.

Tabelle 3-3 Verwendete *Neurospora crassa*-Stämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
HV	<i>a cyh-2 lys-2 leu-5 mei-2</i>
K5-15-23-1	<i>a cyh-2 lys-2 leu-5 mei-2 oxal^{RIP}</i> <i>oxal^{RIP}</i> (EC); enthält eine ectotopische Version des <i>oxal</i> -Gens welches für ein funktionelles Oxa1p mit einem c-terminalen Hexahistidin-Tag codiert

3.2.7 Anzucht von *Neurospora crassa*

Jeder *N. crassa*-Stamm wurde zuerst in Vollmediumskulturkolben angezogen. Dazu wurde 1 ml aus einer *N. crassa*-Dauerkultur in einen Vollmediumskolben gegeben und dieser 3-4 Tage in völliger Dunkelheit bei 30°C inkubiert und dann für weitere 7 Tage bei RT im Licht stehen gelassen wobei *N. crassa* Konidien bildet. Mit diesem Kolben (A-Kolben) wurden weitere Vollmediumskolben (B-Kolben) angeimpft, wobei mit einer Impföse etwas Mycel in einen neuen Kolben gebracht und die daran haftenden Konidien über den Agar verteilt wurden. Mit einem A-Kolben konnten 60-80 B-Kolben angeimpft werden. Diese wurden ebenfalls 3-4 Tage bei Dunkelheit und 7 Tage am Licht inkubiert. Das Ernten der Konidien erfolgte durch Zugabe von 10-15 ml sterilem Wasser in einen bewachsenen Kolben und vortexen für 30 s. Die so erhaltene Konidien suspension wurde zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Kulturen bis zu 8 l wurden mit einem B-Kolben pro l angeimpft. Kulturen von 100-120 l wurden mit der Suspension von 20 B-Kolben inokuliert.

Die Kulturen wurden 16-20 h bei 25°C unter guter Belüftung inkubiert und anschließend die Hüfen mittels Filtration abgetrennt.

Um *N. crassa*-Dauerkulturen anzulegen wurden die Konidien von einem A-Kolben geerntet, je 0,5 ml Konidien suspension mit 1 ml 87% sterilem Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Elektrophoretische Methoden

3.3.1.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine mit einem Molekulargewicht über 15 kDa wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt [113]. Hierfür wurden Glasplatten von 160×180 mm und Abstandhalter von 1 mm Dicke verwendet. Zum Gießen wurde das Gel mit einer 2%igen Agarlösung in Laufpuffer abgedichtet. Die Konzentration von Acrylamid variierte zwischen 12 und 18% und die Konzentration an Bisacrylamid zwischen 0,08% - 0,13%. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2-3 h. Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

Trennlösung: 12-18% Acrylamid; 0,08-0,13% Bisacrylamid; 375 mM Tris HCl pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)

Sammellösung: 5% Acrylamid; 0,03% Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,1 % TEMED)

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1 % SDS

3.3.1.2 Harnstoff-Gelelektrophorese

Eine bessere Auflösung von kleineren Proteinen (unter 15 kDa) wurde durch die Harnstoff-Gelelektrophorese erreicht. Dabei wurde das gleiche Gelsystem wie unter 3.3.1.1 verwendet. Alle Gellösungen wurden vor dem Polymerisieren über einen Faltenfilter filtriert.

Trennlösung: 18% Acrylamid; 0,25% Bisacrylamid; 33% Harnstoff; 0,1% SDS; 700 mM Tris/HCl pH 8,8 (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,05 % TEMED)

Sammellösung: 5% Acrylamid; 0,06% Bisacrylamid; 33% Harnstoff; 0,1% SDS; 120 mM Tris/HCl pH 6,8 (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,05 % TEMED)

Laufpuffer: 50 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% SDS

3.3.1.3 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel mindestens 20 min in Färbelösung (30% Methanol, 10% Eisessig, 0,1% Coomassie-Blau) geschwenkt, anschließend mit Wasser gespült und in 30% Methanol, 10% Eisessig entfärbt.

Das Gel wurde zwischen zwei befeuchtete Zellophanfolien gespannt und bei RT getrocknet.

3.3.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Halbtrocken-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert [114, 115]. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je zwei Whatman-Papieren in eine Blotkammer geklemmt wurden. Gel, Nitrozellulose-Membran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h zwischen zwei 15×15 cm große Graphitelektroden bei 200 mA. Die Proteine wurden durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau-Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser sichtbar gemacht.

Blotpuffer: 0,02% SDS; 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% Methanol

Ponceau-Lösung: 0,2% Ponceau in 3% TCA

3.3.2 Autoradiographie und Densitometrie

Nitrozellulose-Membranen, auf die radioaktiv markierte Proteine transferiert worden waren, wurden nach Trocknen unter einer Rotlicht-Wärmelampe auf einem Röntgenfilm exponiert. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham Biosciences) eingelesen und ihre Intensität gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm Lab-Scan von Amersham Biosciences.

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

Um ³⁵S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM3, pGEM4 oder pGEM-T klonierte Gene mit Hilfe der SP6- oder T7-RNS-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysate in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert [116].

Zur Transkription wurden 30 µl Premix, 2,5 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G und 15 µl Plasmid-DNS gemischt, auf 200 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RNS-Polymerase (T7 oder SP6, je 25 U/µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNS wurde anschließend durch Zusatz von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol für 15 min bei -20°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes bei RT getrocknet. Die mRNS wurde dann in 30 µl Wasser mit ca. 0,75 U/µl RNasin aufgenommen.

Um *in vitro* Vorstufenproteine zu translatieren, wurden 140 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 µl RNasin, 8 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 16 µl ³⁵S-Methionin und 30 µl RNS gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100000 g (2°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

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

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

3.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford [117] mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers. Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit IgG erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei IgG-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml gemessen.

3.3.5 Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure

Um Protein denaturierend zu fällen, wurde die Proteinlösung auf 12% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, auf das Proteinpräzipitat 1 ml Aceton (auf -20°C gekühlt) gegeben und 1 min kräftig geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min wurde das Aceton verworfen und das Sediment für 5 min bei 37°C getrocknet. Die Proteine wurden durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer und kurzes Aufkochen gelöst.

3.3.6 Reinigung von Oxa1

Die Reinigung des Oxa1 aus *N. crassa* erfolgte durch Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA.

Mitochondrien des *N. crassa*-Stammes K5-15-23-1 wurden in Lysepuffer bei einer Konzentration von 10 mg/ml solubilisiert. Hierzu wurden entweder 1,5 g Mitochondrien mit SM auf 10 mg/ml verdünnt, reisoliert (17000 g, 30 min, 2°C) und in Lysepuffer aufgenommen, oder 1,5 g Mitochondrien in TSS (siehe 3.4.2) auf 10 mg/ml und 1% DDM eingestellt. Die Lyse erfolgte für 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler. Unlösliche

Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation (200000 g, 30 min, 2°C) abgetrennt. Das Lysat wurde entweder über einen Superloop auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (5 ml Bettvolumen, Durchmesser 2,6 cm, ÄKTA-Explorer®-System, 4°C) geladen, oder für zwei Stunden mit 5 ml aequilibrierter Ni-NTA im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert (Batchverfahren). Beim Batchverfahren wurde nach der Bindung die Suspension in eine XK26-Säule gegossen, die Ni-NTA gravitatisch sedimentiert und die Säule in das ÄKTA-Explorer®-System eingebaut. Die Säule wurde mit 5-10 Säulenvolumen gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem Imidazolsprung eluiert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min, und es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Reinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

Lysepuffer:	1% Dodecyl- β -D-maltosid (DDM); 150 mM NaCl; 20 mM Imidazol, pH 9; 20 mM Tris/HCl pH 9; 1 mM PMSF
Laufpuffer:	0,1% DDM; 150 mM NaCl; 20 mM Imidazol, pH 9; 20 mM Tris/HCl pH 9; 1 mM PMSF
Elutionspuffer:	0,1% DDM; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazol, pH 9; 20 mM Tris/HCl pH 9; 1 mM PMSF

3.3.7 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen durch Gelfiltration

Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte von Oxa1^{Sc}, Oxa1^{Nc} und Mba1 erfolgte durch Gelfiltration. 1 mg der entsprechenden Mitochondrien wurde zu einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in dem jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden unlösliche Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt (100000 g, 2°C, 30 min). Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte (5 Säulenvolumen des entsprechenden Laufpuffers) Superose6- oder Superose12-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Alle Läufe wurden mit einem ÄKTA®-System bei 4°C und einer Flussrate von 0,3-0,5 ml/min durchgeführt. Die Lauflänge betrug jeweils 1,5 Säulenvolumen. Es wurden Fraktionen zu 250 μ l oder 500 μ l gesammelt und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. Das Molekulargewicht der Proteinkomplexe wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die mit folgenden Proteinen ermittelt worden war: Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Cytochrom *c* (14 kDa).

Die Gelfiltrationen wurden entweder in Digitonin-Puffer, Triton-Puffer oder DDM-Puffer durchgeführt.

Digitonin-Lysepuffer:	1% Digitonin; 150 mM KOAc; 30 mM HEPES pH 7,4; 1 mM PMSF
Digitonin-Laufpuffer:	0,1% Digitonin; 150 mM KOAc; 30 mM HEPES pH 7,4; 1 mM PMSF
Triton-Lysepuffer:	0,2% Triton X-100; 150 mM KOAc; 30 mM HEPES pH 7,4; 1 mM PMSF
Triton-Laufpuffer:	0,2% Triton X-100; 150 mM KOAc; 30 mM HEPES pH 7,4; 1 mM PMSF
DDM-Lysepuffer:	1% DDM; 150 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8; 1 mM PMSF
DDM-Laufpuffer:	0,1% DDM; 150 mM NaCl; 20 mM Tris pH 8; 1 mM PMSF

3.3.8 Rekonstitution der Oxa1-Translokase

Zur Rekonstitution der Oxa1-Translokase wurde gereinigtes Oxa1 mit solubilisierten *E. coli*-Lipiden inkubiert und die Vesikelbildung induziert. Die gebildeten Vesikel wurden bei 186000 g isoliert und für Insertionsexperimente verwendet.

3.3.8.1 Herstellung der Oxa1-Proteoliposome

100 mg *E. coli*-Lipide in Chloroform wurden unter Vakuum im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml Puffer A resuspendiert. Die trübe Lösung wurde 3× 1 min auf Eis mit Ultraschall behandelt (20% Output, Constant Duty Cycle). Die Lipidsuspension wurde durch Zugabe von 5 ml Puffer B auf 10 mg/ml Lipid und 0,5% Triton X-100 eingestellt und bei 4°C gelagert. Die Lipidlösung war eine Woche haltbar.

500 µl Lipidlösung wurde mit 200-500 µl einer Elutionsfraktion (3.3.6) gemischt und mit Puffer A auf 1 ml aufgefüllt. Der Kontrollansatz enthielt anstelle der Elutionsfraktion das gleiche Volumen Elutionspuffer (3.3.6). Der Ansatz wurde für 30 min bei 4°C gerührt. Anschließend wurden ~5 mg BioBeads[®] zugegeben und für eine Stunde bei 4°C gerührt. Hierbei adsorbieren die Detergenzien an die BioBeads[®] und die Formation von Lipidvesikeln wird eingeleitet. Es wurde noch 2× je 5 mg BioBeads[®] zugegeben und für je 60 min unter Rühren bei 4°C inkubiert. Die BioBeads[®] wurden sedimentiert (1 g, 1 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die Beads wurden mit Puffer A gewaschen, die Lösungen vereinigt und zu gleichen Teilen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Vesikel wurden sedimentiert (186000 g, 1 h, 2°C) und die eine Hälfte der Vesikel in 200 µl Puffer A, die andere Hälfte in 200 µl Puffer C resuspendiert. Die Suspensionen wurden direkt für Insertionsexperimente (3.3.8.2) verwendet.

Puffer A:	20 mM Hepes/NaOH pH 7,4; 100 mM NaCl
Puffer B:	20 mM Hepes/NaOH pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% Triton X-100
Puffer C:	20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 100 mM KCl

3.3.8.2 Insertionsexperimente mit rekonstituiertem Oxal

Die Proteoliposomen und Lipidvesikel (3.3.8.1) wurden mit je 5 µl radioaktiv markiertem Vorläuferprotein (3.3.3) für 5 min bei 25°C inkubiert. Die Ansätze wurden geteilt und mit 400 µl Puffer A bzw. Puffer C auf 500 µl aufgefüllt. Durch Zusatz von 1,5 µl 10 µM Valinomycin zu allen Proben wurde ein Kaliumdiffusionspotential über die Vesikelmembran in den in Puffer C resuspendierten Vesikeln generiert. Die Proben wurden weitere 20 min bei 25°C inkubiert. Die Insertion wurde auf Eis gestoppt. Die Insertion des radioaktiven Substratproteins wurde entweder durch Carbonatextraktion und Flotation (3.4.4) oder durch Proteasebehandlung analysiert. Zur Proteasebehandlung wurde die eine Hälfte der Reaktionsansätze mit 5 µl 0,1 µg/ml Proteinase K versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde entweder durch Zugabe von TCA (3.3.5) gestoppt und die Proteine gefällt, oder die Proteasebehandlung wurde durch 1 mM PMSF gestoppt und die Vesikel sedimentiert (186000 g, 2°C, 1 h) und in SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte üblicherweise mittels Harnstoff-Gelelektrophorese (3.3.1.2), Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (3.3.1.4) und Autoradiographie (3.3.2).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode [118]. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2800 g, 5 min, RT), mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 30°C in 2 ml/g Feuchtwicht Puffer 1 für 10 min geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (2000 g, 5 min, 4°C), mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und in 6,7 ml/g Feuchtwicht Zymolyasepuffer für 30 bis 60 min bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 1100 g (4°C) geerntet und pro g Feuchtwicht in 6,7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen durch 10 Stöße aufgebrochen. Der Zellaufschluss wurde mit der gleichen Menge an Homogenisierungspuffer versetzt und Zelltrümmer, Kerne und noch intakte Zellen bei 2000 g (5 min) abgetrennt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor die Mitochondrien bei 17000 g (4°C) für 15 min abgetrennt wurden. Das Mitochondriensediment wurde in 10 ml SEH resuspendiert und für 5 min bei 2000 g

zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation des Überstandes für 12 min bei 17000 g (4°C) sedimentiert und in 0,5-1,5 ml SEH aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit SEH auf 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Puffer 1:	100 mM Tris (pH-Wert nicht eingestellt); 10 mM DTT
Zymolyasepuffer:	1,2 M Sorbitol; 0,45 mg/ml Zymolyase; 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
Homogenisierungspuffer:	0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 0,2% BSA; 1 mM PMSF; 10 mM Tris/HCl pH 7,4
SEH:	0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 80 mM Hepes/KOH pH 7,4

3.4.2 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Kleinere Mengen von Mitochondrien wurden aus ca. 20 g Hyphen (aus einer 2 l-Kultur) präpariert. Die Hyphen wurden mit 20 g Seesand und 20 ml eiskaltem SEM für ca. 1 min in einem Mörser zerrieben. Nach Zugabe von weiteren 20 ml SEM wurden die Hüfen für 2 min kräftig im Mörser zerrieben. Es wurden nochmals 20 ml SEM zugegeben, die Suspension aufgeschlämmt und die Mitochondrien durch differentielle Sedimentation aus dem Homogenisat isoliert. Sand und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min (4°C) abgetrennt. Dieser Schritt wurde wiederholt bevor die Mitochondrien für 12 min bei 17000 g (4°C) sedimentiert wurden. Das Mitochondriensediment wurde in 20 ml SM resuspendiert, erneut zentrifugiert (12 min, 17000 g, 4°C) und in 1 ml SM aufgenommen. Die Ausbeute betrug etwa 1 mg mitochondriales Protein pro Gramm Hyphen (Feuchtwicht).

Die Präparation größerer Mengen an Mitochondrien erfolgte nach dem gleichen Protokoll, nur wurden die Hüfen nicht per Hand aufgerieben, sondern in einer Zelmühle aufgebrochen. 1 kg Hüfen wurde mit 2 l SEM versetzt und einem Mixer gut durchmischt (3× 30 s). Dieser Suspension wurden 1,5 kg Quarzsand zugesetzt und der Brei 2× durch eine Zelmühle gegeben. Die Mitochondrien wurden aus dem Zellhomogenisat durch Zentrifugation, wie oben beschrieben, isoliert. Wurden die Mitochondrien für die Reinigung des Oxa1-Proteins verwendet, wurde das Mitochondriensediment der letzten Zentrifugation nicht in SM sondern in TSS aufgenommen. Die Ausbeute betrug etwa 2 mg Mitochondrien pro Gramm Hyphen.

SEM:	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2
SM:	250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2
TSS:	20 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,6 M Sorbitol

Alle Puffer enthielten 1 mM PMSF.

3.4.3 Import von Proteinen in Mitochondrien

Der Import von *in vitro* synthetisierten Vorstufenproteinen erfolgte je nach Bedarf in Importpuffer mit oder ohne BSA. Ein typischer Importansatz enthielt 15-50 µg Mitochondrien in einem Endvolumen von 300 µl. Der Import wurde mit 2% (v/v) Lysat gestartet und erfolgte für unterschiedliche Zeiten bei 25°C. Alle Importreaktionen erfolgten in Anwesenheit von 2 mM ATP und NADH. Die Reaktion wurde durch 1:10 Verdünnung in kaltem SH gestoppt. Die Mitochondrien wurden einer Proteasebehandlung unter hypotonischen und isotonischen Bedingungen zur submitochondrialen Lokalisation (3.4.4) unterzogen. Anschließend wurden die Mitochondrien bei 25000 g (4°) sedimentiert, mit SHKCl gewaschen und in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Importpuffer:	[3% BSA (fettsäurefrei)]; 0,5 M Sorbitol; 80 mM KCl; 10 mM Mg-Acetat; 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4; 2,5 mM MnCl ₂
SH:	0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH pH 7,4
SHKCl:	0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 80 mM KCl
SDS-Probenpuffer:	2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 10 % Glycerol; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

3.4.4 Subfraktionierung von Mitochondrien

Zur Erzeugung von Mitoplasten wurde die äußere mitochondriale Membran durch hypotonisches Schwellen geöffnet. Hierzu wurden Mitochondrien in SEH 1:10 in eiskaltem 20 mM Hepes pH 7,4 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurden Mitochondrien 1:10 in eiskaltem SH verdünnt.

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

Um lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Proteinen zu trennen, wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt [41]. Mitochondrien wurden sedimentiert und in einer 0,1 M Na₂CO₃-Lösung zu einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die integralen Membranproteine entweder durch Flotation von den löslichen Proteinen getrennt oder durch eine Zentrifugation (220000 g, 2°C; 30 min) sedimentiert und in SDS-Auftragspuffer gelöst.

Die carbonatextrahierbaren Proteine befanden sich im Überstand. Dieser wurde mit Trichloressigsäure gefällt und das Präzipitat ebenfalls in SDS-Auftragspuffer gelöst.

Zur Flotation wurde der Extraktionsansatz mit 2,4 M Saccharose in 0,1 M Na₂CO₃ auf 1,6 M Saccharose eingestellt und in 650 µl SW60-Zentrifugenröhrchen überführt. Nacheinander wurden Schichten von 1,4 M und 0,25 M Saccharose in 0,1 M Na₂CO₃ aufgebracht. Dieser Stufengradient wurde für 2 Stunden bei 48500 g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wandern Lipide, bzw. Membranen, zur Phasengrenze zwischen 1,4 und 0,25 M Saccharose und ziehen integrale Membranproteine mit nach oben. Lösliche Proteine und Proteinaggregate bleiben am Boden des Gradienten. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient von oben in drei Fraktionen geerntet, wobei immer die jeweilige Phasengrenze mitgenommen wurde. Die Proteine wurden mittels Trichloressigsäure gefällt (3.3.5) und in SDS-Auftragspuffer gelöst.

3.4.5 ³⁵S-Markierung mitochondrialer Translationsprodukte *in vivo*

Zur Analyse der mitochondrialen Proteinsynthese wurden die mitochondrialen Proteine in Hefezellen radioaktiv mit ³⁵S-Methionin markiert.

Hefezellen (OD₅₇₈ 0,5) aus einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden in einer Tischzentrifuge geerntet. Nach Waschen mit Reaktionspuffer (40 mM K₂HPO₄ pH 6,0, 2% Galaktose) wurden die Zellen in 500 µl Reaktionspuffer resuspendiert und für 10 min bei 30°C inkubiert. Cycloheximid (140 µg/ml) wurde anschließend zugefügt, um die cytosolische Proteinsynthese zu inhibieren. Nach 3 min wurde 4 µl ³⁵S-Methionin und 40 µg/ml der 19 anderen proteinogenen Aminosäuren zugesetzt. Es wurde 30 min bei 30°C inkubiert, die Zellen reisoliert und in 0,2% SDS unter kräftigen Mixen mit Glaskugeln lysiert. Der erhaltene Extrakt wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (3.3.1.1), Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (3.3.1.4) und Autoradiographie (3.3.2) analysiert.

3.4.6 Proteintranslation in isolierten Mitochondrien (*in organello*-Translation)

Die Translation der mitochondrial kodierten Proteine wurde in isolierten Mitochondrien oder Mitoplasten durchgeführt. [42]Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 40 µl 1,5×Translationspuffer, 0,6 µl Pyruvatkinase (2 mg/ml), 50 µg Mitochondrien und Wasser in einem Endvolumen von 60 µl. Nach Vorinkubation für 5 min bei 25°C wurden 2 µl ³⁵S-Methionin zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Durch Zugabe von 15 µl 200 mM Methionin und 4 µl Puromycin (1 g/l) wurde die Translation gestoppt. Die Mitochondrien wurden mit 200 µl SEM gewaschen und in 20 µl SDS-Auftragspuffer oder in einem anderen Puffer für weitere Experimente resuspendiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die

Proben 10 min bei 4°C geschüttelt, jedoch nicht gekocht, um die Aggregation sehr hydrophober Proteine zu verhindern.

Wenn die *in organello*-Translation mit Quervernetzungsexperimenten kombiniert wurde, dann wurde der 1,5×Translationspuffer mit Hepes (pH 7,4) anstelle von Tris und ohne BSA angesetzt.

1,5×Translationspuffer: 0,9 M Sorbitol; 225 mM KCl; 22,5mM Kaliumphosphat pH 7,4; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 19 mM MgSO₄; 6 mM ATP; 1,7 mM GTP; 7,5 mM α-Ketoglutarat; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat; 150 μM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin; 4,5 mg/ml BSA (fettsäurefrei)

3.4.7 Quervernetzung radioaktiv markierter Vorstufenproteine mit mitochondrialen Proteinen

Chemische Quervernetzungsreagenzien können benachbarte Proteine kovalent verknüpfen, so dass sie zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Verwendet wurden die Membran-permeablen Quervernetzungsreagenzien 1,5-Difluoro-1,4-dinitrobenzol (DFDNB), Disuccinimidylglutarat (DSG) und Dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP).

In der Regel wurde radioaktiv markiertes Vorstufenprotein für 10 min bei 25°C in Mitochondrien importiert (3.4.3). Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert (17000 g, 15 min, 4°C) und in 400 μl 0,6 M Sorbitol, 2 mM ATP, 2 mM NADH und 20 mM Hepes pH 7,4 in Anwesenheit von 400 μM DSG für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Glycin gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert, mit SHKCl gewaschen und erneut sedimentiert (17000 g, 15 min, 4°C). Anschließend wurden sie entweder direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen oder für eine Immunfällung eingesetzt (3.6.5).

3.4.8 Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte mit mitochondrialen Proteinen

Die Quervernetzung zwischen mitochondrialen Translationsprodukten und mitochondrialen Proteinen wurde während der *in organello*-Translation durchgeführt. Es wurde nach 15 min das Quervernetzungsreagenz (DFDNB oder DSG) zugefügt und für weitere 15-30 min inkubiert. Translation und Quervernetzungsreaktion wurden durch Zusatz von 100 mM Glycin und 200 mM Methionin gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und für eine Immunfällung (3.6.5) eingesetzt.

3.4.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Um Enzymaktivitäten zu messen, wurden Ansätze gewählt, bei denen der Substratumsatz photometrisch verfolgt werden konnte. Für die Messungen wurden Mitochondriensuspensionen in SH zu 10, 1 und 0,1 mg/ml verwendet und bei der Konzentration gemessen, bei welcher die Änderung der Absorption mit der Zeit linear verläuft.

3.4.9.1 Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-Oxidase

Bei der Messung der Cytochrom-Oxidase-Aktivität wurde die Oxidation von Cytochrom *c* bei 550 nm verfolgt. Eine 1%ige Cytochrom *c*-Lösung (in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) wurde mit Natriumdithionit vollständig reduziert, was an einer Farbänderung der Lösung von orange-rot nach pink zu beobachten war.

920 μ l Phosphatpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) und 80 μ l der reduzierten Cytochrom *c*-Lösung wurde in einer 1 ml Küvette gemischt und mit 1 μ l Mitochondrienlösung versetzt. Aufgrund des osmotischen Schocks platzten die Mitochondrien auf, wodurch die Enzymkomplexe in der inneren Membran zugänglich waren. Die Änderung der Absorption mit der Zeit wurde im Uvikon Spectrophotometer bei 550 nm verfolgt. Als Referenz wurde ein Ansatz ohne Mitochondrien parallel gemessen. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und die spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}^{\text{Cytochrom } c} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mitochondriales Protein}$] berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* beträgt $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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

Bei der Messung der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität wurde die Reduktion von Cytochrom *c* bei 550 nm verfolgt.

920 μ l Phosphatpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 0,1 mM Kaliumcyanid) und 80 μ l 1%ige Cytochrom *c*-Lösung in Phosphatpuffer wurden in einer 1 ml Küvette gemischt und mit 1 μ l Mitochondriensuspension und 10 μ l 100 mM NADH in Phosphatpuffer versetzt. Die Änderung der Absorption mit der Zeit wurde im Uvikon Spectrophotometer bei 550 nm verfolgt. Als Referenz wurde ein Ansatz ohne Mitochondrien und NADH parallel gemessen. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und die Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}^{\text{Cytochrom } c} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ mitochondriales Protein}$] berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* beträgt $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.9.3 Bestimmung der Aktivität der F₁F₀-ATPase

Die Messung der Aktivität der F₁F₀-ATPase erfolgte nach modifizierten Protokollen von R.H. Law [119] und P.A. Lanzetta [120]. Dazu wird die Hydrolyse von ATP zu ADP anhand des freigesetzten Phosphates bestimmt. Phosphat kann durch die Bildung eines Komplexes mit Ammoniumheptamolybdat nachgewiesen werden, welcher in der Lage ist, Malachitgrün zu oxidieren. Dies wird photometrisch bei 640 nm verfolgt. Um die Integrität des F₁F₀-ATPase-Komplexes zu testen, wird die Messung in An- und Abwesenheit von Oligomycin durchgeführt. Nur der intakte F₁F₀-ATPase-Komplex ist durch Oligomycin hemmbar, nicht aber der F₁-Sektor oder andere mitochondrialen ATPasen.

Es wurden 10, 50 und 100 µg Mitochondrien sedimentiert und in 475 µl Testpuffer resuspendiert. Es wurden entweder 6 µl Oligomycin-Stammlösung oder 6 µl Ethanol zugesetzt und für 3 min bei 30°C inkubiert. Die Hydrolysereaktion wurde durch Zugabe von 6,5 µl 200 mM ATP (pH 7,4) gestartet. Alle 10 s wurden 50 µl Probe entnommen, sofort mit 800 µl Färbereagenz versetzt und nach 2 min 100 µl Zitronensäure-Stammlösung zugegeben. Die Ansätze wurden bei RT für weitere 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 640 nm gegen 800 µl Farbreagenz mit 100 µl Zitronensäurestammlösung gemessen. Die Phosphatkonzentration wurde anhand einer Eichkurve von 0-15 µM Kaliumphosphat pH 7,4 bestimmt und die ATPase-Aktivität ermittelt. Das Verhältnis der ATPase-Aktivität mit Oligomycin zu der ohne ergab die oligomycinsensitive ATPase-Aktivität.

Testpuffer: 0,2 M KCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,2; 2 mM MgCl₂.

Oligomycin-Stammlösung: 1 mg/ml Oligomycin in Ethanol

Zitronensäurestammlösung: 34% in Wasser

Farbreagenz:
a: 340 mg Malachitgrün in 75 ml Wasser
b: 10,5 g Ammoniumheptamolybdat in 250 ml 4 M HCl
Beide Lösungen wurden gemischt, auf 1 l aufgefüllt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde filtriert und direkt vor der Messung 50 ml Farbreagenz mit 250 µl 20%igem Triton X-100 versetzt.

3.5 Elektrophysiologische Methoden

3.5.1 Apparativer Aufbau

Die Leitfähigkeit der Oxal-Komplexe wurde in einer selbst angefertigten so genannten *Black-Lipid-Membrane* Apparatur bestimmt. Als Messzelle diente eine Teflonkammer, die durch eine Zwischenwand in zwei Reservoirs geteilt war. Die beiden

Reservoirs waren durch ein Loch von 0,5 mm Durchmesser verbunden. Beide Reservoirs wurden mit ungepuffertem 1 M KCl befüllt. Über 2 Ag,AgCl/3 M KCl-Elektroden konnte eine Gleichspannung von bis zu 500 mV angelegt und ein Stromfuß abgeleitet werden. Mittels eines Strom/Spannungsverstärkers wurden die Ströme um den Faktor 10^9 V/A verstärkt und über ein Oszilloskop und einen Einkanalschreiber aufgezeichnet.

3.5.2 Erzeugung künstlicher Lipid-Doppelschichten

Unter Verwendung von in n-Dekan und Butanol gelösten synthetischen Phospholipiden wurden künstliche Lipiddoppelmembranen hergestellt (so genannte „Schwarze Membranen“). Dazu wurde die Öffnung in der Messzelle mit 5 μ l einer 1%igen Lösung von Diphytanoyl-Phosphatidylcholine (DPPC) in Chloroform/Methanol (1:1) beschichtet. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurde die Kammer mit Messpuffer befüllt. Mittels einer Teflonöse, die mit 5 μ l einer 1 % DPPC Lösung in n-Dekan/Butanol (9:1) beschichtet war, wurde eine Lipidmembran über die Öffnung gezogen. Die Öffnung wurde mit einer Vergrößerungsoptik beobachtet und mit einer Lampe beleuchtet. Das Verschwinden der Newtonschen Ringe (Regenbogenfarben auf der Membran) zeigte an, dass sich eine Lipiddoppelmembran gebildet hatte („Schwarze Membran“).

3.5.3 Messung der Ionenleitfähigkeit des Oxa1-Komplexes

Die Insertion von Oxa1-Komplexen in die Membran wurden durch Anlegen einer Spannung induziert. Dazu wurde gereinigtes Oxa1-Protein auf beiden Seiten in die Messzelle pipettiert und eine Spannung von 20-120 mV angelegt. Insertionsereignisse wurden durch Flickern oder Erhöhung der Leitfähigkeit über die Membran angezeigt.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Zur Erzeugung spezifischer Antiseren wurden entweder chemisch synthetisierte Oligopeptide eingesetzt oder Proteinfragmente in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die gereinigten Fraktionen wurden direkt als Antigene eingesetzt, wohingegen die Oligopeptide zuerst an *Keyhole Limpet Hemocyanin* gekoppelt wurden. Die Kopplung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die über eine PD-10 Säule entsalzten Fraktionen wurden in 10 Aliquots aufgeteilt und weggefroren.

Für die Erstinjektion wurden 200 μ g Protein in einem Gesamtvolumen von 250 μ l 1:1 mit TiterMax™ versetzt und 3 min auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Die Emulsion wurde

in 3 Portionen subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax inkomplettes Freundsches Adjuvans verwendet wurde. 10 Tage nach jeder Injektion, außer der ersten, wurde dem Kaninchen 10-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation gewonnen (5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 20000 g). Anschließend wurde das Antiserum zur Inaktivierung des Komplementsystems für 20 min auf 56 °C erhitzt und bei -20°C gelagert.

3.6.2 Verwendete Antikörper

Alle gegen Proteine von *S. cerevisiae* und *N. crassa* verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der His₆-Antikörper wurde von Quiagen bezogen. In Tabelle 3-4 sind alle in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgelistet. Die Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

Tabelle 3-4 Verwendete Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Beschreibung</i>
α -His ₆	monoklonaler Mausantikörper gegen Hexahistidinrest
α -Oxa1 ^{Nc} [121]	gegen GST-Oxa1 ^{Nc 345-462}
α -Oxa1 ^{Sc} [88]	gegen CDNEKKJQESFKEKR gekoppelt an Ovalbumin (entspricht Oxa1 ^{Sc 371-384})
α -Mba1[111]	gegen CEDDAKVAIHRMK gekoppelt an KLH (entspricht Mba1 ²⁵⁹⁻²⁷¹)
α -Cox2	gegen gereinigtes Cox2-Protein aus Hefe
α -Cytb ₂	gegen rekombinantes Cytochrom b ₂
α -Cox20[103]	gegen <i>trpE</i> -Cox20p
α -Tom70	gegen His ₆ -Tom70 ⁴⁰⁻⁶¹⁷
α -Tim44	gegen Tim44 ⁶⁸⁻³⁴⁵ -his ₆
α -AAC	gegen gereinigtes AACp aus <i>Neurospora</i>

3.6.3 Reinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum gereinigt. Zuerst wurde das Antigen an CNBR-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials

wurden 0,24 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 10 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert und 3× in je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. 1,5 mg des gereinigten Proteins oder des Oligopeptides in 3 ml Kopplungspuffer wurden mit dem aktivierten Säulenmaterial versetzt und für 1,5 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Säulenmaterial wurde 3× mit je 3 ml Waschpuffer 1 gewaschen, die Sepharose in 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Die Suspension wurde in eine Säule mit Fritte gegeben und abwechselnd mit 3× Waschpuffer 2 und Waschpuffer 3 gewaschen bevor die Säule in 100 mM Tris pH 8 mit 10 mM Natriumazid gelagert wurde (4°C).

Um Antikörper an die Säule zu binden wurde die Säule mit 10 ml 20 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Zu 4 ml Serum wurden 16 ml 20 mM Tris pH 7,5 gegeben, die Lösung auf 1 mM PMSF eingestellt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 20 ml 500 mM Natriumchlorid, 10 mM mM Tris pH 7,5 gewaschen.

Die Elution erfolgte mit 10 ml 100 mM Citrat pH 4; 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 ml 10 mM Tris pH 8,8 (wurde verworfen) und 10 ml Natriumphosphat pH 11,5. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Anwesenheit von Antikörpern wurde durch Bradford-Reagenz getestet und die positiven Fraktionen im Westernblot auf ihre Funktionalität überprüft.

Kopplungspuffer:	0,25% SDS; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3
Waschpuffer 1:	500 mM NaCl; 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3
Waschpuffer 2:	500 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat pH 4
Waschpuffer 3	500 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 8

3.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Immundekoration mit Antiserum oder gereinigtem Antikörper (in 5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS) für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Antiseren wurden in Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 und affinitätsgereingte Antikörper in Verdünnungen von 1:100 bis 1:500 eingesetzt. Nach Dekoration mit dem ersten Antikörper wurde die Membran gewaschen (1× 10 min in TBS, 0,05% Triton X-100; 2× 10 min in TBS)

und mit einem Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:20000 in 5% Milchpulver). Die Membran wurde erneut gewaschen (1×10 min in TBS, 0,05% Triton X-100; 2×10 min in TBS) und für 2 min mit Luminol-Reagenz durchtränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulose zwischen 2 Folien gelegt und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilme exponiert.

Luminol-Reagenz: 1,1 mM Luminol; 0,2 mM Cumarinsäure; 0,25 mM H_2O_2 ; 100 mM Tris/HCl pH 8,5

3.6.5 Immunpräzipitations-Experimente

50-150 μ g Mitochondrien wurden in 20 μ l SDS-Puffer resuspendiert, 5 min bei RT geschüttelt und anschließend 30 s auf 95°C erhitzt. Das Solubilisat wurde sofort 1:16 bzw. 1:20 in LP verdünnt und zentrifugiert (35000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde mit LP-gewaschener Protein A Sepharose und 5 μ l Antiserum versetzt und 2-3 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Matrix $2 \times$ mit LP und $1 \times$ mit 10 mM Tris pH 7,4 gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch 15 min schütteln bei 4°C in 30 μ l SDS-Auftragspuffer. Die Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese (3.3.1.1), Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen (3.3.1.4) und Autoradiographie (3.3.2) analysiert.

SDS-Puffer: 1% SDS; 100 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM PMSF

LP: 1 % Triton X-100; 300 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,4

3.7 Puffer und Medien

Lactat-Medium: 3 g/l Hefeextrakt; 1 g/l Galactose; 1 g/l K_2HPO_4 ; 1 g/l NH_4Cl ; 0,5 g/l $CaCl_2$; 0,5 g/l NaCl; 0,6 g/l $MgSO_4$; 0,3 ml/l $FeCl_3$ (1%); 2% Lactat, pH 5,5 mit KOH

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

LB^{Amp}-Medium: LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin

LB-Platten: LB-Medium mit 1,5% Agar

LB^{Amp}-Platten: LB^{Amp}-Medium mit 1,5% Agar

PBS: 16 mM Na_2HPO_4 ; 4 mM KH_2PO_4 ; 115 mM NaCl

SEH: 0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 80 mM Hepes/KOH pH 7,4

Selektivmedium: 0,17 % Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren; 0,5 % $(NH_4)_2SO_4$; 2% Glucose, 2% Galactose oder 2% Lactat; nach

	dem Autoklavieren wurden noch die entsprechenden Marker zugesetzt. (20 mg/ml Adenin, 20 mg/ml Uracil, 20 mg/ml Tryptophan, 20 mg/ml Histidin, 30 mg/ml Leucin, 30 mg/ml Lysin).
Selektivplatten:	Selektivmedium mit 2% Agar
SOB-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl; 0,19 g/l KCl
SOC-Medium:	SOB-Medium auf 20 mM Glucose und 10 mM Magnesiumchlorid eingestellt
TBS-Puffer:	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
YP-Medium:	1% Hefeextrakt; 2% Bacto-Pepton; pH 5,5 mit HCl
YP-Platten:	2% Hefeextrakt; 4% Bacto-Pepton; pH 5,5 mit HCl; 2% Agar
YPD-Medium:	YP-Medium mit 2% Glucose
YPGal-Medium:	YP-Medium mit 2% Galactose
YPG-Medium:	YP-Medium mit 2% Glycerol
YPD-Platten:	YP-Platten mit 2% Glucose
YPGal-Platten:	YP-Platten mit 2% Galactose
YPG-Platten:	YP-Platten mit 2% Glycerol

3.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Avanti Polar Lipids, Inc,	Lipide: <i>E. coli</i> -Total Extract, <i>E. coli</i> -Polar Extract,
Alabaster, USA:	Diphytanoyl-Phosphatidycholin
BioRad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege), Bio-Beads [®] -SM-2,
Biozym, Hameln:	SP6 Polymerase
Calbiochem (Merck, Darmstadt):	Digitonin
CyrRX, Norcross, USA:	TiterMax [™]
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base (without amino acids)

Finnzyme, Espoo Finnland:	<i>Taq</i> -DNS-Polymerase mit Puffer (DyNAzyme II aus <i>Thermus brockianus</i> , rekombinant)
Fluka, Buchs, CH:	Trichloressigsäure
Genomed, Bad Oeyenhausen:	„Jetstar“-Kit
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin
GIBCO-BRL, Karlsruhe:	Agarose (ultra pure, low endoosmosis)
ICN, Costa Mesa, USA:	³⁵ S-Methionin
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Nestle-Alete, München:	Magermilchpulver
New England Biolabs, Schwalbach:	Restriktionsenzyme, T4-Ligase,
Novagen (Merck, Darmstadt):	pYX-Hefektoren
Pierce, Rochester, USA:	Quervernetzungsreagenzien
Pharmacia Biosciences, Freiburg:	7-Methyl-Guanosintriphosphat (7mGpppG), CNBr-aktivierte Sepharose, Protein A-Sepharose
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kannedchen-Reticulocytenlysat, pGEM-Vektoren, TNT®-Lysat
Quiagen, Hilden:	Kit QIAquick, Ni-NTA-Agarose
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat
Roche:	NTP, NADH, Proteinase K, DTT, Lysozym, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, dNTP, Oligomycin, Restriktionsenzyme, Tris
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembran (0,2 mm), Faltenfilter, Filterpapier, Whatman-3MM-Filterpapier
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Siliconlösung, Spermidin, TEMED
Sigma ARK, Darmstadt:	Oligonukleotide
Sigma, München:	Ammoniumperoxodisulfat (APS), BSA (fettsäurefrei), Glycerol, β -Mercaptoethanol, Molekulargewichtstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A

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

3.9 Geräte

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Entwicklermaschine Cumix 60
Amersham Biosciences, Freiburg:	Spannungsgeräte, Densitometer, Chromatographiesysteme wie Äkta Explorer® mit dazugehörigen Chromatographie-Säulen
Appligene, Heidelberg:	Agarosegel-Imaging-System „The Imager™“
Beckman Instruments, München:	Kühlzentrifugen J2-21 und Avanti J-25, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich Rotoren und Zentrifugenröhrchen
Bender und Hobein, München:	Mixer zum Vortexen
Biometra, Göttingen:	TRIO-Thermoblock
BioRad, München:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler
Eppendorf, Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße
Fuji:	Röntgenfilme, Phospho-Imager BAS-1500
Genser, Rothenburg:	Geltrockner Jet1
Heraeus Christ, Osterode:	Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge
Ika, Staufen:	Magnetrührer
JY HORIBA, Longjumeau, Frankreich:	Fluoreszenzphotometer SPEX FluoroMax
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada:	DNAMAN 4.1 (Molekularbiologische Software)
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
MWG-Biotech Ag, Ebersberg:	Primus 25 Personal Thermal Cycler System für PCR
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Semi-Dry-Blotkammern
Schütt, Göttingen:	"Bioclav"-Autoklav
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-240 und UV-120-02
Sigma, München:	Tisch-Kühlzentrifugen

Werkstatt des Instituts, München: Semidry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern,
Überkopf-Schüttler, Neurospora-Mühlen

4 Ergebnisse

4.1 Mba1, eine neue Komponente der mitochondrialen Exportmaschinerie

Eine Zahl von mitochondrialen Innenmembranproteinen nimmt in der Membran eine Orientierung ein, in welcher der N-Terminus des Proteins in den Intermembranraum reicht. Viele Proteine erreichen diese Topologie durch einen Sortierungsprozess, bei welchem der N-Terminus membranpotentialabhängig über die Innenmembran in den Intermembranraum exportiert wird. Das Innenmembranprotein Oxa1 spielt eine wichtige Rolle in diesem Exportprozess. Oxa1 ist in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien konserviert und scheint in allen diesen Systemen die Proteininsertion zu vermitteln [66, 68, 76, 83]. Oxa1 interagiert direkt mit Insertionsintermediaten [47-49]. In der Abwesenheit von Oxa1 akkumuliert die mitochondrial kodierte Untereinheit 2 der Cytochrom-Oxidase (Cox2) in der Matrix, und seine Intermembranraumdomänen können nicht die Innenmembran überqueren. [46, 48]. Ähnlich verhalten sich konservativ sortierte Proteine, wie die Untereinheit 9 der F_1F_0 -ATPase aus *Neurospora crassa* oder Oxa1 selbst. In *oxa1*-Mutanten zeigen sie einen signifikanten Exportdefekt und verbleiben nach dem Import in der Matrix [48]. Oxa1 ist somit eine Komponente einer generellen Exportmaschinerie in der inneren Membran, die Oxa1-Translokase. Es gibt jedoch einige Hinweise, dass die strikte Abhängigkeit des Exports von Cox2 von Oxa1 eine Ausnahme ist und die meisten Membranproteine auch in Abwesenheit von Oxa1 inserieren können. Durch Wiedereinführung des *OXA1*-Gens in eine *oxa1*-Deletionsmutante, kann der Wildtypzustand wiederhergestellt werden [68]. Wenn eine funktionelle Oxa1-Translokase absolut nötig für die Insertion von Oxa1 in die innere Membran wäre, sollte das synthetisierte Oxa1-Protein in der transformierten Δ *oxa1*-Mutante ausschließlich in der mitochondrialen Matrix akkumulieren und keine funktionelle Translokase bilden. In Δ *oxa1*-Stämmen ist die F_1F_0 -ATPase noch vorhanden, wenn auch in reduzierter Menge [122]. Dieser Proteinkomplex enthält drei mitochondrial kodierte Untereinheiten die offensichtlich ohne Oxa1 inserieren können. Wird die Innenmembranprotease Yme1 deletiert, entsprechen die F_1F_0 -ATPase-Niveaus dem des Wildtyps [122]. Wenn der Proteinabbau reduziert ist haben die Proteine der F_0 -Untereinheit demnach anscheinend genügend Zeit, ihren Weg in die Innenmembran auch ohne Oxa1 zu finden. Mutationen in Cytochrom *c*₁ führen zur Suppression von Oxa1-Mutanten, und ein Oxa1-unabhängiger Weg muss offensichtlich in diesen Mutanten genutzt werden [123]. Diese

Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass es mindestens einen weiteren alternativen Weg für die Insertion von Proteinen in die innere Membran geben muss.

Das Protein Mba1 wurde zusammen mit Oxa1 in einem *multicopy-suppressor-screen* einer $\Delta yta10$ -Mutante identifiziert. Yta10 ist eine Protease der inneren mitochondrialen Membran. Somit könnte es sich bei Mba1 um eine Protease handeln. Da Mba1 in dem Screen zusammen mit der Exportkomponente Oxa1 gefunden wurde, könnte Mba1 aber auch am Proteinexport beteiligt sein. Der Verlust von Mba1 führt zu einem langsamen Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen und einer Reduktion des Cytochrom aa₃-Niveaus [91, 96]. In dieser Arbeit wurden Lokalisation und Funktion von Mba1 näher untersucht.

4.1.1 Mba1 ist ein Innenmembran-assoziiertes Protein der mitochondrialen Matrix

Die intrazelluläre Lokalisation von Mba1 war unbekannt. Für den immunologischen Nachweis von Mba1 wurde ein Antiserum gegen die Aminosäurereste 259-271 des Mba1-Proteins hergestellt. Westernblots mitochondrialer Extrakte zeigten eine spezifische Bande bei 24 kDa, welche in Extrakten der *MBA1*-Disruptionsmutanten nicht vorhanden war (Abbildung 3). Dies entspricht etwa der errechneten molekularen Masse von Mba1 (27,9 kDa). Interessanterweise waren in diesen Mutanten auch nur geringe Mengen der mitochondrial kodierten Untereinheit 2 der Cytochrom-Oxidase nachweisbar (Abbildung 3).

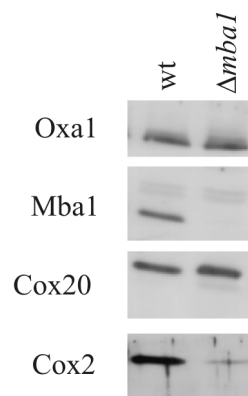


Abbildung 3 Westernblot-Analyse der Mba1-Disruptionsmutante: 50 μ g Mitochondrien der $\Delta mba1$ -Mutante und des Wildtyps (wt) wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antiseren gegen Oxa1, Mba1, Cox20 und Cox2 dekoriert. Oxa1 und Cox20 dienen zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge.

1	<i>MetSerValLeuArgSerThrCysLeuPhePheProProArgSerLeuLeuIleSerPhe</i>
21	<i>AsnLysArgArgLeuPheSerThrSerArgLeuIleLeuAsnLysGluSerGluThrThr</i>
41	<i>LysLysLysAspLysSerLysGlnGlnAspPheAsnProArgHisLeuGlyValAlaAla</i>
61	<i>GluIlePheIleProSerAlaTyrLysAsnLeuProAsnValPheAlaHisProLeuIle</i>
81	<i>ValAlaAsnAlaLeuIleArgArgLeuTyrThrPheGlyLeuAsnSerValGlnValAla</i>
101	<i>LeuPhe</i> <i>ArgPheGlnSerGlyIleLysProSerPheLeuLeuTrpLysAsnLysAlaIle</i>
121	<i>GluThrTyrIleAsnValAsnThrSerPheAlaHisLysAsnLeuSerAspIleLysGly</i>
141	<i>LeuValSerLeuTrpValGlnGluAlaLeuGluAlaArgSerArgGlnLeuProGlyAsn</i>
161	<i>AlaThrLeuAspTrpGlnLeuIleLysPheAsnAlaValProLysLeuValSerValGln</i>
181	<i>ProIleMetIleProGlyMetProLeuGluHisLeuGlnLeuValTyrLysPheAspThr</i>
201	<i>LysGlnArgLeuIleLysValAsnGlnGlnThrLysLysThrGluThrLeuAspArgAsp</i>
221	<i>ValValAspTyrIleAlaPheLeuCysAspAlaThrThrAsnAspMetIleLeuMetGly</i>
241	<i>SerLeuPheGluSerLysProAsnAspLysLeuProLysSerTyrGluAspAspAlaLys</i>
261	<i>ValAlaIleHisArgMetLysValAsnGlyAspIleTyrArgLeuProProSer</i>

Abbildung 4 Proteinsequenz von Mba1: Fett hervorgehoben sind mögliche Transmembrandomänen zwischen den Aminosäureresten 70-86 und 89-102; kursiv gedruckt ist die vorhergesagte N-terminale mitochondriale Präsequenz [124].

Um die mitochondriale Lokalisation von Mba1 zu bestätigen, wurden Importexperimente mit radioaktiv markiertem Mba1 durchgeführt. ³⁵S-Methionin-markiertes Vorstufenprotein (pMba1) wurde während der Inkubation mit isolierten Mitochondrien proteolytisch prozessiert und die reife Form von Mba1 generiert (mMba1) (Abbildung 5, Spuren 2-5). Der Größenunterschied zwischen der Vorläuferform und der reifen Form betrug ca. 5 kDa, was in etwa der vorhergesagten Präsequenz von 3,9 kDa entspricht (Abbildung 4). Die prozessierte Form von Mba1 war resistent gegen die Behandlung mit Proteinase K (PK) von Mitochondrien sowie von Mitoplasten. Wurde das Membranpotential durch Zugabe von Valinomycin zerstört, wurde Mba1 nicht mehr in die Mitochondrien importiert und es blieb zugänglich für zugegebene Protease (Abbildung 5, Spuren 7-10).

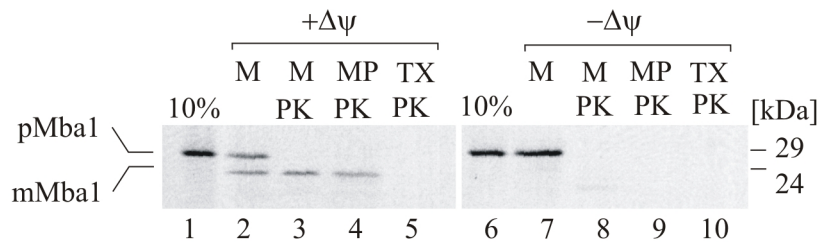


Abbildung 5 Mba1 wird membranpotentialabhängig in Mitochondrien importiert: *In vitro* synthetisiertes Mba1 wurde für 20 min bei 25°C mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und entweder direkt aufgetragen (Spuren 2 und 7), oder mit PK behandelt (Spuren 3 und 8). Die äußere Membran der Mitochondrien wurde durch hypotonisches Schwellen geöffnet und die Mitoplasten mit PK behandelt (Spuren 4 und 9) oder in 1 % Triton X-100 lysiert und PK behandelt (Spuren 5 und 10).

Um die Lokalisation von Mba1 genauer zu bestimmen, wurde eine mitochondriale Subfraktionierung durchgeführt (Abbildung 6). In ganzen Mitochondrien sowie in Mitoplasten war Mba1 für zugegebene PK nicht zugänglich (Abbildung 6, Spuren 2 und 3). Das Außenmembranprotein Tom70 wurde bereits in intakten Mitochondrien und das Intermembranraumprotein Cytochrom b_2 (Cyt b_2) in Mitoplasten durch die zugegebene Protease abgebaut. Nach Lyse der Mitochondrien mit Triton X-100 wurde Mba1 durch zugegebene PK abgebaut (Abbildung 6, Spur 4). Mba1 ist somit entweder ein Protein der mitochondrialen Matrix, oder es werden keine größeren Domänen in den Intermembranraum exportiert. Um zu unterscheiden, ob Mba1 ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix ist oder sich in der Innenmembran befindet, wurden die Mitochondrien beschallt (Abbildung 6, Spuren 5 und 6) bzw. eine alkalische Extraktion (Abbildung 6, Spuren 7 und 8) durchgeführt. Es zeigte sich, dass Mba1 nach dem Beschallen ausschließlich in der Membranfraktion (Abbildung 3, Spur 5) nachgewiesen werden konnte. Auch unter den harscheren Bedingungen der alkalischen Extraktion wurde eine signifikante Menge von Mba1 in der Membranfraktion nachgewiesen (Abbildung 6, Spuren 7 und 8).

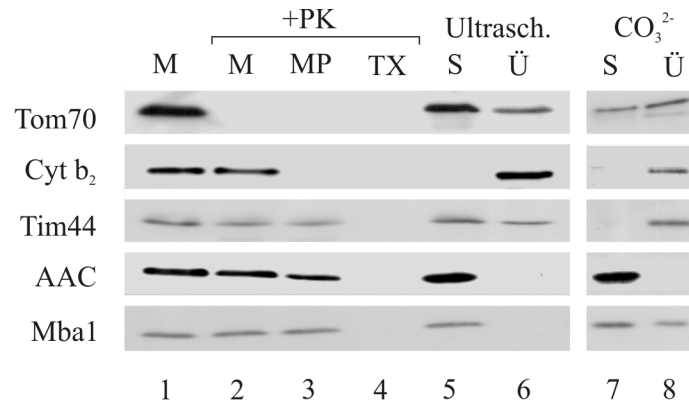


Abbildung 6 Mitochondriale Subfraktionierung von $\Delta mba1$ Mitochondrien: Zur Bestimmung der submitochondrialen Lokalisation von Mba1 wurden Mitochondrien (Spur 2), Mitoplasten (Spur 3) oder ein mitochondrialer TX-100-Extrakt (Spur 4) mit PK behandelt. Membranassoziierte Proteine (Spur 5) wurden durch Beschallen und Ultrazentrifugation von löslichen Proteinen (Spur 6) getrennt. Integrale Membranproteine (Spur 7) wurden durch Carbonatextraktion und Ultrazentrifugation von löslichen Proteinen (Spur 8) getrennt. In Spur 1 wurden unbehandelte Mitochondrien aufgetragen. Die Proteasebehandlung (Spuren 2-4) fand jeweils in einem Volumen von 320 μ l mit 50 μ g PK und 80 μ g mitochondrialem Protein statt. Die Mitochondrien wurden in einem Volumen von 500 μ l in 20 mM Hepes pH 7,4 und 250 mM NaCl beschallt. Als Marker für die Außenmembran wurde Tom70 verwendet, für den Intermembranraum Cytochrom b₂ (Cyt b₂), für die Matrix Tim44 und für die innere Membran der ATP/ADP-Carrier (AAC).

Mba1 scheint demnach fest mit der Innenmembran verbunden zu sein. Die Aminosäuresequenz von Mba1 zeigt zwei sehr hydrophobe Bereiche, die durch zwei positive Ladungen getrennt sind (Abbildung 4). Diese Bereiche könnten Mba1 integral in der Innenmembran verankern.

4.1.2 Mba1 wird für die effiziente Insertion von Cox2 benötigt

Die Deletion von Mba1 führte zu einer starken Reduktion von Cox2 (Abbildung 3). Dies wies entweder auf eine beeinträchtigte Syntheserate oder eine Instabilität von Cox2 hin. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die mitochondrial kodierten Proteine mit ³⁵S-Methionin in Zellen des Wildtyps und der $\Delta mba1$ -Mutante für 30 min markiert. Die mitochondriale Translation wurde mit Chloramphenicol inhibiert und die Zellen mit nicht-radioaktivem Methionin weiter inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Menge an radioaktiv markiertem Cox2 quantifiziert (Abbildung 7). In beiden Stämmen wurde die gleiche Menge an Cox2 gebildet. Während in den Wildtyp-Zellen die Menge an Cox2 nach der Hemmung der Proteinsynthese jedoch über 90 min gleich blieb, war Cox2 in der Mutante instabil. Nach 90 min war mehr als die Hälfte des Proteins abgebaut.

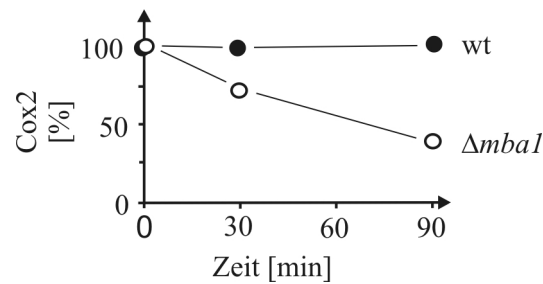


Abbildung 7 Cox2 ist instabil in der $\Delta mba1$ -Mutante: Die mitochondrialen Translationsprodukte wurden für 30 min in Wildtyp- und $\Delta mba1$ -Zellen mit ^{35}S -Methionin markiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und mit 2,5 mg/ml Chloramphenicol und 5 mM kaltem Methionin für weitere 0, 30 oder 90 min inkubiert. Die Zellen wurden durch kräftiges Mixen mit Glasbeads in 0,2% SDS lysiert und der erhaltene Extrakt mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die radioaktiven Signale für Cox2 wurden quantifiziert. Aufgetragen wurde die Signalintensität relativ zur Intensität am Zeitpunkt 0.

Demnach wird Mba1 nicht für die Synthese von Cox2 benötigt, sondern für einen späteren Schritt in der Cox2-Biogenese. Mba1 wurde zusammen mit Oxa1, welches für die Insertion von Cox2 in die innere Membran verantwortlich ist [46, 47], im gleichen Screen als Suppressor von Proteasen der Innenmembran gefunden [96]. Es lag die Vermutung nahe, dass Mba1 und Oxa1 ähnliche Funktionen haben. Es wurde nun die Rolle von Mba1 bei der Insertion von Cox2 in die Innenmembran genauer untersucht.

Cox2 ist eines der acht in Mitochondrien von *S. cerevisiae* kodierten Proteine. Es wird mit einer N-terminalen Präsequenz synthetisiert, die durch die Intermembranraumprotease Imp1 prozessiert wird, sobald der N-Terminus über die innere Membran transportiert wurde. Defekte im Export des N-Terminus von Cox2 führen daher zur Akkumulation an unprozessiertem Cox2. Um die Akkumulation von Cox2-Vorläuferprotein (pCox2) zu untersuchen, wurden die mitochondrialen Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien des Wildtyps und der $\Delta mba1$ -Mutante mit ^{35}S -Methionin markiert. Im Wildtyp wurde keine Anreicherung des Vorläuferproteins beobachtet, wohingegen in der $\Delta mba1$ -Mutante eine deutliche Bande der unprozessierten Form von Cox2 (pCox2) zu sehen war (Abbildung 8, Spuren 1 und 2). Um festzustellen, ob die Vorläuferform von Cox2 in der mitochondrialen Matrix akkumuliert, wurde die Translation in Mitoplasten durchgeführt. Durch anschließende Behandlung mit Protease wurden Proteine abgebaut, welche Domänen in den Intermembranraum exponieren (Abbildung 8, Spuren 3 und 4). Die reife Form des Cox2 war sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante zugänglich für Protease und wurde abgebaut. Die in der $\Delta mba1$ -Mutante akkumulierte Vorläuferform von Cox2 war proteasegeschützt. Somit akkumuliert die $\Delta mba1$ -Mutante unprozessiertes Cox2 in der Matrix, was auf einen Defekt im Export von Cox2 hindeutet. Im Gegensatz zum Wildtyp waren auch die Translationsprodukte

Cytochrom *b* (Cyt *b*) und Cox1 in der Mutante teilweise proteasegeschützt. Somit ist Mba1 für die effiziente Insertion von Cox2 notwendig, und es scheint auch an der Insertion anderer Proteine beteiligt zu sein.

Während der Biogenese von Cox2 muss sowohl der N- als auch der C-Terminus über die Innenmembran transportiert werden. Der Export des C-Terminus erfolgt dabei in einer vom Membranpotential abhängigen Reaktion. Um zu bestimmen, ob auch der Export des C-Terminus von Cox2 in der $\Delta mba1$ -Mutante betroffen war, wurde eine *in organello*-Translation in Wildtyp- und $\Delta mba1$ -Mitoplasten in An- und Abwesenheit von Membranpotential ($\Delta\Psi$) durchgeführt, der Ansatz geteilt und eine Hälfte anschließend mit PK behandelt. Die Mitoplasten wurden reisoliert, lysiert und eine Immunfällung mit Antiserum gegen den C-Terminus von Cox2 durchgeführt. Im Wildtyp wurde nur reifes proteasesensitives Cox2 detektiert (Abbildung 9, Spuren 1 und 2). Durch die Herabsetzung des Membranpotentials während der *in organello*-Translation wurde die Translokation des N-Terminus und des C-Terminus stark beeinträchtigt (Abbildung 9, Spuren 3 und 4). Es wurden sowohl die proteasegeschützte Vorläuferform (pCox2) als auch ein spezifisches C-terminales Fragment detektiert. Dieses Fragment resultiert von einer N_{außen}-C_{innen}-Topologie des Cox2-Proteins, was auf eine Hemmung des Exports des C-Terminus hinweist. Sollte Mba1 auch am Export des C-Terminus von Cox2 beteiligt sein, dann wäre nach Deletion von Mba1 auch eine N_{außen}-C_{innen}-Topologie des reifen Cox2-Proteins zu erwarten. Das hierfür spezifische Fragment konnte aber in $\Delta mba1$ -Mitochondrien nicht beobachtet werden (Abbildung 9, Spuren 5 und 6). Somit ist Mba1 für den Export des Cox2 C-Terminus wohl nicht notwendig.

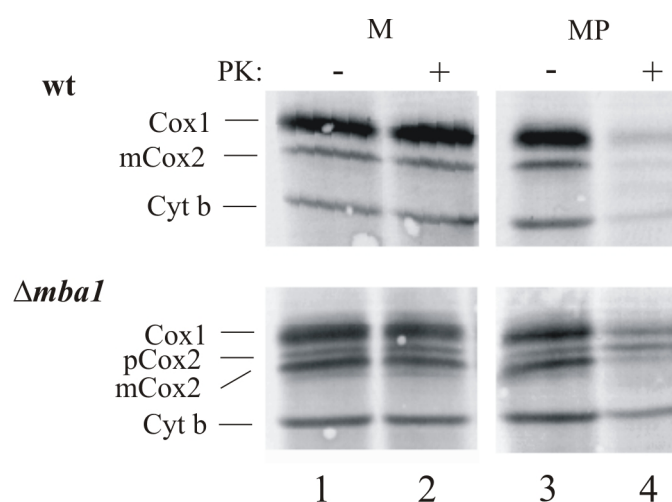


Abbildung 8 Mitochondrien der $\Delta mba1$ -Mutante akkumulieren die Cox2-Vorläuferform: Wildtyp-Mitochondrien und $\Delta mba1$ -Mitochondrien wurden geteilt und eine Hälfte in Mitoplasten umgewandelt. Anschließend wurde eine *in organello*-Translation für 20 min bei 25°C durchgeführt. Die Proben wurden nochmal geteilt und die eine Hälfte mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K behandelt.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Akkumulation der Vorläuferform von Cox2 in der $\Delta mba1$ -Mutante auf einen Defekt der Imp1-Protease zurückzuführen ist, wurde die Kinetik der Imp1-abhängigen Cytochrom b_2 -Prozessierung untersucht. Cytochrom b_2 wird mit einer zweiteiligen Präsequenz im Cytosol synthetisiert. Diese Präsequenz wird nach dem Import in Mitochondrien in zwei Schritten entfernt. Sobald der N-Terminus des Vorläuferproteins die Matrix erreicht hat, wird der erste Teil der Präsequenz durch die *Mitochondrial Processing Peptidase* (MPP) entfernt. Anschließend wird Cyt b_2 auf der Intermembranraumseite von Imp1 prozessiert.

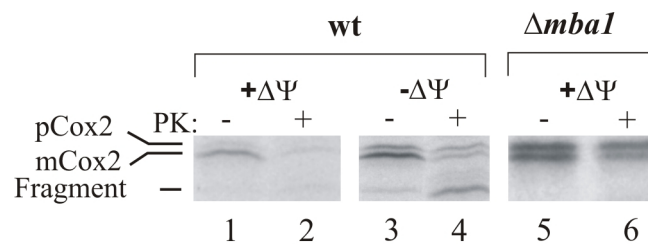


Abbildung 9 Mba1 ist nicht an der Translokation des Cox2 C-Terminus beteiligt: *In organello*-Translation in Wildtyp und $\Delta mba1$ -Mitoplasten wurde für 20 min bei 25°C in An- (- $\Delta\Psi$) oder Abwesenheit (+ $\Delta\Psi$) von 1 μ M Valinomycin durchgeführt. Die Proben wurden geteilt und wie angegeben mit Proteinase behandelt. Die Mitoplasten wurden reisoliert, lysiert und eine Immunfällung mit Antiserum gegen den C-Terminus von Cox2 durchgeführt.

Es wurde eine Importkinetik in isolierten Mitochondrien des Wildtyps, der $\Delta mba1$ -, der $oxa1^{ts}$ - und der $\Delta impl1$ -Mutante mit in Retikulozyten-Lysat hergestelltem Cytochrom b_2^{1-185} -DHFR aufgenommen. Es wurde kein Unterschied in den Kinetiken des Wildtyps, der $\Delta mba1$ - und der $oxa1^{ts}$ -Mutante beobachtet (Abbildung 10). In der $\Delta impl1$ -Mutante war keine zweite Prozessierung zu beobachten. Somit kann eine verminderte Funktion von Imp1 in der $\Delta mba1$ -Mutante ausgeschlossen werden.

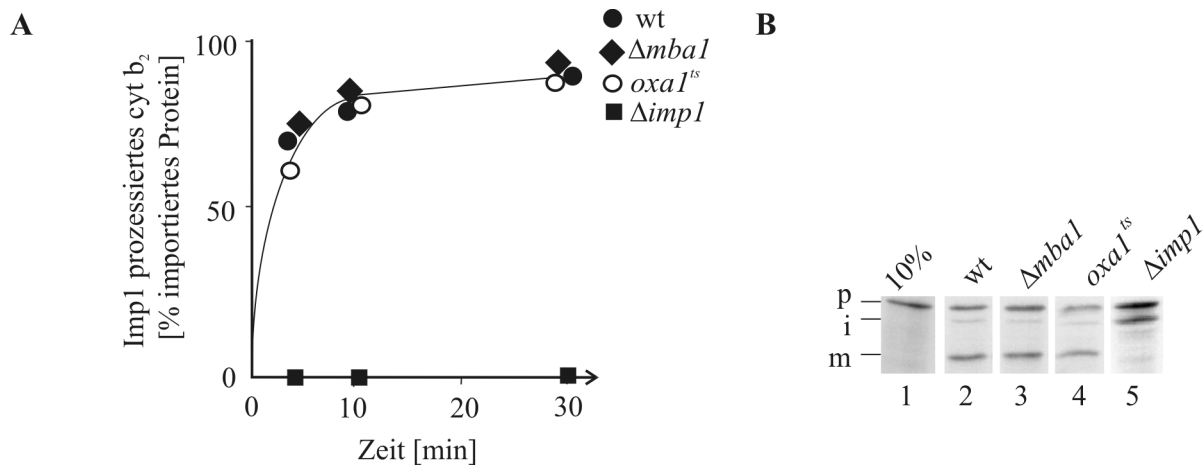


Abbildung 10 Imp1 ist in $\Delta mba1$ -Mitochondrien voll funktionsfähig: ^{35}S -markiertes Cytochrom b_2^{1-185} -DHFR wurde bei 20°C mit Wildtyp-, $\Delta mba1$ -, $oxa1^{ts}$ - und $\Delta imp1$ -Mitochondrien für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Die Mitochondrien des $oxa1^{ts}$ -Stammes wurden zur Ausprägung des Phänotyps zuvor für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden nach der Importreaktion mit $50 \mu\text{g/ml}$ PK behandelt, um nicht importiertes Protein abzubauen. Die Proben wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert und quantifiziert. (A) zeigt Imp1-prozessiertes Protein im Verhältnis zum gesamten importierten Protein. (B) zeigt die erhaltenen Signale nach 30 min Import. Zum Vergleich wurden 10% pro Reaktionsansatz verwendeten radioaktiven Vorläuferprotein aufgetragen (Spur 1). p: Cytochrom b_2^{1-185} -DHFR; i: MPP-prozessiertes Intermediat; m: reife Form des Proteins.

4.1.3 Mba1 interagiert mit mitochondrialen Translationsprodukten

In der $\Delta mba1$ -Mutante akkumuliert die unprozessierte Form von Cox2 in der Matrix. Um die Frage zu beantworten, ob dies auf eine direkte Interaktion zwischen Mba1 und Cox2 zurückzuführen ist wurde ein Ansatz mittels Quervernetzungsreagenzien gewählt.

Die mitochondrialen Translationsprodukte wurden mit ^{35}S -Methionin in isolierten Wildtyp-Mitochondrien markiert. Nach 10 min wurde das Quervernetzungsreagenz 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol (DFDNB) zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. DFDNB ist ein Lysin-spezifisches Reagenz mit einem sehr kurzen Abstand der reaktiven Gruppen (0,3 nm) und kann daher nur Proteine quervernetzen, die in direktem Kontakt miteinander stehen. Die Markierung wurde durch Zugabe von einem Überschuss an kaltem Methionin gestoppt und das Quervernetzungsreagenz mit Glycin abreagiert. Die Mitochondrien wurden lysiert und Immunfällungen mit Antiseren gegen Yta10, Oxa1, Mba1 und mit Präimmenserum durchgeführt. Die Proben wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert (Abbildung 11). Es wurden keine Translationsprodukte ohne Zusatz von DFDNB oder mit dem Präimmenserum gefällt. Hingegen wurden Mba1 (Spur 8), Oxa1 (Spur 9) und Yta10 (Spur 10) mit einem großen Spektrum an Translationsprodukten variabler Größe quervernetzt. Dieser „Schmier“ spiegelt nascierende Polypeptidketten

unterschiedlicher Länge wider, die noch an Ribosomen gebunden sind, oder nicht komplettierte Translationsprodukte, welche für den Proteinabbau bestimmt sind. Um dies genauer zu untersuchen, wurde vor Zugabe des Quervernetzungsreagenzes die Translation mit Chloramphenicol inhibiert (Abbildung 11 Spuren 11-20). Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese, wobei die naszierenden Ketten an das Ribosom gebunden bleiben. Unter diesen Bedingungen wurden keine Quervernetzungsprodukte zu Yta10 beobachtet (Abbildung 11 Spur 20). Das zeigt, dass die Protease Yta10 vorzugsweise unvollständige Polypeptide bindet, die nicht mehr mit den Ribosomen assoziiert sind. Im Gegensatz dazu verstärkte sich die Quervernetzungseffizienz zu Mba1 unter diesen Bedingungen (Abbildung 11 Spur 18). Somit scheint Mba1 hauptsächlich während der Synthese mit mitochondrialen Translationsprodukten zu interagieren, die noch mit mitochondrialen Ribosomen assoziiert sind.

Um zu untersuchen mit welchen der acht mitochondrialen Translationsprodukten Mba1 interagiert, wurde der obige Ansatz modifiziert und anstelle von DFDNB das spaltbare Quervernetzungsreagenz Dithiobis(succinimidylpropionat) DSP eingesetzt. DSP ist ein homobifunktionelles Quervernetzungsreagenz, welches eine reduktiv spaltbare Disulfidbrücke enthält. Durch Zusatz geringer Konzentrationen von Quervernetzungsreagenzien zu einer *in organello*-Translation wird die Translation nicht gestört und die Produkte vervollständigt [48]. Somit lassen sich nach Spaltung die erhaltenen Quervernetzungsprodukte zuordnen.

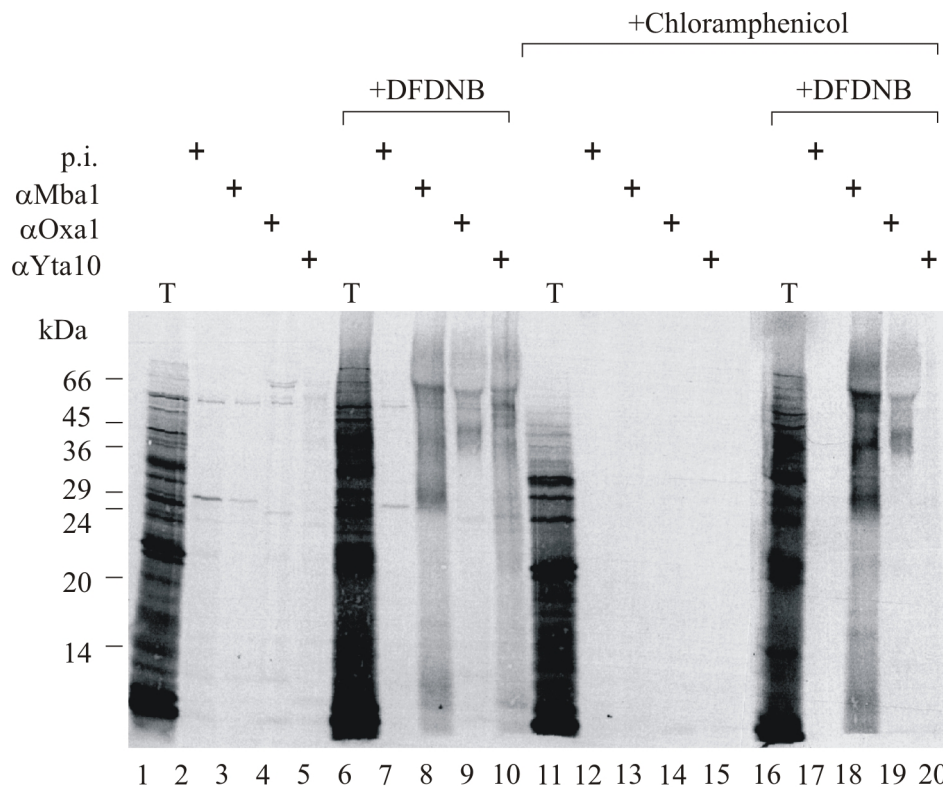


Abbildung 11 Mba1 interagiert mit naszierenden mitochondrialen Translationsprodukten: Eine *in organello*-Translation wurde in Wildtyp-Mitochondrien für 10 min bei 25°C durchgeführt. Die Proben wurden geteilt und eine Hälfte mit 2 mg/ml Chloramphenicol versetzt. Nach 1 min wurden den Proben 400 µM DFDNB (Spuren 6-10 und 16-20) oder die gleiche Menge DMSO (Spuren 1-5 und 11-15) zugesetzt und für weitere 20 min inkubiert. Überschüssiges Quervernetzungsreagenz wurde durch Zusatz von 100 mM Glycin abgefangen. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und in 1% SDS für 30 s bei 96°C lysiert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 g geklärt und entweder direkt für die Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt (T, Total), oder einer Immunfällung unterzogen. Die Immunfällung wurde mit Präimmunsereum (p.i.) oder Antiseren gegen Mba1, Oxa1 und Yta10 durchgeführt.

Während der Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien wurde DSP in geringer Konzentration zugesetzt. Die Markierung wurde durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Methionin gestoppt und das Quervernetzungsreagenz durch Zugabe von Glycin abreagiert. Die Mitochondrien wurden lysiert und eine Immunfällung mit Präimmunsereum und Antiseren gegen Mba1 und Oxa1 durchgeführt. Anschließend wurden die Quervernetzungsprodukte gespalten, die Proben durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert (Abbildung 12). Aus den acht mitochondrialen Translationsprodukten konnten vier spezifisch mit den Antiseren gegen Mba1 und Oxa1 gefällt werden (Abbildung 12 Spuren 6 und 7). Es handelte sich um die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom-Oxidase und mit geringerer Effizienz Cytochrom *b*. Die Reichweite des Quervernetzungsreagenz DSP beträgt 1,2 nm. Demnach befanden sich die

vier Proteine zu einem Zeitpunkt ihrer Biosynthese in der Nähe von Mba1 und Oxa1. Die restlichen Translationsprodukte präsentieren entweder keine Lysinreste zum Quervernetzen oder interagieren nicht mit Mba1 oder Oxa1. Ein fast identisches Quervernetzungsmuster ergab sich, wenn das Membranpotential während der Translation mit Valinomycin depletiert worden war. Die Interaktion der Translationsprodukte mit Mba1 und Oxa1 benötigt somit kein Membranpotential.

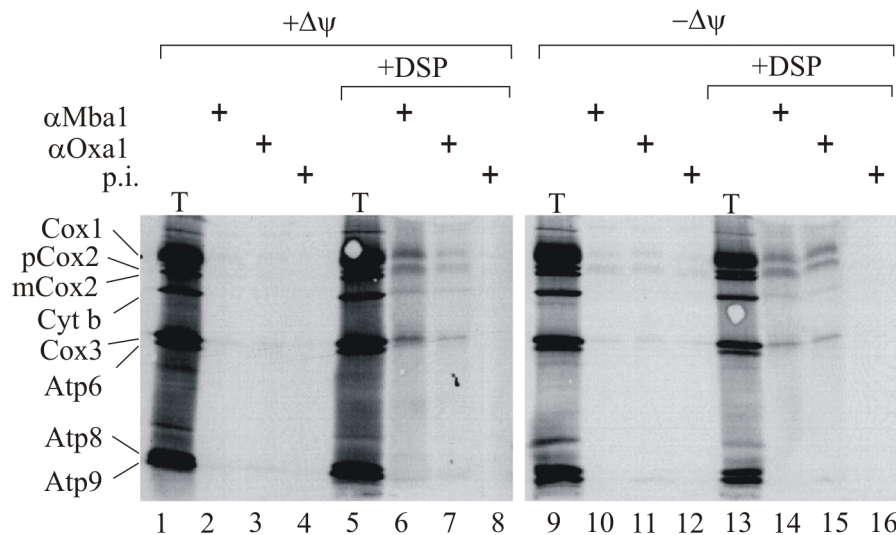


Abbildung 12 Mba1 und Oxa1 interagieren mit denselben vier mitochondrialen Substraten: Eine *in organello*-Translation wurde für 15 min in An- ($-\Delta\Psi$, Spuren 9-16) oder Abwesenheit ($+\Delta\Psi$, Spuren 1-8) von 1 μM Valinomycin durchgeführt. Anschließend wurden den Proben entweder 200 μM DSP (Spuren 5-8 und 13-16) oder die gleiche Menge DMSO (Spuren 1-4 und 9-12) zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert. Überschüssiges Quervernetzungsreagenz wurde durch Zusatz von 100 mM Glycin gequenchet. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und in 1% SDS für 30 s bei 96°C lysiert. Der Extrakt wurde für 5 min bei 15000 g geklärt und einer Immunfällung unterzogen. Die Immunfällung wurde mit Präimmunsereum (p.i.) oder Antiseren gegen Mba1 und Oxa1 durchgeführt. Mit T markierte Spuren wurden mit 10% des für die Immunfällung eingesetzten Extrakts geladen.

Die Beobachtung, dass sowohl Mba1 als auch Oxa1 mit mitochondrialen Translationsprodukten interagieren, warf die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt der Biogenese diese Interaktion stattfindet. Anhand der Interaktion von Mba1 mit Cox2 wurde diese Frage genauer untersucht.

In isolierten Mitochondrien wurden für 25 min drei *in organello*-Translationen parallel durchgeführt. Anschließend wurde die Translation durch Zugabe eines Überschusses an kaltem Methionin und Puromycin gestoppt und die Mitochondrien weiter inkubiert (*Chase*). Das spaltbare Quervernetzungsreagenz wurde entweder während der Translation (A), direkt nach der Translation (B) oder zu einem späten Zeitpunkt des *Chase* (C) zugesetzt. Die Proben

wurden jeweils für 15 min mit DSP inkubiert und anschließend das überschüssige Reagenz mit Glycin abgefangen. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und lysiert. Der mitochondriale Extrakt wurde für Immunfällungen mit den Seren gegen Mba1, Oxa1 und Cox20 eingesetzt.

Quervernetzungsprodukte zu Mba1 und Oxa1 wurden nur während der Translation oder direkt anschließend erhalten (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu war die Quervernetzungseffizienz zu Cox20 viel größer und nahm mit der Zeit zu. Mba1 und Oxa1 interagieren demnach sehr früh und nur vorübergehend während der Cox2-Biogenese mit Cox2. Das Chaperon Cox20 [103] bildet eine stabile Interaktion mit dem noch nicht assemblierten Cox2.

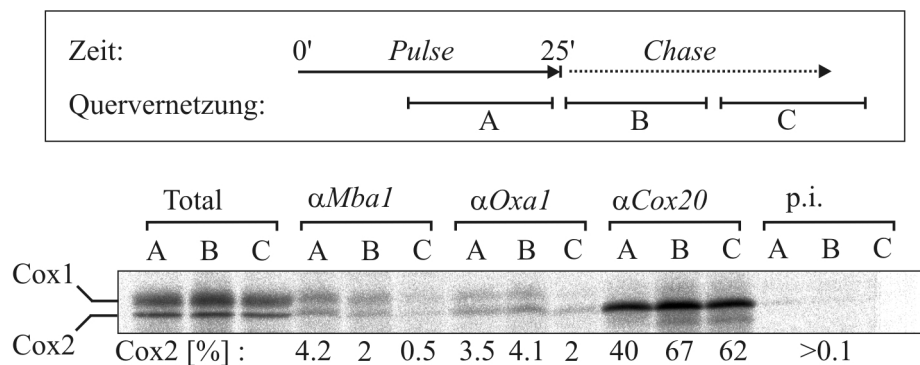


Abbildung 13 Mba1 und Oxa1 interagieren transient mit Cox2: Die mitochondrialen Translationsprodukte wurden für 25 min in drei separaten Reaktionen mit 35 S-Methionin markiert (*Pulse*). Die Translation wurde durch Zusatz von 25 μ g/ml Puromycin und 5 mM Methionin gestoppt und die Proben weitere 30 min inkubiert. Währenddessen wurde 400 μ M DSP zugesetzt und nach 15 min mit 100 mM Glycin abreagiert. Wie oben dargestellt, wurde die Probe A während der Translation, Probe B direkt nach der Translation und Probe C 15 min nach der Translation mit DSP inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, lysiert und entweder direkt für die Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt oder einer Immunfällung mit Präimmunsereum (p.i.) oder Antiseren gegen Mba1, Oxa1 und Cox20 unterzogen. Die als „Total“ gekennzeichneten Spuren zeigen 10% des für die Immunfällung eingesetzten Extraktes. Die Intensitäten des immungefällten Cox2 wurden quantifiziert und auf das gesamte Cox2 bezogen.

4.1.4 Mba1 interagiert mit posttranslational exportierten Proteinen

Mba1 ist an in der kotranslationalen Insertion von Cox2 beteiligt. Um zu untersuchen, ob Mba1 auch für die posttranslationalen Insertion eine Rolle spielt, wurden Importexperimente durchgeführt. Hierfür wurde ein *in vitro* synthetisiertes Fusionsprotein pSu9(1-66)Cox2(1-74)DHFR verwendet. Dieses Fusionsprotein besteht aus der mitochondrialen Zielsequenz der ATPase-Untereinheit 9 aus *N. crassa* gefolgt von den ersten 74 Aminosäuren von Cox2 und der Dehydrofolatreduktase der Maus (Abbildung 14, Box).

Dieses Protein wird in die mitochondriale Matrix importiert, wo die N-terminale Signalsequenz von MPP entfernt wird. Der N-Terminus des so prozessierten Proteins kann dann in die innere Membran inseriert werden [44]. Nach der Insertion des N-Terminus ragen die ersten 39 Aminosäuren von Cox2 in den Intermembranraum. Nach Öffnen der Membran durch hypotonisches Schwellen, wird durch Zugabe von Proteinase K ein spezifisches Fragment generiert. Somit kann man die Effizienz der posttranslationalen Insertion anhand dieses Fragmentes quantifizieren.

Im Wildtyp war im Lauf der Inkubation eine kontinuierliche Zunahme des Fragmentes zu beobachten (Abbildung 14 Spuren 1-3). Hingegen wurde der Export von Cox2 stark inhibiert, sobald entweder Mba1 (Spur 4) oder funktionelles Oxa1 (Spur 5) fehlten.

Um zu untersuchen, ob Mba1 auch an der Insertion kernkodierter Proteine beteiligt ist, wurden Importexperimente mit Oxa1 als Modellprotein durchgeführt. Oxa1 wird vollkommen in die Matrix importiert und ist anfangs in Mitoplasten gegen die Behandlung mit Protease geschützt. Wird der N-Terminus von Oxa1 über die innere Membran transportiert, ist dieser in Mitoplasten zugänglich für Protease und ein typisches C-terminales 27 kDa Fragment wird generiert [88].

In Retikulozyten-Lysat hergestelltes Oxa1 wurde in isolierte Mitochondrien des Wildtyps, $\Delta mba1$, $oxa1^{ts}$, $\Delta oxa1$ und der Doppelmutante $oxa1^{ts}\Delta mba1$ für 10 min importiert. Die Mitochondrien wurden in Mitoplasten umgewandelt und mit Proteinase K behandelt. Das Verhältnis von proteasesensitivem zu importiertem Protein wurde bestimmt. In Wildtyp-Mitochondrien wurden 61% des Oxa1-Proteins in die Membran inseriert. In $\Delta mba1$ und $oxa1^{ts}$ wurden 51 bzw. 46% inseriertes Protein nachgewiesen. Obwohl der ts-Phänotyp der $oxa1^{ts}$ -Mutante und der $oxa1^{ts}\Delta mba1$ -Doppelmutante nicht induziert wurde, konnte eine starke Reduktion der Insertion bei der Doppelmutante beobachtet werden. Die Insertion von Oxa1 ging dabei auf 14% zurück. Demnach ist selbst bei nicht ausgeprägtem Phänotyp die Funktion von Oxa1^{ts} von der Anwesenheit von Mba1 abhängig. Somit ist im Oxa1^{ts}-Hintergrund Mba1 notwendig für die Insertion kernkodierter Proteine.

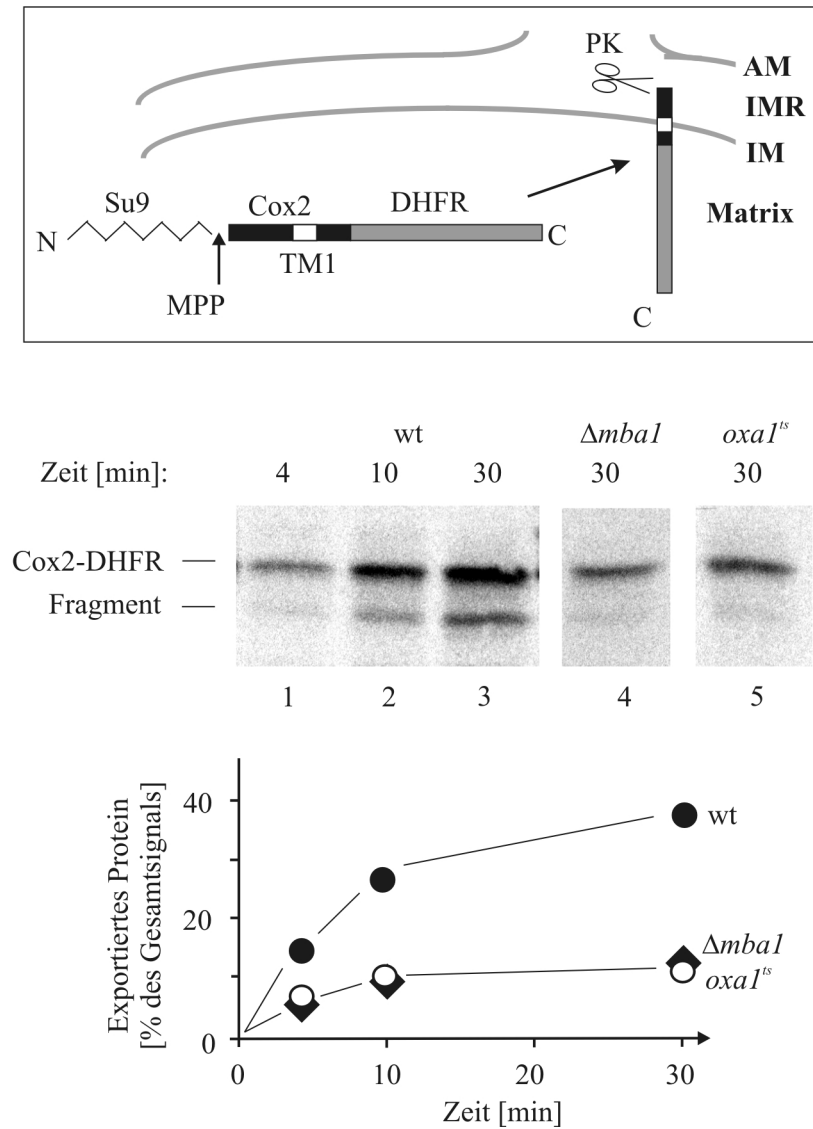


Abbildung 14 Import von pSu9(1-66)Cox2(1-74)DHFR in Wildtyp-, $\Delta mbal$ - und $oxal1^s$ -Mitochondrien: In der Box ist der Import des Fusionsproteins schematisch dargestellt: AM: Außenmembran; IMR: Intermembranraum; IM: Innenmembran. MPP: Schnittstelle für die *Mitochondrial Processing Peptidase*; Su9: Untereinheit 9-Signalsequenz; TM1: erste Transmembrandomäne von Cox2. Isolierte Mitochondrien des Wildtyps, $\Delta mbal$ und $oxal1^s$ wurden 10 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit pSu9(1-66)Cox2(1-74)DHFR für 4, 10 und 30 min bei 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden in Mitoplasten konvertiert und mit PK behandelt. Spuren 1-3 zeigen die Generation des C-terminalen Fragmentes in Wildtyp-Mitochondrien und Spuren 4 und 5 die Generation des Fragmentes nach 30 min in $\Delta mbal$ und $oxal1^s$. Die Signale wurden quantifiziert, gegen die unterschiedliche Anzahl an Methioninen in den verschiedenen Spezies korrigiert und der Anteil inseriertes Cox2 bezogen auf gesamtimportiertes Cox2 gegen die Zeit aufgetragen.

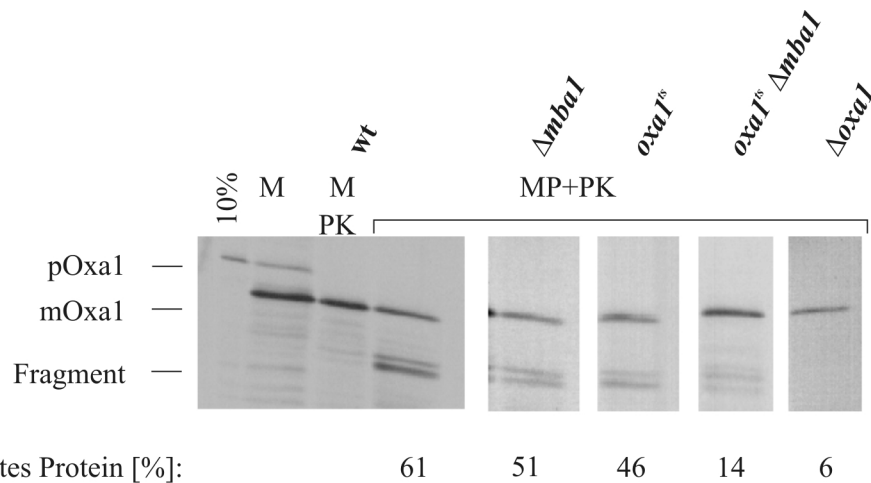


Abbildung 15 Import von Oxa1 ist im $oxa1^{ts}$ -Hintergrund abhängig von Mba1: Das Oxa1-Vorläuferprotein (pOxa1) wurde in Retikulozyten-Lysat hergestellt und für 20 min mit Wiltyp-, $\Delta mba1$ -, $oxa1^{ts}$ -, $oxa1^{ts} \Delta mba1$ - und $\Delta oxa1$ -Mitochondrien inkubiert. Zur Generierung des typischen Oxa1-Fragmentes wurde die äußere Membran durch hypotonisches Schwellen geöffnet und die Mitoplasten mit PK behandelt. Die Signale wurden quantifiziert und das Verhältnis von gebildetem Fragment zu gesamtimportiertem Oxa1 bestimmt.

Interagiert Mba1 direkt mit importiertem Oxa1? Hierzu wurde nach einem Oxa1-Import das Quervernetzungsreagenz Disuccinimidylglutarat (DSG) zugesetzt und die Mitochondrien weiter inkubiert. DSG ist ein aminspezifisches Quervernetzungsreagenz mit einer Reichweite von 0,72 nm. Die Mitochondrien wurden lysiert und eine Immunfällung mit Präimmunsereum oder Antiserum gegen Mba1 durchgeführt (Abbildung 16). Der Zusatz von DSG führte zu mehreren Quervernetzungsprodukten (Abbildung 16, 10% Spur +DSG). Ein ca. 60 kDa großes Quervernetzungsprodukt ließ sich spezifisch mit dem Antiserum gegen Mba1 fällen. Der Größenunterschied zwischen reifem Oxa1 und diesem Quervernetzungsprodukt beträgt etwa 24 kDa, was der apparenten Größe von Mba1 entspricht.

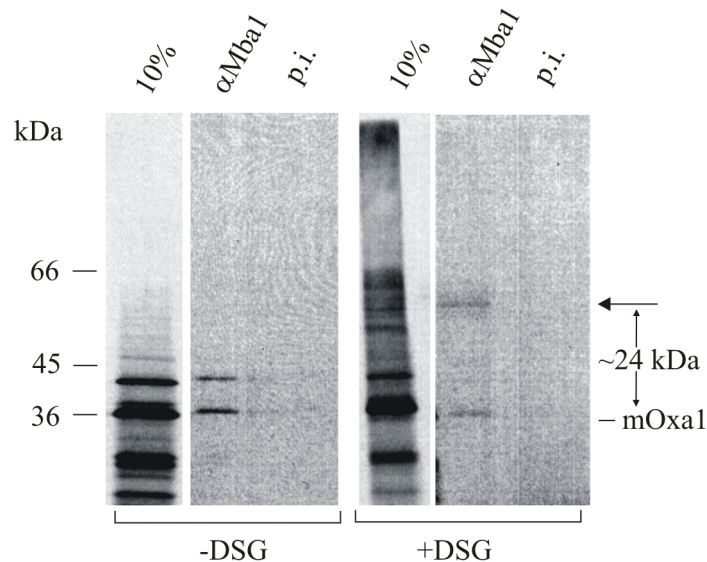


Abbildung 16 Mba1 interagiert direkt mit Oxa1 während der Insertion: Das Oxa1-Vorläuferprotein wurde in Retikulozyten-Lysat hergestellt und für 10 min in isolierte Wildtyp-Mitochondrien importiert. Der Ansatz wurde halbiert, eine Hälfte mit 100 μ M DSG, die anderer Hälfte mit der gleichen Menge an DMSO behandelt und für weitere 20 min inkubiert. Überschüssiges Quervernetzungsreagenz wurde durch 100 mM Glycin gequenchet. Die Mitochondrien wurden reisoliert, lysiert und einer Immunfällung mit Präimmunsereum oder Antiserum gegen Mba1 unterzogen. Die mit 10% markierte Spur zeigt 10% des für die Immunfällung verwendeten Extraktes.

4.1.5 Oxa1 und Mba1 bilden zwei unabhängige höhermolekulare Komplexe

Oxa1 und Mba1 sind beide an der posttranslationalen wie auch kotranslationalen Insertion von Proteinen beteiligt. Oxa1 formt einen höhermolekularen oligomeren Komplex [48]. Ist Mba1 Teil dieses Komplexes? Es konnten keine Quervernetzungsprodukte von endogenem Mba1 zu endogenem Oxa1 nachgewiesen werden. Auch gelang es nicht in einer Koimmunfällung Mba1 mit Oxa1 zu fällen, bzw. Oxa1 mit Mba1. In einem Gelfiltrationsexperiment wurden die Größen der Proteinkomplexe bestimmt (Abbildung 17). Wildtyp-Mitochondrien wurden in einem sehr milden Detergenz lysiert und der Extrakt einer Gelfiltration unterzogen. Mba1 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes, der mit ~200 kDa eindeutig kleiner ist als der Oxa1-Komplex von etwa 230-250 kDa.

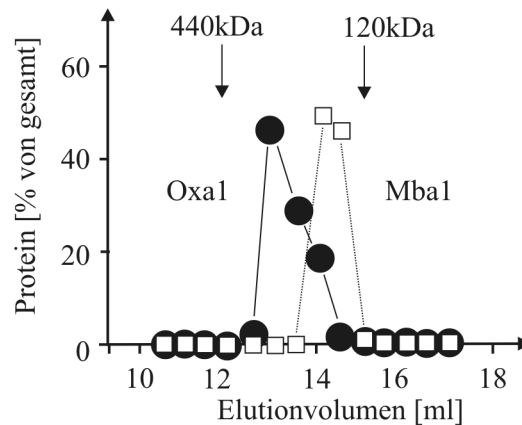


Abbildung 17 Größenbestimmung der Oxa1- und Mba1-Komplexe: Wildtyp-Mitochondrien wurden bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in 1% Digitonin-Puffer lysiert, der Extrakt durch Ultrazentrifugation geklärt und auf einer Superose12-Säule aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden TCA-gefällt und mittels Westernblot analysiert. Die erhaltenen Antikörpersignale wurden quantifiziert und bezogen auf das gesamt eingesetzte Protein aufgetragen. Die Superose12-Säule wurde unter gleichen Bedingungen mit Markerproteinen kalibriert.

Des Weiteren beeinflusst die Deletion von Mba1 nicht die Proteinniveaus von Oxa1 (Abbildung 3). Dies wäre bei Komplexpartnern zu erwarten. Somit bilden Mba1 und Oxa1 keine stabile Interaktion miteinander aus. Eine transiente Interaktion lässt sich jedoch nicht ausschließen.

4.1.6 Mba1 arbeitet unabhängig von Oxa1

Mba1 und Oxa1 interagieren mit den gleichen Substraten während deren Insertion. Somit stellt sich die Frage, ob Mba1 und Oxa1 zusammenarbeiten und welcher Art diese Zusammenarbeit ist. Beide Komplexe können entweder parallel arbeiten, mit überlappenden aber unabhängigen Funktionen, oder nacheinander. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Liegt die Funktion von Mba1 vor oder nach der von Oxa1, sollte der Phänotyp der $\Delta oxa1\Delta mba1$ -Mutante ähnlich der der $\Delta oxa1$ -Mutante sein. Im Gegensatz dazu wurde ein starker synthetischer Wachstumsdefekt der $\Delta oxa1\Delta mba1$ -Mutante beobachtet (Abbildung 18). Selbst auf Glukose (YPD) wuchs dieser Stamm sehr langsam: Bei 24°C war kaum ein Wachstum sichtbar und bei 30°C konnte ein langsames Wachstum beobachtet werden. Demnach arbeitet Mba1 unabhängig von Oxa1 und unterstützt auf einem parallelen Weg die Insertion von Proteinen in die Innenmembran.

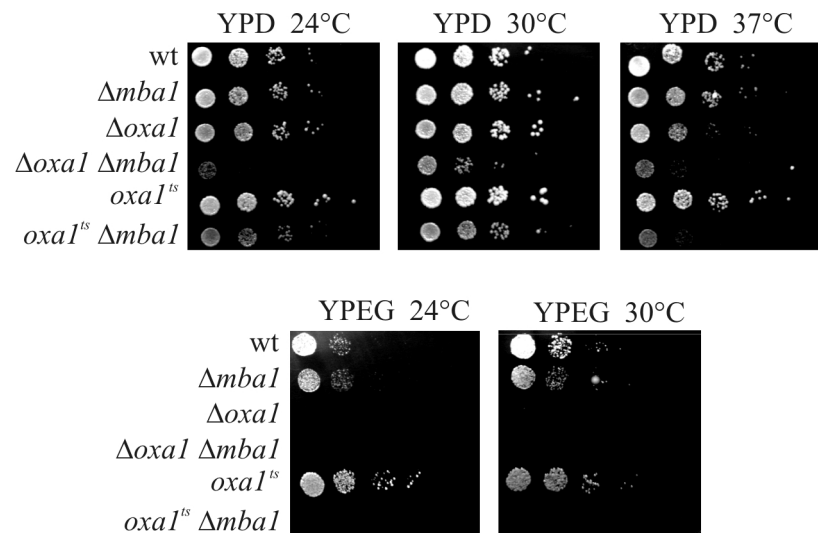


Abbildung 18 Mutationen in Mba1 und Oxa1 führen zu einem synthetische Wachstumsdefekt: Alle Stämme wurden auf YPD-Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe auf YPD- und YPEG-Platten getüpfelt. Die Platten wurden bei den indizierten Temperaturen für zwei (YPD) oder vier Tagen (YPEG) inkubiert.

Der Stamm *oxa1^{ts}Δmba1*, in welchem das *MBA1*-Gen im *oxa1^{ts}*-Hintergrund deletiert wurde, zeigt auf YPD bei restriktiver Temperatur (37°C) einen ähnlichen Phänotyp wie *Δoxa1Δmba1*. Selbst bei permissiver Temperatur (24°C) konnte dieser Stamm nicht auf Glycerol wachsen (YPEG). Die endogenen Level von Oxa1 waren in diesem Stamm nicht verändert und dennoch kam es zu einer vollständigen Inhibierung der Cox2-Prozessierung. Daraus lässt sich schließen, dass Oxa1^{ts} bei allen Temperaturen teilweise defekt ist, dies aber bei niedrigen Temperaturen von Mba1 ausgeglichen werden kann.

4.1.7 Mutationen der *MBA1*- und *OXA*-Gene verursachen synthetische Defekte in den Enzymen der Atmungskette

Die Doppeldeletion von Oxa1 und Mba1 führte zu einem drastischen Wachstumsphänotyp (4.1.6). Um die Natur dieses Phänotyps zu untersuchen, wurden die Enzymaktivitäten des *bc₁*-Komplexes und des Cytochrom-Oxidase-Komplexes der Atmungskette gemessen (Abbildung 19). Die Deletion von Mba1 allein führte zu einer Reduktion der Cytochrom-Oxidase-Aktivität (A) um 90%. Hingegen wurde die Aktivität des *bc₁*-Komplexes (B) nicht reduziert, vielmehr war eine leichte Steigerung der *bc₁*-Aktivität zu beobachten. Die *Δoxa1*-Mutante zeigte noch ca. 30% *bc₁*-Aktivität, aber keine messbare Aktivität des Cytochrom-Oxidase-Komplexes. Wie zu erwarten, zeigte die Doppelmutante *Δoxa1Δmba1* keine Cytochrom-Oxidase-Aktivität mehr. Doch auch die Aktivität des *bc₁*-Komplexes war komplett reduziert.

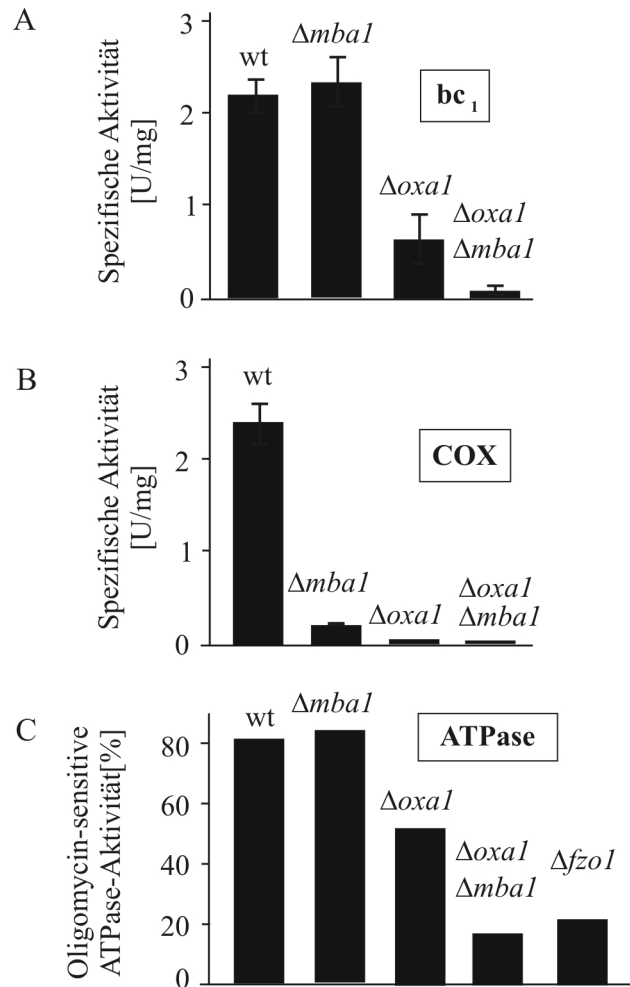


Abbildung 19 Enzymaktivitätsbestimmung des bc_1 -Komplexes, der Cytochrom-Oxidase sowie der ATPase-Aktivität in $Mba1$ und $Oxa1$ Mutanten: Enzymaktivitäten des bc_1 -Komplexes (A) und Cytochrom-Oxidase (B) wurden in isolierten Wildtyp-, $\Delta mba1$ -, $\Delta oxa1$ - und $\Delta oxa1\Delta mba1$ -Mitochondrien in 3 Experimenten gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. (C) Die ATPase-Aktivität wurde in isolierten Wildtyp-, $\Delta mba1$ -, $\Delta oxa1$ -, $\Delta oxa1\Delta mba1$ - und Δfzo -Mitochondrien in An- und Abwesenheit von Oligomycin gemessen. Der prozentuale Anteil der oligomycin-sensitiven ATPase-Aktivität wurde aufgetragen. Als Kontrolle für Mitochondrien ohne funktionelle F_1F_0 -ATPase wurde die rho^0 -Mutante $\Delta fzo1$ mit vermessen.

Des weiteren wurde die Aktivität der F_1F_0 -ATPase in den Mutanten gemessen. Dazu wurde die Hydrolyse von ATP zu ADP in An- und Abwesenheit von Oligomycin gemessen. Nur die vollständig assemblierte F_1F_0 -ATPase lässt sich durch Oligomycin hemmen, nicht aber der F_1 -Sektor allein oder andere mitochondriale ATPasen. Somit ist ein Maß für die Funktionalität der F_1F_0 -ATPase die Oligomycin-Sensitivität. In (C) ist die Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität der Wildtyp-, $\Delta mba1$ -, $\Delta oxa1$ -, $\Delta oxa1\Delta mba1$ - und $\Delta fzo1$ -Mitochondrien dargestellt. Die Deletion von $Mba1$ hatte im Vergleich zum Wildtyp keinen Einfluss auf die Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität. In $\Delta oxa1$ sank diese Aktivität auf ~50% und in der Doppelmutante $\Delta oxa1\Delta mba1$ auf unter 20%. Dieser Wert ist vergleichbar

mit dem von *rho*⁰-Stämmen, wie z.B. $\Delta fzol$ [125], die keine funktionelle F₁F₀-ATPase mehr enthalten [126]. Demnach besitzt die Doppelmutante $\Delta oxal\Delta mbal$ keine funktionelle F₁F₀-ATPase.

Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass Mba1 in Anwesenheit von Oxal1 für die Biogenese des *bc*₁-Komplexes und der ATPase entbehrlich ist, aber absolut notwendig, wenn Oxal1 fehlt.

4.1.8 Mutationen der *MBA1*- und *OXAL1*- Gene verursachen synthetische Defekte im Proteinexport

Die Aktivitäten des *bc*₁-Komplexes und des Cytochrom-Oxidase-Komplexes sind in der $\Delta mbal$ - (Cytochrom-Oxidase) und der $\Delta oxal\Delta mbal$ -Mutante (*bc*₁-Komplexes und Cytochrom-Oxidase) stark reduziert (4.1.7). Diese Defekte könnten auf eine gestörte Membraninsertion zurückzuführen sein, zumal Mba1 mit den mitochondrialen Translationsprodukten Cox1, 2 und 3 sowie Cytochrom *b* (4.1.3) interagiert. Um die Insertionseffizienz von Cox2, Cox3 und Cytochrom *b* in den Mutanten zu untersuchen, wurden die mitochondrialen Translationsprodukte mit ³⁵S-Methionin für 20 min in isolierten Wildtyp-, $\Delta mbal$ -, $\Delta oxal$ - und $\Delta oxal\Delta mbal$ -Mitochondrien markiert. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert und mit 0,1 M Na₂CO₃ extrahiert. In die Membran inserierte Proteine wurden in einem Sucrose-Stufengradienten floriert und mit der Gesamtmenge an synthetisierten Proteinen verglichen (Abbildung 20, Tabelle 4-1). In der $\Delta mbal$ -Mutante war die Insertion von Cytochrom *b* eindeutig reduziert. Fehlte auch noch Oxal1, war die Insertion von Cytochrom *b* fast vollständig inhibiert. Die Insertion von Cox1 und 3 war in der $\Delta mbal$ -Mutante ebenfalls beeinträchtigt. Wie schon vorher beobachtet, akkumuliert das unprozessierte Cox2 (pCox2) in der Matrix und ließ sich kaum in der Membranfraktion nachweisen.

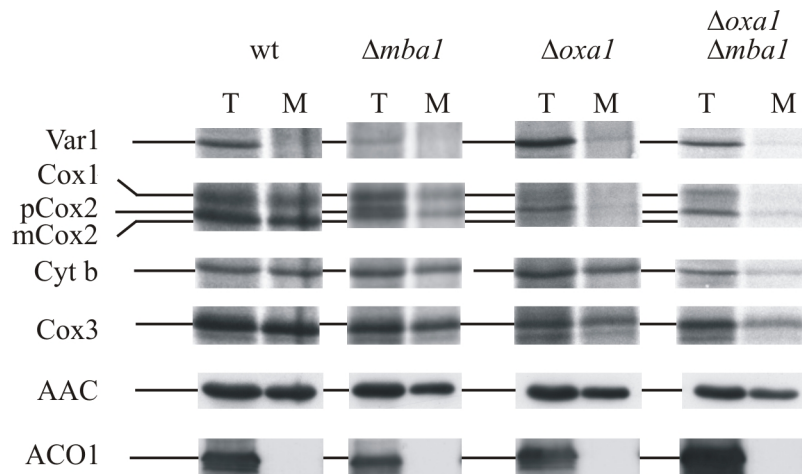


Abbildung 20 *oxal* und *mbal* Mutanten zeigen einen synthetischen Defekt bei der Proteininsertion: Eine *in organello*-Translation wurde in isolierten Wildtyp-, $\Delta mbal$ -, $\Delta oxal$ - und $\Delta oxal\Delta mbal$ -Mitochondrien für 20 min durchgeführt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und in 0,1 M Na_2CO_3 aufgenommen. Die Proben wurden geteilt. Eine Hälfte wurde TCA-gefällt (T: Total) und die andere Hälfte durch ein Sucrose-Gradienten flotiert (M: Membranen). Die Proben wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese, Westernblot und Autoradiographie analysiert. Var1, Cox2, Cytochrom b und Cox3 wurden durch Autoradiographie detektiert und die Signale quantifiziert. Das lösliche Protein Aco1 und das Membranprotein ATP/ADP-Carrier (AAC) wurden zur Kontrolle mit den entsprechenden Antiseren nachgewiesen.

Der Nachweis von Proteinen in der Membranfraktion bedeutet nicht zwingend, dass diese auch korrekt inseriert sind. Die Topologie der Membranproteine kann mit diesem Protokoll nicht untersucht werden, und daher ist es möglich, dass die Effekte auf die Insertion noch größer sind, als sie sich hier darstellen.

Tabelle 4-1 Quantifizierung der Signale aus Abbildung 20: Dargestellt ist der prozentuale Anteil von membraninsertiertem zu synthetisiertem Protein.

	Wildtyp	$\Delta mbal$	$\Delta oxal$	$\Delta oxal\Delta mbal$
pCox2	-	3%	9%	2%
mCox2	75%	57%	-	-
Cyt b	98%	57%	88%	8%
Cox3	98%	65%	73%	52%

4.1.9 *Mba1* kann teilweise die Funktion von *Oxa1* übernehmen

Mba1 arbeitet unabhängig von *Oxa1* (4.1.6). Um diese *Oxa1*-unabhängige Funktion genauer zu charakterisieren, wurde untersucht, ob die Interaktionen zwischen *Mba1* und den mitochondrialen Translationsprodukten auch in Abwesenheit von *Oxa1* zu beobachten sind.

Die mitochondrialen Translationsprodukte in isolierten Wildtyp-, $\Delta oxal1$ - und $\Delta impl1$ -Mitochondrien wurden mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markiert. Nach der Behandlung mit dem spaltbaren Quervernetzungsreagenz DSP (Abbildung 21) wurden die Mitochondrien lysiert und die Quervernetzungsprodukte mit Mba1 und Oxa1 durch Immunfällung isoliert. Die Quervernetzungsprodukte wurden gespalten und die Proben mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert. Im Wildtyp werden Cox1, Cox2 und Cox3 spezifisch zu Mba1 und Oxa1 quervernetzt. In der Oxa1-Deletionsmutante war eine Interaktion zwischen Cox3 und Mba1 nachzuweisen, aber es wurden keine Quervernetzungsprodukte zu Cox2 erhalten. Dies könnte auf den Prozessierungsdefekt von Cox2 in $\Delta oxal1$ zurückzuführen sein, ist aber unwahrscheinlich, da in einer $\Delta impl1$ -Mutante, welche Vorläuferproteine von Cox2 akkumuliert, sehr wohl ein Quervernetzungsprodukt mit Mba1 detektiert wurde (Abbildung 21 Spuren 9-11). Ein Quervernetzungsprodukt zu Cox1 konnte aufgrund des niedrigen Proteinniveaus von synthetisiertem Cox1 in $\Delta oxal1$ nicht nachgewiesen werden.

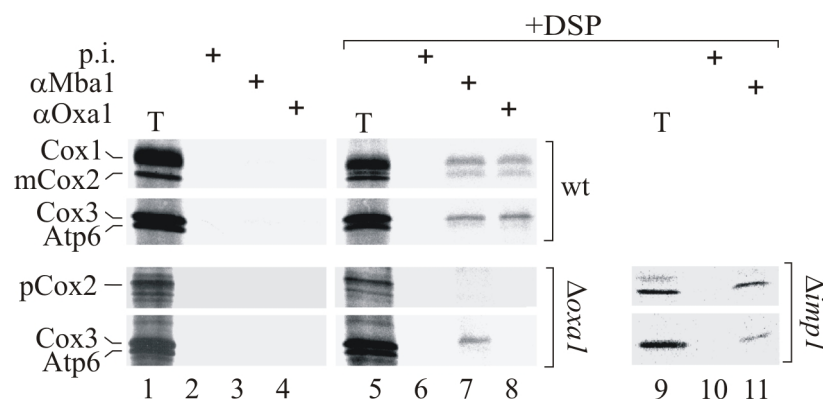


Abbildung 21 Mitochondriale Translationsprodukte interagieren mit Mba1 auch in Abwesenheit von Oxa1: Mitochondriale Translationsprodukte wurden in isolierten Wildtyp-, $\Delta oxal1$ - und $\Delta impl1$ -Mitochondrien mit ^{35}S -Methionin markiert. Nach 15 min wurden entweder 200 μM DSP oder die entsprechende Menge DMSO zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert. Quervernetzung und Markierung wurden durch Zugabe von Glycin und kaltem Methionin gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und lysiert. Der Extrakt wurde bei 15000 g geklärt und einer Immunfällung mit Antiseren gegen Mba1, Oxa1 und Präimmunsereum unterzogen. Mit (T) markierte Spuren zeigen 10% des für die Immunfällung eingesetzten Extraktes. mCox2: reifes Cox2.

Somit ist Oxa1 für die Interaktion von Mba1 mit Cox3 unwichtig. Für die Wechselwirkung von Mba1 mit neu synthetisiertem Cox2 hingegen, ist die Anwesenheit von Oxa1 essenziell.

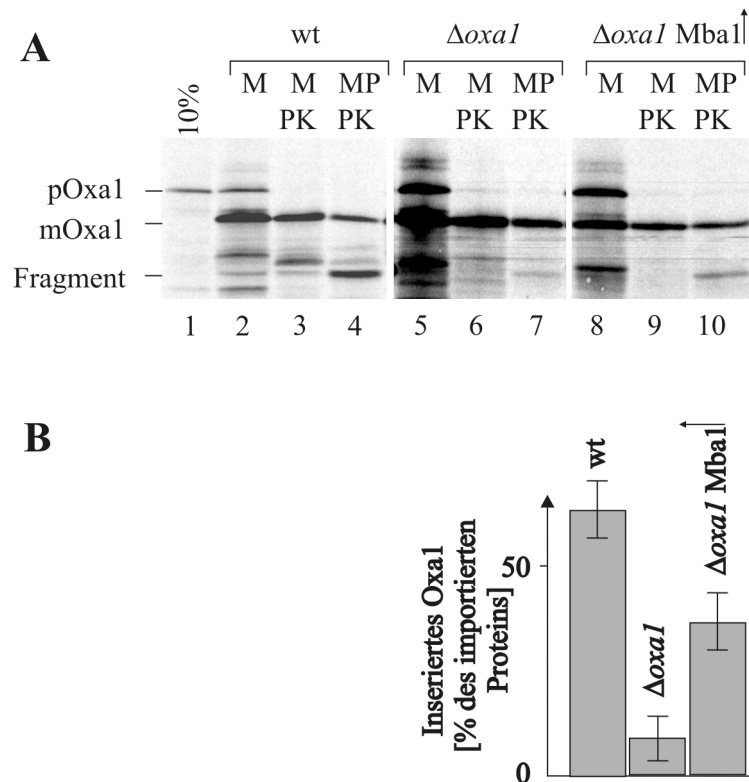


Abbildung 22 Überexpression von Mba1 kompensiert teilweise den Insertionsdefekt von *oxal1*-Mutanten:

(A) In Retikulozyten Lysat synthetisiertes Oxa1-Vorläuferprotein wurde für 15 min bei 25°C in isolierte Wildtyp-, $\Delta oxal1$ - und $\Delta oxal1$ Mba1 \uparrow -Mitochondrien importiert. Die Proben wurden gedrittelt. Mitochondrien (M) wurden mit oder ohne PK inkubiert oder in Mitoplasten konvertiert (MP) und mit PK inkubiert. Spur 1 zeigt 10% des Vorläuferproteins, welches für jede Reaktion verwendet wurde. (B) Das Verhältnis von proteasezugänglichem zu importiertem Oxa1 wurde in 4 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Um eine direkte Oxa1-unabhängige Funktion von Mba1 nachzuweisen, wurde untersucht, inwieweit eine Überexpression von Mba1 den Verlust von Oxa1 kompensieren kann. Die Überexpression von Mba1 unter dem starken TPI-Promotor in $\Delta oxal1$ ($\Delta oxal1$ Mba1 \uparrow) führte nicht zur Wiederherstellung des Wachstums auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Die Überexpression von Mba1 kann somit nicht die volle Funktion von Oxa1 übernehmen. Jedoch ist dieser Stamm wieder in der Lage, neusynthetisiertes Oxa1 in die innere mitochondriale Membran zu inserieren (Abbildung 22 A und B). *In vitro* synthetisiertes Oxa1 Vorläuferprotein wurde in isolierte Wildtyp-, $\Delta oxal1$ - und $\Delta oxal1$ Mba1 \uparrow -Mitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, die äußere Membran durch hypotonisches Schwellen geöffnet und mit Protease behandelt. Die Proben wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert und der Anteil an proteasesensitivem Oxa1 bestimmt (Abbildung 22 B). In Mitochondrien des Stammes $\Delta oxal1$ Mba1 \uparrow wurde der N-Terminus des importierten Oxa1 zu 31±6% über die innere

Membran transportiert. In $\Delta oxal1$ erreichten $7\pm 5\%$ und im Wildtyp $62\pm 6\%$ des N-Terminus den Intermembranraum. Demnach kompensiert Überexpression von Mba1 teilweise die Deletion von Oxa1 bei der Insertion nuklear kodierter Proteine.

4.2 *In vitro*-Charakterisierung der Oxa1-Translokase

Die Proteine der Oxa1/YidC/Alb3-Familie vermitteln die Insertion von Proteinen in die innere Membran von Mitochondrien, Bakterien und Chloroplasten. Die Proteine werden dabei von der Matrixseite in die Innenmembran eingefügt. Bisher konzentrierten sich die Arbeiten zu Oxa1 auf seine Genetik, Funktion und die Identifikation von Substraten. Um tiefere Einblicke in den Aufbau und die Funktionsweise des Oxa1-Komplexes zu erhalten, wurde ein proteinbiochemischer Ansatz gewählt. Die Oxa-Translokase sollte funktionell gereinigt und *in vitro* charakterisiert werden. Die meisten funktionellen und genetischen Untersuchungen zu Oxa1 wurden in *S. cerevisiae* durchgeführt, einem Organismus, der sich hierfür sehr gut eignet. Zur Gewinnung mitochondrialer Proteine im präparativen Maßstab ist der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* jedoch besser geeignet. *N. crassa* lässt sich gut in großen Mengen anziehen, die Zellwände sind leicht durch eine Sandmühle aufzubrechen, und somit können sehr einfach ausreichende Mengen an Mitochondrien isoliert werden, die als Ausgangsmaterial für die Isolierung mitochondrialer Proteine dienen.

4.2.1 Das Oxa1-Protein aus *N. crassa*

Das Gen für das Oxa1-Protein in *N. crassa* wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Frank Nargang (Universität Alberta) identifiziert [121]. Die Proteinsequenz des Oxa1-Proteins aus *N. crassa* und seiner Homologen in *S. cerevisiae* und *Homo sapiens* ist in Abbildung 23 A dargestellt. Die Sequenz des reifen *N. crassa*-Proteins ist zu 22% identisch mit dem reifen Protein aus Hefe und dem vorhergesagten reifen humanen Protein. Trotz der niedrigen Homologie der Primärsequenz zeigen die Vertreter der Oxa1/YidC/Alb3-Familie eine konservierte, ca. 200 Aminosäurereste umfassende Kernregion (Abbildung 23 B). Diese besteht aus fünf Transmembrandomänen, welche in Länge und Abstand hochkonserviert sind. Des Weiteren zeigen die mitochondrialen Vertreter dieser Familie eine hohe Wahrscheinlichkeit in der C-terminalen Matrixdomäne *coiled-coil*-Strukturen auszubilden (Abbildung 23 C; für *N. crassa*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens*).

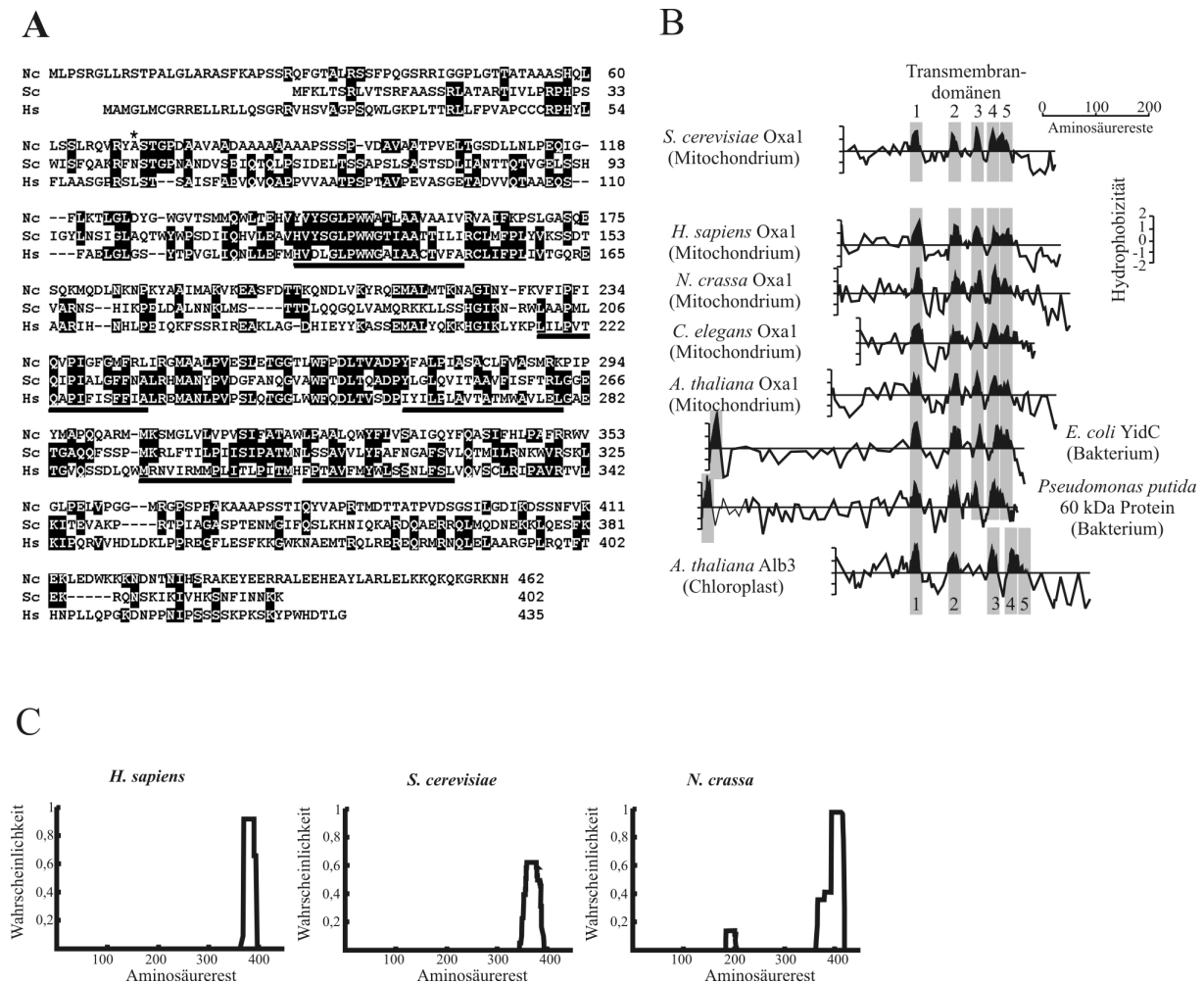


Abbildung 23 *N. crassa* Oxa1 ist Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3-Familie: (A) Sequenzvergleich der Oxa1-Proteine aus *N. crassa* (Nc), *S. cerevisiae* (Sc) und *Homo sapiens* (Hs). Die Nummern der Aminosäurereste sind rechts angegeben. Unterstrichen sind die vorhergesagten Transmembrandomänen. Schwarz hinterlegt sind Aminosäurereste die in zwei oder drei Sequenzen identisch sind. Die erste Aminosäure nach der MPP-Schnittstelle des *N. crassa*-Oxa1 ist mit einem Stern gekennzeichnet (Position 70). (B) Hydrophobizitätsprofil nach Kyte und Doolittle [127] verschiedener Mitglieder der Oxa1/YidC/Alb3-Familie. Grau hinterlegt sind die vorhergesagten Transmembrandomänen. (C) Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von *coiled-coil*-Strukturen in Oxa1-Proteinen aus *H. sapiens*, *S. cerevisiae* und *N. crassa*. Die Vorhersage wurde mit einem Algorithmus von Lupas et al. [128] unter Verwendung einer Fenstergröße von 21 Aminosäureresten durchgeführt.

4.2.2 *N. crassa* Oxa1 kann die Funktion seines Hefehomologen übernehmen

Mutationen des *oxal*-Gens von *S. cerevisiae* sind nicht atmungsfähig [68]. *N. crassa* ist ein rein aerober Organismus und die Deletion des *Oxa1*-Gens ist letal [121]. Um zu überprüfen, ob das Oxa1-Protein von *N. crassa* die Funktion seines Hefehomologen übernehmen kann wurde ein Hefe-Expressionsplasmid konstruiert, welches das *N. crassa* *oxal*-Gen unter der Kontrolle des TPI-Promotors trägt. Hefezellen des *oxal*-Deletionsstammes ($\Delta oxal$) wurden mit diesem Plasmid transformiert, und ihr Wachstum

wurde untersucht (Abbildung 3). Die Hefezellen des Wildtyps, des $\Delta oxal1$ -Stammes und des transformierten $\Delta oxal1$ -Stammes wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und in einer seriellen 1:10-Verdünnung auf Kulturplatten mit Glukose und mit Glycerol getropft. Diese Platten wurden zwei bzw. vier Tage inkubiert. Auf Glukose wuchsen alle Stämme gleich gut. Auf Glycerol konnte wie zu erwarten der $\Delta oxal1$ -Stamm nicht wachsen. Die Expression des *N. crassa* Oxa1 stellte jedoch das Wachstum wieder her.

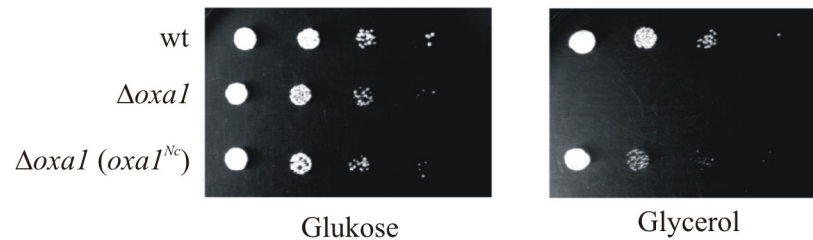


Abbildung 24 *N. crassa* Oxa1 ersetzt *in vivo* sein Hefehomolog: Hefezellen des Wildtyps, $\Delta oxal1$ ohne oder $\Delta oxal1$ mit einem Plasmid für die Expression des *N. crassa* Oxa1-Proteins ($\Delta oxal1(oxa1^{Nc})$) wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in YPD inkubiert. Die Kulturen wurden auf die gleiche optische Dichte eingestellt und in einer seriellen 1:10-Verdünnung auf YP-Kulturplatten mit 2% Glukose oder 2% Glycerol getüpfelt. Die Kulturplatten wurden bei 30°C für zwei Tage (Glukose) oder für vier Tage (Glycerol) inkubiert.

Oxa1 wird in Hefe für die korrekte Insertion und Prozessierung von Cox2 benötigt. In Abwesenheit von Oxa1 bleibt das Cox2-Vorläuferprotein in der Matrix und wird sehr schnell abgebaut. In isolierten Mitochondrien des $\Delta oxal1$ -Stammes lässt sich kein Cox2-Protein nachweisen. Isolierte Hefe-Mitochondrien des Wildtyps, $\Delta oxal1$, $\Delta oxal1(oxa1^{Nc})$ und *N. crassa*-Mitochondrien wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit Antiseren gegen Tom70, Oxa1^{Sc}, Oxa1^{Nc} und Cox2 dekoriert (Abbildung 25). Mitochondrien der Hefezellen, welche das *N. crassa*-Oxa1 exprimieren, enthalten die gleichen Mengen an reifem Cox2 wie der Wildtyp. Somit ist Oxa1 von *N. crassa* in der Lage sein Hefehomolog funktionell zu ersetzen. Die Funktion von Oxa1 scheint somit hochkonserviert zu sein.

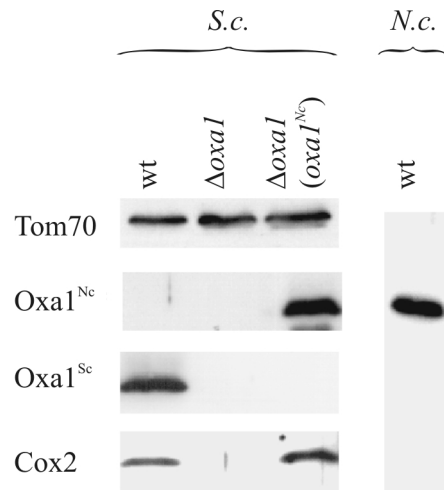


Abbildung 25 *N. crassa* Oxa1 stellt das Wildtyp-Niveau von Cox2 in einer Hefe-*Δoxa1*-Mutante wieder her: Mitochondriale Extrakte (50 µg) der angegebenen Hefe-Stämme wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antiseren gegen Oxa1^{Sc}, Oxa1^{Nc}, Cox2 und Tom70 dekoriert. Tom70 diente als Kontrolle für die Menge an geladenem Protein. Zum Vergleich ist rechts ein Westernblot eines mitochondrialen Extraktes von *N. crassa*-Zellen gezeigt, welcher mit Antiserum gegen *N. crassa* Oxa1 dekoriert wurde.

4.2.3 Reinigung der Oxa1-Translokase aus *N. crassa*-Mitochondrien

Das Oxa1-Protein von *S. cerevisiae* ist Teil eines hochmolekularen Komplexes mit unbekannter Zusammensetzung [48]. Zur genaueren Analyse des Oxa1-Komplexes sollte dieser aus *N. crassa* isoliert werden. In Zusammenarbeit von Prof. Frank Nargang (Universität von Alberta, Canada) wurde der *N. crassa* Stamm K5-15-23-1 konstruiert [121]. Das Oxa1-Protein dieses Stammes ist mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag ausgestattet. Wie schon erwähnt, ist Oxa1 in *N. crassa* essenziell. *N. crassa*-Zellen, die ausschließlich das Oxa1_{his} exprimieren, wachsen wie der entsprechende Wildtyp. Somit ist die Funktion des Oxa1 durch das Tag nicht beeinträchtigt.

Im Allgemeinen wurden 0,5-1,5 g isolierte *N. crassa*-Mitochondrien dieses Stammes zu 10 mg/ml lysiert. Die Lyse erfolgte in Dodecylmaltosid (DDM), einem nichtionischen milden Detergenz. Das geklärte Lysat wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen und gewaschen. Anschließend ließ sich eine stark angereicherte Oxa1-Fraktion von der Säule eluieren (Abbildung 26). Das Proteinmuster der Hauptelutionsfraktion (Abbildung 26, Elutionsfraktion 5) lässt neben der prominenten Oxa1-Bande keine weiteren deutlichen Banden erkennen. Somit wird in dieser Einschrittreinigung kein weiteres Protein koisoliert. Westernblot-Analysen mit Antiserum gegen *N. crassa* Oxa1 zeigen eine starke Anreicherung von Oxa1 in der Hauptelutionsfraktion. Um die Identität der Proteinbande bei 45 kDa zu bestätigen, wurde diese aus dem Gel ausgeschnitten und ein Edman-Abbau durchgeführt. Die

17 N-terminalen Aminosäurereste wurden sequenziert. Die erhaltene Sequenz war ab Aminosäureposition 70 identisch mit der durch das *N. crassa oxal1*-Gen kodierten Sequenz (Abbildung 27). Somit besitzt das *N. crassa*-Oxa1 eine mitochondriale Zielsequenz von 69 Aminosäureresten mit einem Arginin-Rest in -2-Position, was der typischen Erkennungssequenz für die *mitochondrial processing peptidase* entspricht [129].

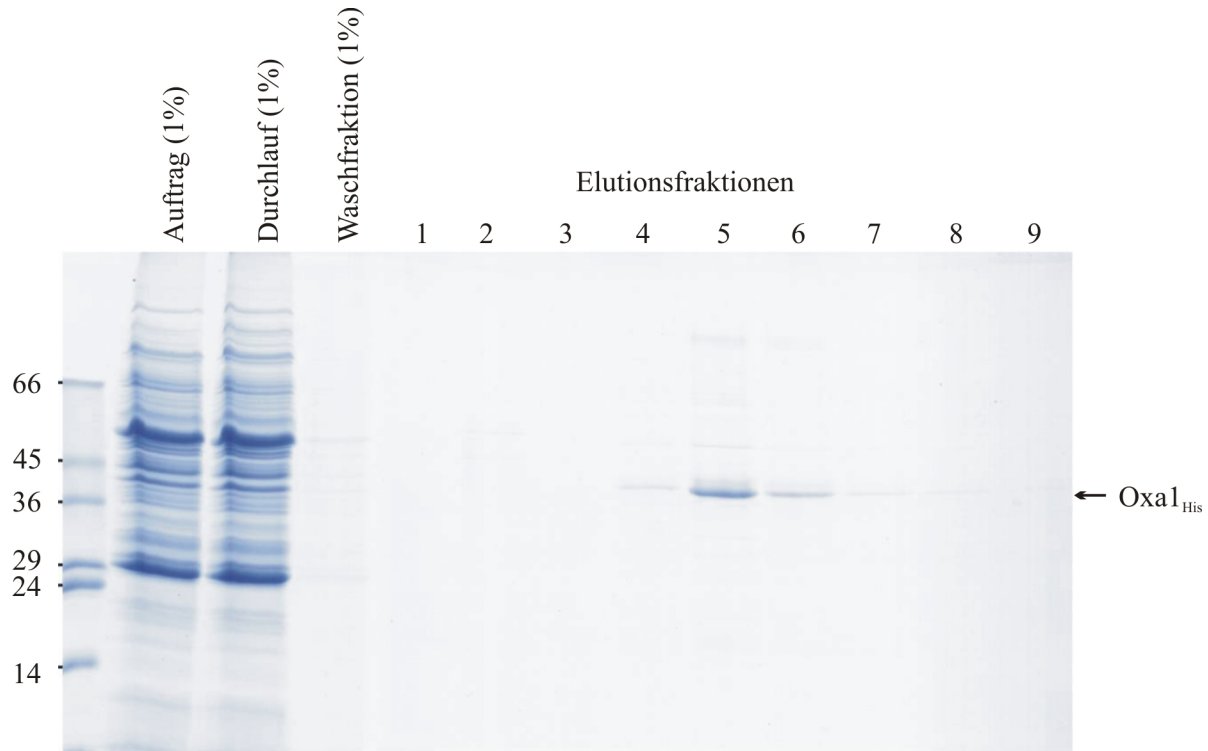


Abbildung 26 **Einschrittreinigung des Oxa1-Proteins aus *N. crassa*:** 0,5 g isolierte Mitochondrien des Stammes K5-15-23-1 wurden zu 10 mg/ml in 1% DDM lysiert. Der erhaltene Extrakt wurde bei 17500 g geklärt und auf eine Ni-NTA-Säule (Bedvolumen 5 ml) aufgetragen. Nach Waschen mit 10 Säulenvolumen Lysepuffer wurde das Oxa1-Protein durch Sprungelution (250 mM Imidazol) eluiert. Ein Teil jeder Fraktion wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Proteinfärbung mit Coomassie-Blue analysiert. Aufgetragen wurden 1% des für die Chromatographie verwendeten Extraktes (Auftrag), 1% des Säulendurchlaufs, 1% der Waschfraktion und je 5% der Elutionsfraktionen. An der linken Seite sind die Molekularmassen der Markerproteine angezeigt.

Aus dem Proteinmuster wurden 10 Banden ausgesucht, einschließlich der Oxa1-Bande und zur Proteinmassenspektrometrieanalyse geschickt. Die 45 kDa Bande wurde erneut als *N. crassa* Oxa1 bestätigt. Des Weiteren wurden das *Woronin Body Major Protein*, die α - und β -Untereinheit der ATPase, die MPP- β -Untereinheit, das *Urease Accessory Protein*, die 20K-

Kette der V-ATPase und drei bislang unbekannte Proteine identifiziert. Computeranalysen dieser drei Proteine zeigten bei keinem Protein eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation. Diese Proteine scheinen somit eher unspezifische Verunreinigungen als spezifische Interaktionspartner von Oxa1 zu sein.

Aus einem Gramm *N. crassa* Mitochondrien konnten zwischen 0,5 und 2 mg Oxa1-Protein isoliert werden. Das Oxa1-Protein macht somit mindestens 0,05-0,2% des gesamten mitochondrialen Proteins aus.

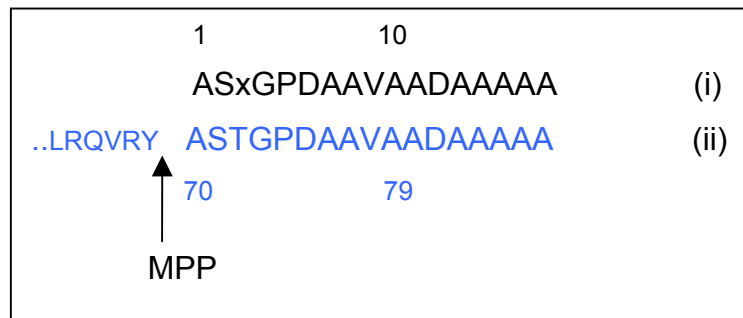


Abbildung 27 Aminosäuresequenz des N-Terminus des gereinigten Proteins: Das isolierte Protein wurde aus einem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten, und die 17 N-terminalen Aminosäurereste wurden durch Edman-Abbau identifiziert. Zeile (i) zeigt die erhaltene Sequenz und (ii) die korrespondierende Sequenz, die vom *N. crassa oxal*-Gen kodiert wird. Der Aminosäurerest an Position 3 des isolierten Proteins („x“) konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Der Pfeil zeigt die MPP-Schnittstelle in der Oxa1-Sequenz an.

4.2.4 *N. crassa*-Oxa1 ist Bestandteil eines homooligomeren Komplexes

Um die Größe des Oxa1-Komplexes in *N. crassa* zu bestimmen und mit der Größe des gereinigten Oxa1-Komplexes zu vergleichen, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Isolierte Wildtyp-Mitochondrien wurden in 1% DDM lysiert, der Extrakt durch Ultrazentrifugation geklärt und über eine Superose6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Analog wurde gereinigtes Oxa1-Protein nach der Ni-NTA-Chromatographie (4.2.3) fraktioniert. In beiden Fällen wurde das Oxa1-Protein in den Fraktionen zwischen 200-300 kDa nachgewiesen (Abbildung 28). Der gereinigte Komplex enthält nur Oxa1, und somit scheint das Protein einen homooligomeren Komplex zu bilden, welcher aus mehreren Oxa1-Untereinheiten aufgebaut ist.

Die Solubilisierung von Membranproteinen mit milden Detergenzien wie z.B. DDM führt zu Komplexen, die eine signifikante Menge an gebundenen Lipiden und Detergenzmolekülen enthalten [130]. Demnach ist eine präzise Größenbestimmung von Membranproteinen durch Gelfiltration nicht möglich. Die für den Oxa1-Komplex gefundene molekulare Masse wäre mit einer Stöchiometrie von vier Oxa1-Untereinheiten je Komplex

kompatibel. Je nach Gewichtsanteil der gebundenen Detergenzmicellen kann aber eine tri- oder dimere Struktur des Oxa1-Komplexes nicht ausgeschlossen werden.

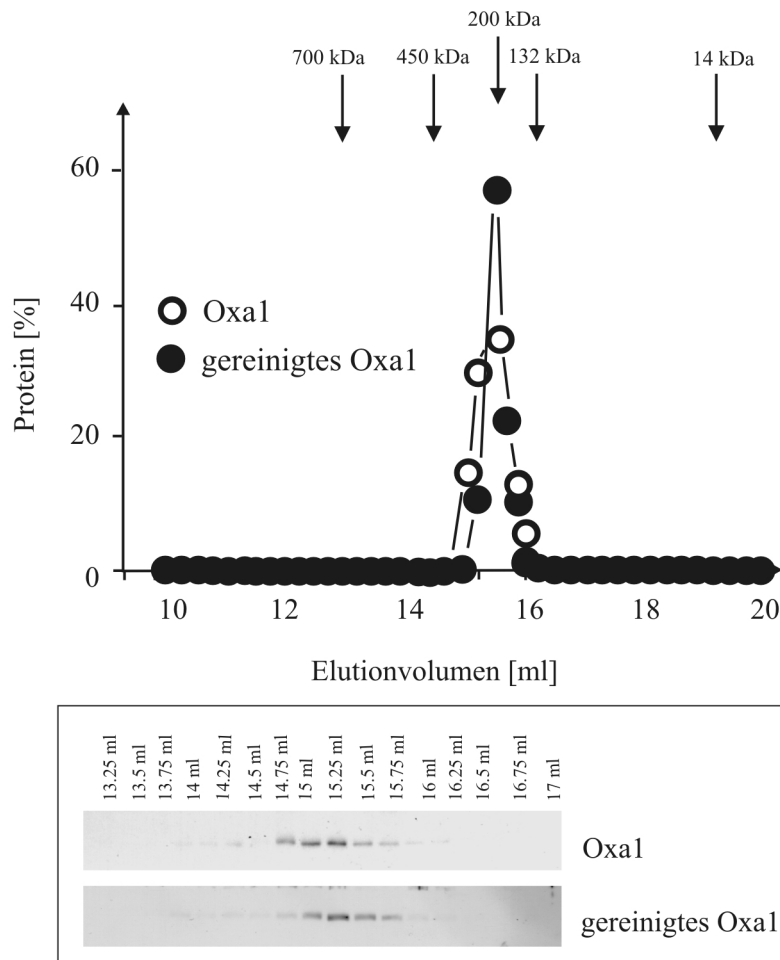


Abbildung 28 *N. crassa* Oxa1 bildet einen höhermolekularen Komplex: Wildtyp-Mitochondrien wurden in 1% DDM zu 1,2 mg/ml lysiert. Der Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation geklärt und eine Gelfiltration auf einer Superose6-Säule durchgeführt. Analog wurde eine Gelfiltration mit 1 µg gereinigtem Oxa1 durchgeführt. Es wurden Fraktionen von 250 µl gesammelt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit TCA gefällt und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot analysiert. Die untere Box zeigt die erhaltenen Signale nach Immundekoration mit Antiserum gegen Oxa1^{Nc}. Die Signale wurden quantifiziert und in Bezug auf das gesamteluierte Protein aufgetragen (obere Grafik). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards, welche in einem parallelen Lauf erhalten wurden, sind durch die Pfeile angezeigt.

4.2.5 Rekonstitution der Oxa1-Translokase in künstliche Lipidvesikel

Die recht einfache Architektur des Oxa1-Komplexes schien sehr vielversprechend für eine funktionelle Rekonstitution zu sein. Die Rekonstitutionsstrategie ist in Abbildung 29 schematisch dargestellt. Das gereinigte Oxa1-Protein wurde mit in NaCl-haltigem mit gelösten *E. coli*-Lipiden gemischt und für eine halbe Stunde bei 4°C unter Rühren inkubiert. Parallel wurde als Kontrolle ein Rekonstitutionsansatz ohne Oxa1-Protein angesetzt. Die

Bildung von Proteoliposomen bzw. Lipidvesikeln wurde durch den Entzug des Detergenz eingeleitet. Die Entfernung des Detergenz erfolgte durch Adsorbtion an BioBeads™. Diese Polystyrol-*Beads* wurden schon erfolgreich bei der Rekonstitution und 2D-Kristallisation eingesetzt [131-133].

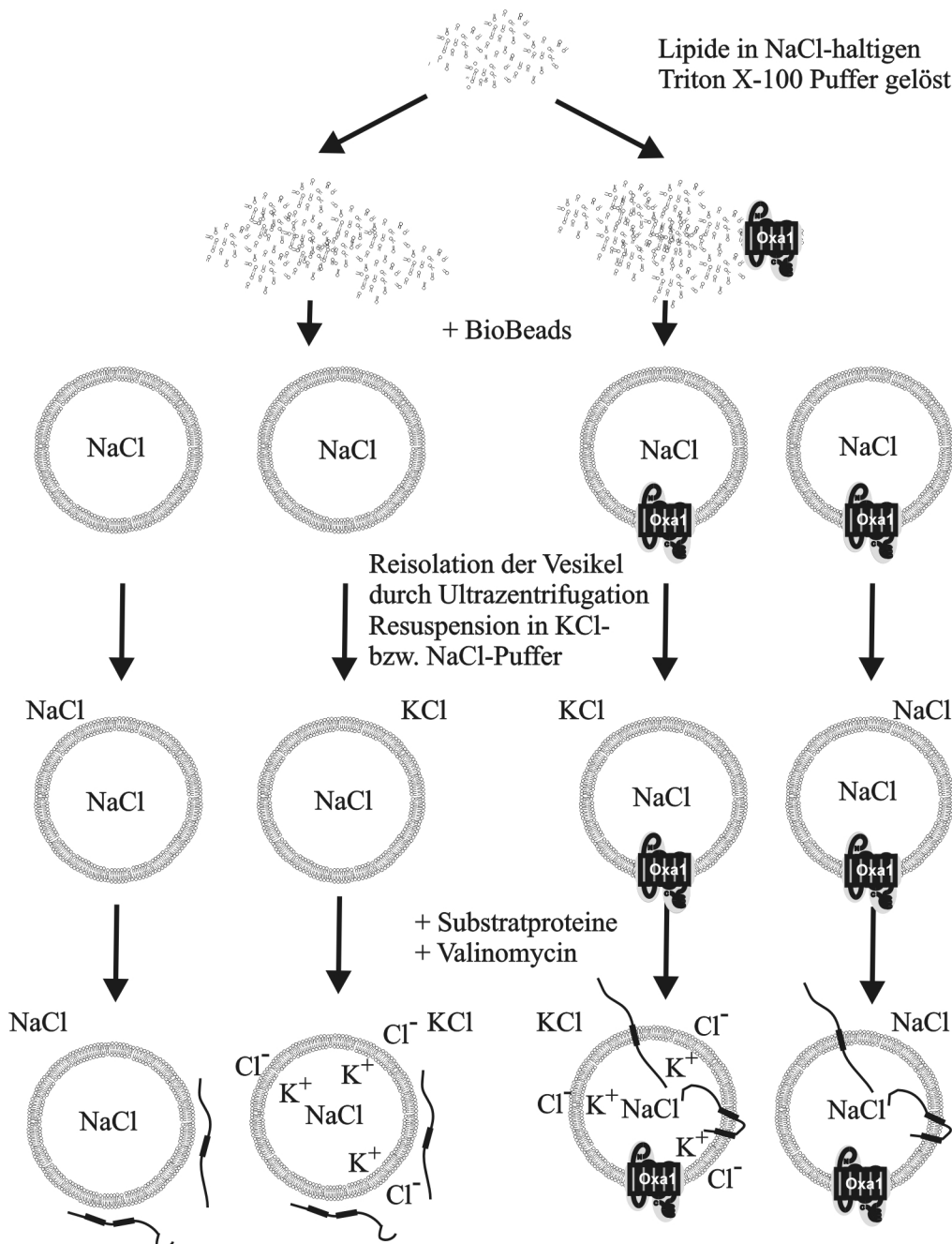


Abbildung 29 Rekonstitutionsschema: Details im Text.

Nach vollständiger Entfernung des Detergenz zeigte eine deutliche Trübung der Lösung die Bildung von Proteoliposomen bzw. Lipidvesikeln an. Die Ansätze wurden geteilt und die Vesikel durch Ultrazentrifugation isoliert. Die Proteoliposomen und Lipidvesikel

wurden in NaCl-haltigem bzw. KCl-haltigem Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe der radioaktiv markierten Substratproteine wurde jedem Reaktionsansatz 10 μ M Valinomycin zugefügt. Valinomycin ist ein Kaliumionophor. Somit wird bei allen in KCl-haltigen Puffer resuspendierten Vesikeln ein Kalium-Diffusions-Potential über die Vesikelmembran erzeugt, welches das Membranpotential über die mitochondriale Innenmembran imitiert.

Der Nachweis der Insertion der Substratproteine in die künstlichen Lipidvesikel erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Zum einen wurde die Integration in die Lipidmembran durch Carbonatextraktion und anschließender Flotation nachgewiesen, zum anderen diente die Entstehung spezifischer Fragmente nach PK-Behandlung der Vesikel als Nachweis.

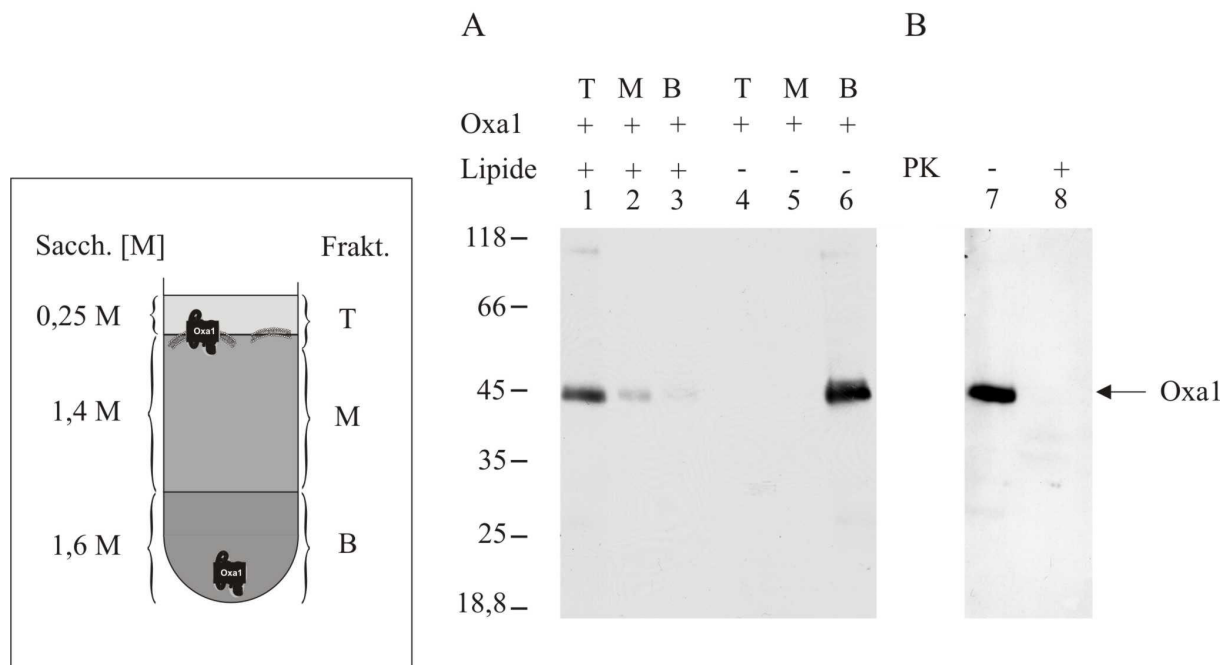


Abbildung 30 Gereinigtes Oxa1 wird in *E. coli*-Lipidvesikel in einer N_{innen}-C_{außen}-Topologie rekonstituiert: (A): Proteoliposomen mit Oxa1^{Nc} wurden mittels Ultrazentrifugation reisoliert und mit 0,1 M Na₂CO₃ behandelt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge nicht rekonstituiertes Oxa1 mit 0,1 M Na₂CO₃ behandelt. Die Proben wurden in einem Saccharose-Gradienten flотиert. Der Gradient ist in der linken Box dargestellt. Es wurden drei Fraktionen (T, M und B) gesammelt und die Proteine mit TCA gefällt. Die Proteine wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferriert. Die Membran wurde mit einem C-terminalen Oxa1^{Nc}-Antiserum dekoriert. (B): In Proteoliposomen rekonstituiertes Oxa1 wurde mit 1 μ g/ml Proteinase K für 30 min auf Eis behandelt. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferriert. Die Membran wurde mit einem C-terminalen Oxa1^{Nc}-Antiserum dekoriert.

Ebenso wurde die Rekonstitution von Oxa1 in die Lipidvesikel überprüft. Da die Substratproteine bei den Insertionsexperimenten von außen zugegeben werden, muss Oxa1 mit der Matrixseite nach außen in den Vesikeln vorliegen. Nach Carbonatextraktion und Flotation wurde Oxa1 fast ausschließlich in der Membranfraktion nachgewiesen (Abbildung 30; A, Spuren 1-3), wohingegen nicht rekonstituiertes Oxa1 am Boden des Gradienten verblieb (Abbildung 30; A, Spuren 4-6). Somit wurde bei der Rekonstitution Oxa1 erfolgreich in die Lipidmembran integriert. Die Orientierung von Oxa1 wurde durch Proteasebehandlung überprüft. Oxa1-Proteoliposomen wurden für 30 min mit Protease auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot analysiert. Die Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem Antiserum gegen den Oxa1 C-Terminus zeigt, dass dieser für Protease zugänglich ist und sich somit auf der Außenseite der Vesikel befindet (Abbildung 30; B, Spuren 7-8).

Als erstes Substrat für die rekonstituierte Oxa1-Translokase wurde die Untereinheit 8 der F_1F_0 -ATPase (ATPase8) gewählt. Es handelt sich um ein sehr kleines Protein, welches aus einer Transmembrandomäne und sehr kurzen N- und C-terminalen Bereichen besteht. Der N-Terminus enthält keine Ladungen, während der C-Terminus drei positive Ladungen trägt (Abbildung 31). Somit müssen keine großen oder geladenen Domänen über die Membran transportiert werden.

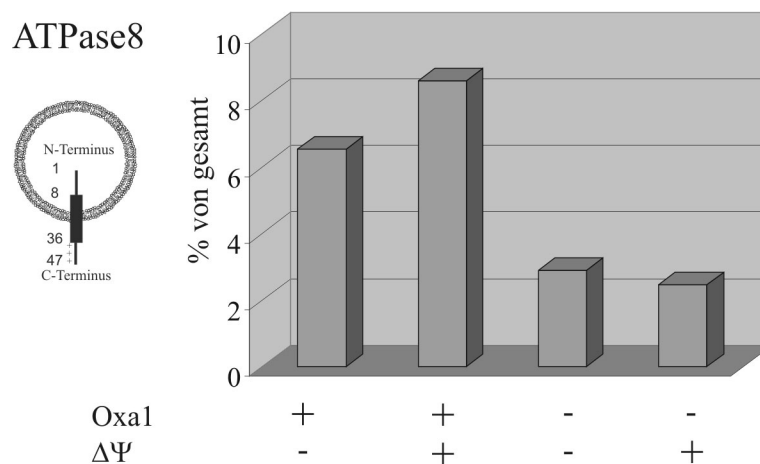


Abbildung 31 Oxa1^{Nc} verstärkt die Insertion von ATPase8 *in vitro*: Proteoliposomen mit Oxa1^{Nc} und künstliche Lipidvesikel wurden mit radioaktiv markiertem ATPase 8-Protein für 20 min bei 25°C inkubiert. Die Vesikel wurden bei 120000 g reisoliert und mit 0,1 M Na_2CO_3 behandelt. Die Proben wurden durch einen Saccharose-Gradienten flotiert. Die Membranfraktion am oberen Ende des Gradienten wurde abgenommen, die enthaltenen Proteine durch den Zusatz von TCA gefällt und mittels Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert. Das radioaktive Signal für die ATPase 8 wurde quantifiziert und im Verhältnis zum eingesetzten Protein aufgetragen. $\Delta\Psi$: (+) Aufbau eines Kaliumdiffusionspotentials, (-) ohne Potential.

Das Insertionsexperiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der Insertion erfolgte hier durch Carbonatextraktion und anschließender Flotation. In Abwesenheit von Oxa1 erhält man eine Insertion von ca. 2% bezogen auf das gesamte eingesetzte Substrat. Drei bzw. viermal mehr ATPase 8 inserierte in Anwesenheit von Oxa1 in die Membranen (Abbildung 31). Dies ist in Einklang mit *oxa1*-Mutanten in Hefe: In Abwesenheit von Oxa1 ist die Biogenese der ATPase nicht vollständig gehemmt erfolgt aber mit deutlich erniedrigter Effizienz (siehe 4.1.7). Somit ist auch *in vivo* eine Oxa1-unabhängige Insertion der ATPase8 möglich.

Das zweite getestete Substrat war ein N-terminales Fragment des reifen Oxa1^{Sc} von Aminosäurerest 43 bis Aminosäure 200 (Abbildung 32). Der über die Membran zu transportierende N-Terminus dieses Substrates ist 89 Aminosäurereste lang und besitzt sechs negative Ladungen. Somit sollte die Rate der spontanen Insertion geringer sein als die der ATPase 8. Um das korrekt inserierte Substrat auch nach Proteaseverdau noch mittels Autoradiographie nachweisen zu können, wurden der Sequenz N-terminal vier Methionine angefügt da die Oxa1^{Sc}-Proteinsequenz zwischen Aminosäureposition 43 und 200 lediglich drei Methionine enthält. Zwei davon befinden sich C-terminal nach der ersten Transmembrandomäne.

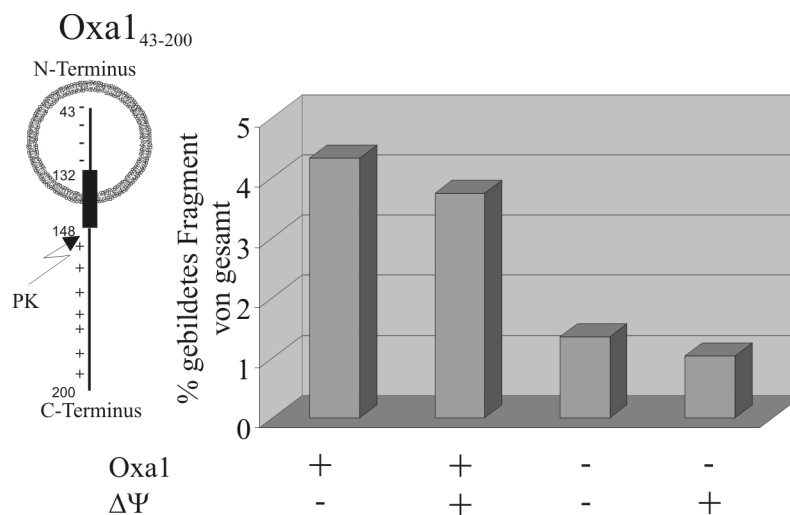


Abbildung 32 Oxa1^{Nc} inseriert Oxa1⁴³⁻²⁰⁰ *in vitro*: Proteoliposomen mit Oxa1^{Nc} und künstliche Lipidvesikel wurden mit radioaktiv markiertem Oxa1⁴³⁻²⁰⁰-Protein für 20 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Vesikel 30 min auf Eis mit oder ohne 10 µg/ml PK inkubiert. Der Verdau wurde durch PMSF gestoppt und die Vesikel bei 120000 g reisoliert. Die Proben wurden mittels Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert. Das Signal des erhaltenen Fragmentes wurde quantifiziert, der Verlust von zwei Methioninen korrigiert und im Verhältnis zum gesamten eingesetzten Protein aufgetragen. ΔΨ: (+) Aufbau eines Kaliumdiffusionspotentials, (-) ohne Potential.

Das Insertionsexperiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt, und die Insertion von Oxa1⁴³⁻²⁰⁰ mittels Proteasebehandlung nachgewiesen. In Lipidvesikeln ohne Oxa1, lässt sich lediglich eine Insertion von 1% nachweisen. In rekonstituierten Oxa1-Proteoliposomen vervierfacht sich die Insertionseffizienz auf ~4%. Der Aufbau eines Membranpotentials ($+\Delta\Psi$) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Insertionseffizienz.

Somit lässt sich die Oxa1-Translokase in einer N_{innen}-C_{außen}-Orientierung in künstliche Lipidvesikel rekonstituieren. ATPase8 und Oxa1⁴³⁻²⁰⁰ werden Oxa1-abhängig inseriert. Die Gesamtinsertionseffizienz ist zwar niedrig, aber signifikant. Demnach ist Oxa1 alleine in der Lage Proteine in Lipidmembranen zu inserieren.

4.2.6 Elektrophysiologische Untersuchungen der OXA-Translokase

Die OXA-Translokase inseriert Membranproteine von der Matrixseite in die innere Membran von Mitochondrien. Neben der Insertion von hydrophoben Transmembrandomänen in die Membran muss Oxa1 auch zum Teil sehr große hydrophile und geladenen Domänen in den Intermembranraum exportieren. Wie kann dies mechanistisch geschehen? Der TOM-Komplex, der als generelle Importpore der äußeren Membran alle zu importierenden Proteine über die Membran transportiert, bildet eine wässrige Pore [134]. Diese Pore lässt sich in elektrophysiologischen Experimenten nachweisen und charakterisieren [11, 12, 134, 135]. Durch eine solche Pore könnten auch große Intermembranraumdomänen exportiert werden.

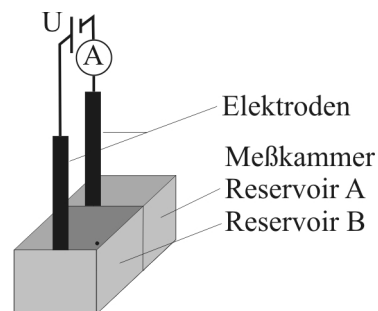


Abbildung 33 Elektrophysiologie-Messkammer: Die Teflon-Messkammer bestand aus zwei Reservoirs, die durch ein 0,5 mm großes Loch verbunden waren. Die Reservoirs fassten je 5 ml Puffer-Lösung. Über 2 Ag/AgCl-3 M KCl-Elektroden konnte eine Gleichspannung bis 500 mV angelegt werden. Mittels eines Strom/Spannungsverstärkers wurden die Stöme um den Faktor 10^9 verstärkt und mittels eines Einkanalschreibers aufgezeichnet.

Das Konzept einer offenen Pore ist aber nicht direkt von der Außen- auf die Innenmembran übertragbar. Eine solche Pore würde wahrscheinlich zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials führen. Eine Translokationspore in der Innenmembran sollte daher reguliert sein. Die Regulation kann z.B. durch das zu

transportierende Substrat selbst erfolgen. Im künstlichen System der Elektrophysiologie (Abbildung 33) lässt sich die Leitfähigkeit von Poren durch die angelegte Spannung beeinflussen. In einer mit 1 M KCl gefüllten Elektrophysiologie-Messkammer (Abbildung 33) wurde eine stabile schwarze Lipidmembran gezogen. Gereinigtes Oxa1 wurde in beide Reservoirs zugegeben und eine Spannung von 20 mV angelegt. Sehr kurze in sehr großen Abständen erscheinende Spannungsspitzen zeigten möglicherweise den Einbau von Protein in die Membran an. Kein weiterer nennenswerter Stromfluss war zu beobachten (nicht gezeigt). Wurde die Spannung von 20 mV auf 70 mV erhöht, kam es dagegen zu einer starken Aktivität. Es wurden Ströme von mehr als 430 pA gemessen (Abbildung 34). Das erhaltene Strommuster lässt sich durch Poren erklären, die sehr schnell öffnen und schließen. Wurde die angelegte Spannung wieder auf 20 mV erniedrigt, verebbte der Stromfluss über die Membran. Die Poren schlossen wieder. Über Membranen, denen anstelle von Oxa1 die gleiche Menge an Puffer zugesetzt wurde, konnte kein Stromfluss beobachtet werden (nicht gezeigt). Somit ist der beobachtete Stromfluss spezifisch für die Zugabe des gereinigten Oxa1, welches spannungsabhängige ionenleitende Kanäle in der schwarzen Membran bildet.

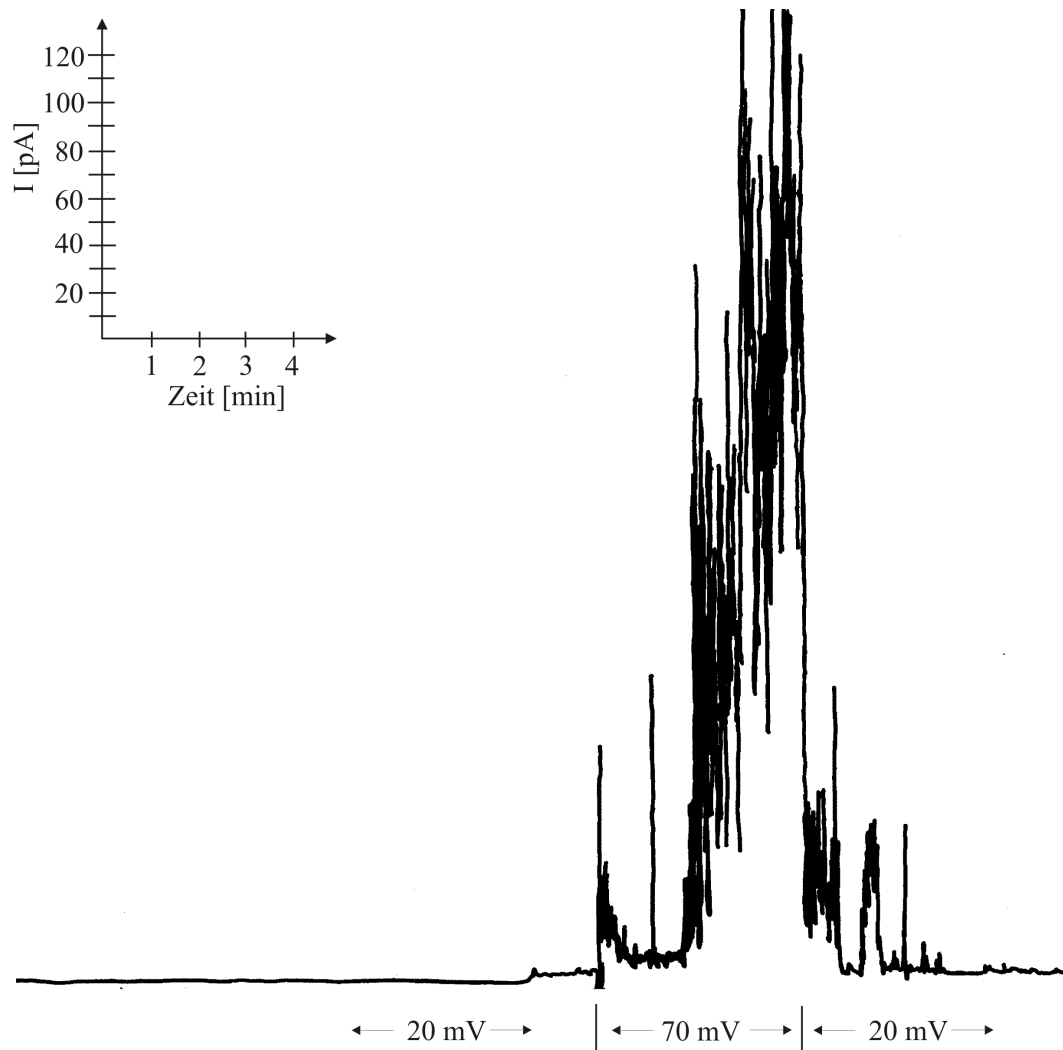


Abbildung 34 Spannungsabhängiger Stromfluss in Lipidmembranen nach Oxa1-Zugabe: In einer Elektrophysiologie-Messkammer wurde eine schwarze Membran aus Diphytanoylphosphatidylcholin/n-Butanol (Diph-PC/n-Butanol 9:1) gebildet. Die Reservoirs der Kammer waren mit je 5 ml 1 M KCl befüllt. Es wurde eine Spannung von 20 mV angelegt und je 5 μ l einer Elutionsfraktion der Oxa1-Reinigung (Proteinkonzentration: 1-2 mg/ml) zugefügt. Der Stromfluss über die Membran wurde mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Nachdem sich eine ruhige Basislinie eingestellt hatte wurde die Spannung auf 70 mV erhöht. Nach 4 min wurde die Spannung wieder auf 20 mV erniedrigt.

Oxa1 vermittelt die Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen. Es interagiert mit seinen Substraten noch während diese an Ribosomen synthetisiert werden [49, 111]. Neueren Untersuchungen zufolge bindet der C-Terminus von Oxa1 an Ribosomen [36, 37]. Eine solche Bindung könnte ein Auslöser für eine konformelle Änderung sein, die zur Öffnung der Translokationspore führt und somit den Substraten die kotranslationale Insertion in die Membran erlaubt.

Oben wurde gezeigt, dass die Erhöhung der angelegten Spannung zur kurzzeitigen Öffnungen der Oxa1-Translokase führt. Sollte die Bindung von Ribosomen an Oxa1 zur

Öffnung der Pore führen, könnte eventuell schon bei niedriger Spannung ein Stromfluss über die Membran zu beobachten sein.

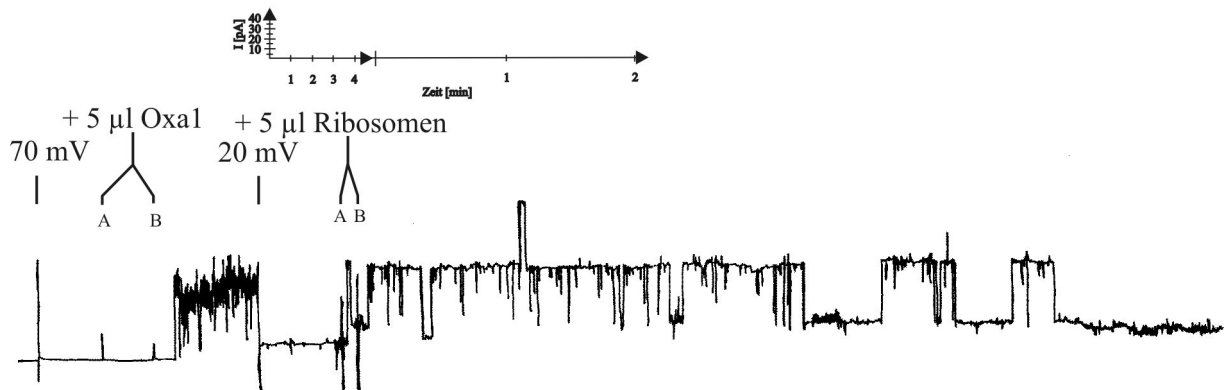


Abbildung 35 Oxal1-Kanäle werden durch Zugabe von mitochondrialen Ribosomen stimuliert: In einer Elektrophysiologie-Messkammer wurde eine schwarze Membran aus Diphytanoylphosphatidylcholin/n-Butanol (Diph-PC/n-Butanol 9:1) gebildet. Die Reservoirs der Kammer waren mit je 5 ml 1 M KCl befüllt. Es wurde eine Spannung von 20 mV angelegt und 10 min eine stabile Basislinie beobachtet. Die Spannung wurde auf 70 mV erhöht und je 5 µl einer gereinigten Oxal1-Fraktion (~ 0,5 mg/ml) in Reservoir A und B gegeben. Nach Einbau von Oxal1 in die Membran wurden die Spannung auf 20 mV reduziert und jeweils 5 µl isolierte Ribosomen in Reservoir A und B zugefügt. Die Vorschubgeschwindigkeit des Einkanalschreibers wurde erhöht (siehe Zeitachse) und der fließende Strom aufgezeichnet.

In einer mit 1 M KCl befüllten Messkammer wurde eine schwarze Lipidmembran (Diph-PC/n-Butanol) gezogen und für 10 min eine stabile Basislinie bei 20 mV beobachtet. Die Spannung wurde auf 70 mV erhöht, und nach 3 min wurde je 5 µl gereinigtes Oxal1 zu Reservoir A und B gegeben (Abbildung 35). Der Einbau und das Öffnen wurde 4 min beobachtet und die Spannung auf 20 mV erniedrigt. Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurden je 5 µl isolierte mitochondriale Ribosomen in Reservoir A und B zugegeben. Die Schreibergeschwindigkeit wurde erhöht (Änderung der Zeitachse in Abbildung 35). Es stellte sich ein relativ konstanter Stromfluss über die Membran von ~65 pA bzw. ~130 pA ein. Das entspricht einer Leitfähigkeit von 3,25 nS bzw. 6,5 nS, welche sich deutlich von *N. crassa* Porin unterscheidet, welches bei 20 mV eine Leitfähigkeit von 4 nS zeigt [135]. Der Stromfluss endete nach ca. 5 min. Die Zugabe von gereinigten Ribosomen zu schwarzen Membranen ohne Oxal1 führte zu keinem Stromfluss. Ob nun einzig die Bindung der Ribosomen an Oxal1 oder die Translokation der noch in den Ribosomen haftenden naszierenden Ketten zur Öffnung des Kanals führte, lässt sich hieraus nicht ableiten. Das Schließen der Kanäle deutet jedoch darauf hin, dass die Bindung der Ribosomen nicht der

einziges Grund zum Öffnen der Kanäle ist. Eventuell werden die noch an den Ribosomen haftenden naszierenden Ketten über die Membran transportiert und nach Beendigung dieses Prozesses die Poren wieder geschlossen.

Oxa1 scheint als Translokase der Innenmembran spannungsabhängige Öffnungen in der Membran zu generieren. Diese Öffnungen lassen sich durch die Zugabe von isolierten Ribosomen schon bei niedriger Spannung induzieren und stabilisieren.

5 Diskussion

5.1 Mba1, eine neue Komponente der Proteininsertionsmaschinerie der Innenmembran

5.1.1 Der Oxa1-unabhängige Insertionsweg

Die mitochondriale Innenmembran beinhaltet eine Reihe von Proteinen, deren hydrophile Intermembranraumdomänen in einem Exportschritt über die Membran transportiert werden [28, 44, 136]. Einige dieser Proteine sind kernkodiert, und werden vor der Membraninsertion erst vollständig in die Matrix importiert. Der andere Teil ist mitochondrial kodiert und wird während oder nach seiner Translation in die Innenmembran inseriert. Die einzige bisher identifizierte Komponente dieser Exportmaschinerie ist das Innenmembranprotein Oxa1. Oxa1 interagiert direkt mit exportierten Polypeptiden [48] und scheint eine generelle Rolle bei der Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen in die Innenmembran zu übernehmen [49]. Dennoch scheint die Abhängigkeit der Membraninsertion von Oxa1 zwischen den verschiedenen Substraten zu variieren [49], und in *oxa1*-Mutanten wurden noch Restaktivitäten sowohl des *bc₁*-Komplexes als auch des ATPase-Komplexes beobachtet [86]. Des Weiteren ist zwar *in vitro* die Membraninsertion von Oxa1-Vorläuferprotein vom Vorhandensein von endogenem Oxa1 abhängig, jedoch komplementiert die Transformation einer Δ *oxa1*-Mutante mit einem Oxa1-Überexpressionsplasmid den Δ *oxa1*-Wachstumsphänotyp [84]. Sollte die Insertion von Oxa1 exklusiv von vorhandenem Oxa1-Protein abhängig sein, wäre eine solche Komplementation nicht möglich. Und letztlich spricht die Existenz von Suppressormutanten, welche in einem Δ *oxa1*-Hintergrund eine funktionelle Atmungskette ausbilden können [123], für die Möglichkeit eines alternativen Oxa1-unabhängigen Weges.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Mba1 als eine Komponente identifiziert, die für diesen Oxa1-unabhängigen Weg notwendig ist. Es wurde gezeigt, dass Mba1 in direktem Kontakt mit Insertionsintermediaten steht. Mba1 ist wie Oxa1 für die effiziente Insertion von mitochondrial kodierten und kernkodierten Proteinen wichtig. Beide Faktoren, Oxa1 und Mba1, besitzen nicht nur gemeinsame Substrate, sondern haben möglicherweise auch ähnliche Funktionen. In Anwesenheit von Oxa1 ist Mba1 überwiegend entbehrlich. Lediglich eine leichte Wachstumsverzögerung und geringe Insertionsdefekte sind bei Abwesenheit von Mba1 zu beobachten. Die Doppelmutante hingegen, der Mba1 und Oxa1 fehlen, zeigt sehr drastische Wachstumsdefekte, selbst auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Die Defekte

sind wesentlich stärker als die der Einzelmutanten. Somit können beide Proteine unabhängig auf unterschiedlichen Insertionswegen arbeiten. Zwar kann Mba1 selbst bei einer Überexpression Oxa1 nicht vollständig ersetzen, aber es mindert den Insertionsdefekt des Oxa1-Vorläuferproteins in *oxa1*-Mutanten.

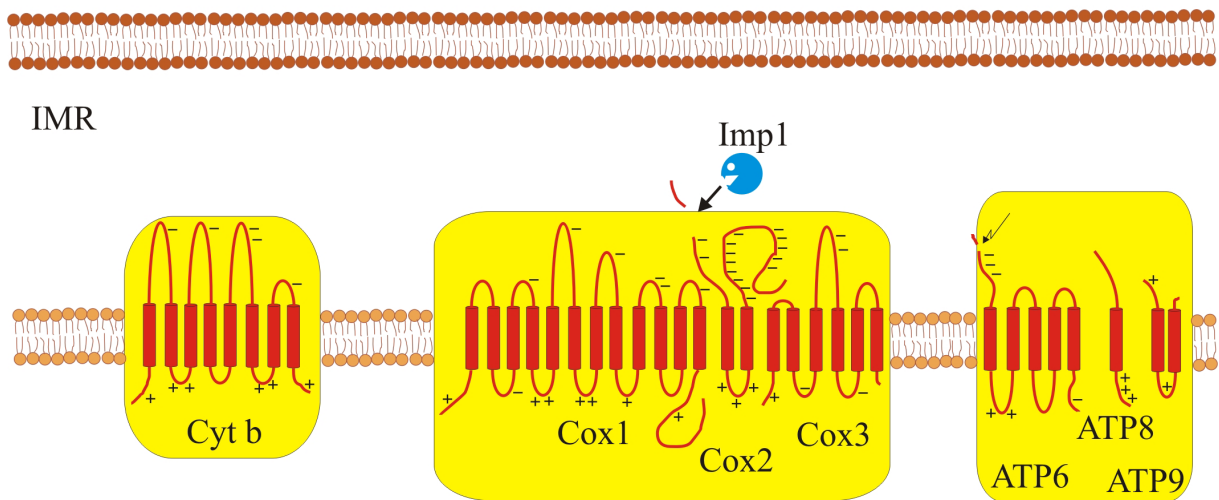
5.1.2 Insertion mitochondrial kodierter Proteine

Oxa1 und Mba1 interagieren beide mit den naszierenden Polypeptidketten von Cox1, Cox2, Cox3 und Cytochrom *b*. Interessanterweise ist die Insertion der Proteine Cytochrom *b* und Cox3 in der *mba1*-Mutante stärker betroffen als in der *oxa1*-Mutante, wohingegen die Cox2-Insertion in der *oxa1*-Mutante sehr viel drastischer reduziert ist. Anscheinend bevorzugen diejenigen Proteine Mba1, die bei ihrer Insertion weniger Nettoladung über die Membran exportieren (Abbildung 36). Oxa1 hingegen scheint vor allem für den Export von stark geladenen Domänen nötig, wie z.B. für die beiden Cox2-Termini. Dass die Nettoladungen der zu exportierenden Proteindomänen eine wichtige Rolle für die Membraninsertion spielen, wurde an der nuklear kodierten Untereinheit 9 (Su9) von *N. crassa* untersucht [25, 28]. Der N-Terminus von Su9 zeigt eine Nettoladung von -1. Su9-Mutanten, in denen die Ladung des Aminoendes neutralisiert oder in eine positive umgewandelt wurde, zeigen einen deutlich reduzierten Export des N-Terminus in den Intermembranraum [25]. Im Gegensatz zu unveränderten Su9-Proteinen hängt die verbleibende Insertion aber nicht mehr von Oxa1 ab [137]. Entsprechend führte die Erhöhung der negativen Nettoladung auf -2 zu einem effizienteren Export und einer stärkeren Abhängigkeit von Oxa1 [137]. Somit scheint die Ladung der zu exportierenden Domäne zu bestimmen, ob der Export abhängig oder unabhängig von Oxa1 erfolgt. Interessant wäre hier zu untersuchen, ob die Su9-Mutanten, die Oxa1 nicht benötigen, eine verstärkte Abhängigkeit von Mba1 zeigen. Eine weitere interessante Beobachtung machten Dujardin und ihre Mitarbeiter [138]: Die Defekte der *oxa1*-Mutanten können durch die Expression von manchen Innenmembranproteinen, welchen positive Ladungen in ihren Transmembrandomänen eingefügt wurden, supprimiert werden. Es wird vermutet, dass diese positive Ladungen mit den negativen Ladungen in den zu exportierenden Domänen interagieren und somit den Oxa1-unabhängigen Export ermöglichen. Für die Suppression ist dabei die Anwesenheit von Mba1 essenziell. Somit scheinen die sonst Oxa1-abhängigen Proteine in diesen Suppressoren über den Mba1-Weg inseriert werden zu können.

Das Überlappen des Substratspektrums der beiden Insertionswege erlaubt die Insertion der Proteine auch in Abwesenheit von Mba1 oder Oxa1. Werden jedoch durch gleichzeitige

Deletion von Mba1 und Oxa1 beide Wege ausgeschaltet, hat das drastische Auswirkungen auf die Zelle. Es kommt zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität der Atmungskettenkomplexe und der F_1F_0 -ATPase, welches zu einem verminderten Wachstum selbst auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen führt. Dies ist wohl auf den Abbau von zellulärem ATP durch die entkoppelte F_1 -ATPase zurückzuführen [139]. Selbst wenn Oxa1 nur teilweise defekt ist, wie in der *oxa1^{ts}*-Mutante, ist Mba1 für die Erhaltung der Zellatmung erforderlich (siehe 4.1.6). Somit scheint ein Großteil der Proteine in Abwesenheit von funktionellem Oxa1 auf den Mba1-abhängigen Insertionsweg umgeleitet zu werden.

Zytosol



Matrix

Abbildung 36 Mitochondrial kodierte Proteine und ihre Topologie in der Innenmembran: Die Topologien der Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom-Oxidase wurden durch Sequenzvergleiche der Hefepoteine mit den korrespondierenden bovinen Sequenzen und deren Kristallstruktur erhalten. Die Lage der Membrandomänen der Untereinheit 8 und 9 der F_1F_0 -ATPase wurde mit dem TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) vorhergesagt. Die Topologie der Untereinheit 6 der F_1F_0 -ATPase ist aus [140] adaptiert. Die Topologie des Cytochrom b wurde durch Vergleich mit der Kristallstruktur des *bc₁*-Komplexes [141] erhalten. Die Nettoladungen der einzelnen Domänen sind durch die Anzahl der Plus- und Minussymbole dargestellt. IMR: Intermembranraum

5.1.3 Die Rolle von Mba1 beim Export von Proteinen in die Innenmembran

Mba1 ist für die effiziente Insertion verschiedener Innenmembranproteine notwendig. Die genaue molekulare Funktion von Mba1 ist allerdings unklar. Allerdings ist selbst für Oxa1, welches schon seit ca. 10 Jahren untersucht wird, der genaue molekulare Mechanismus noch nicht geklärt. Translokationswege bestehen typischerweise aus drei verschiedenen Typen von Komponenten: Zum einen gibt es Rezeptoren, welche den ersten Kontakt mit den Substraten vermitteln, wie z.B. SRP/FtsY in Bakterien oder die Rezeptoren des TOM-Komplex Tom70, Tom22 und Tom20. Des Weiteren vermitteln porenbildende Komponenten die Translokation über bzw. die Insertion in die Membran, wie z.B. der SecY-Komplex oder der TOM-*core*-Komplex. Letztlich helfen Chaperone transportierten oder inserierten Proteinen solange, bis diese ihre endgültige Konformation in der Membran eingenommen haben und in die entsprechenden Komplexe assembliert sind.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen sind am besten mit einer Rezeptorfunktion von Mba1 kompatibel:

1. Mba1 ist auf der Matrixseite mit der Innenmembran assoziiert und somit zu den zu inserierenden Proteinen hin exponiert.
2. Mba1 interagiert mit naszierenden Ketten während ihrer Synthese am Ribosom.
3. Diese Interaktion ist vorübergehend und erfolgt nur sehr früh in der Biogenese der Substratproteine.

Allerdings ist auch eine eher direkte Funktion von Mba1 am eigentlichen Translokationsvorgang möglich und zukünftige Untersuchungen werden die molekulare Funktion von Mba1 klären müssen.

Interessanterweise ist die Transkription von *MBA1* mit denen der Gene verschiedener Untereinheiten der mitochondrialen Ribosomen koreguliert (Tabelle 5-1). Sieben der neun am besten korrelierenden Transkripte (Korrelationskoeffizient $> 0,7$) kodieren für mitochondriale ribosomale Proteine [142]. Dies deutet darauf hin, dass Mba1 in der Zelle benötigt wird, wenn die mitochondriale Proteinsynthesemaschinerie benötigt wird. Eventuell könnte dies auch eine direkte Interaktion von Mba1 und Ribosomen anzeigen. Ein Hinweis dafür kommt aus kürzlich veröffentlichten Untersuchungen zu Oxa1. Diese zeigen, dass der C-Terminus von Oxa1 direkt mit mitochondrialen Ribosomen interagiert [36, 37]. Der C-Terminus von Oxa1 ist in der Lage *coiled coil*-Domänen auszubilden, welche typischerweise Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Wird nur ein Teil des C-Terminus deletiert (Aminosäurereste 331-

402), zeigen die Hefe-Mutanten keinen Atmungsdefekt [36]. Die zusätzliche Deletion von Mba1 allerdings führt zu einem *pet*-Phänotyp [36]. Dies bedeutet, dass Mba1 den Verlust eines Teils der Ribosomenbindestelle von Oxa1 ausgleichen kann, was durch eine Interaktion zwischen Ribosomen und Mba1 erklärbar wäre. Allerdings blieben Versuche, eine solche direkte Interaktion nachzuweisen bislang erfolglos. Entweder ist die Interaktion zwischen Mba1 und den Ribosomen nur sehr kurzlebig oder zu labil, um in Kollokalisierungsexperimenten nachgewiesen zu werden.

Tabelle 5-1 Mba1 wird mit ribosomalen Proteinen koreguliert: Die neun aufgeführten Gene werden mit *MBA1* koreguliert und zeigen einen Korrelationsfaktor $< 0,7$ [142].

Gen	kodiert für
MRPS9	Protein des mitochondrialen Ribosoms
MRPL24	Protein des mitochondrialen Ribosoms
MAM33	Matrixprotein mit unbekannter Funktion
MRPL6	Protein des mitochondrialen Ribosoms
YDR115w	Protein des mitochondrialen Ribosoms
MRP21	Protein des mitochondrialen Ribosoms
YGL069c	Protein unbekannter Funktion
MRPS28	Protein des mitochondrialen Ribosoms
MRPL9	Protein des mitochondrialen Ribosoms

5.2 Die Oxa1-Translokase der Mitochondrien

5.2.1 Die Architektur des Oxa1-Komplexes

Obwohl zu Beginn dieser Arbeit das Oxa1-Protein aus Hefe schon seit einigen Jahren untersucht wurde und einige funktionelle Daten publiziert waren, war der Aufbau der Oxa1-Translokase noch unbekannt [46-48, 68, 83-88, 143]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Frank Nargang (University of Alberta, Canada) das Oxa1-Protein in *N. crassa* identifiziert und Einblicke in Aufbau und Funktion der Translokase gewonnen. Für diese Untersuchungen war der filamentöse Pilz *N. crassa* besonders geeignet, da er die einfache Reinigung relativ großer Mengen des Oxa1-Komplexes ermöglichte. Zwar ist die Sequenzidentität der Primärsequenzen zwischen Oxa1^{Sc} und Oxa1^{Nc} mit 24,8% eher gering, aber beide Proteine zeigen eine ähnlichen Aufbau und Anzahl sowie Abstand der Transmembrandomänen sind hoch konserviert. Ebenso ist die Funktion dieser Proteine konserviert. Oxa1^{Nc} ist in der Lage den Atmungsdefekt der *S. cerevisiae* *oxa1*-Mutante zu beheben und erlaubt die Bildung normaler Cox2-Niveaus in der *oxa1*-Mutante.

Oxa1^{Nc} ist Teil eines oligomeren Komplexes. Mittels Gelfiltrationsexperimenten konnte eine Komplexgröße von etwa 200-300 kDa ermittelt werden. Dies gilt sowohl für den Komplex aus in Dodecylmaltosid solubilisierten Mitochondrien, wie auch für den gereinigten Komplex. Die gemessene Größe ist vergleichbar mit der für das homologe Oxa1 aus Hefe gemessene Größe von 250 kDa (3.1.5). Der gereinigte Komplex enthielt keine weiteren Proteine und die Oxa1-Translokase scheint ein aus mehreren Oxa1-Untereinheiten gebildeter homooligomerer Komplex zu sein. Es kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden, dass evtl. vorhandene periphere und schwach assoziierte Komponenten bei der Lyse in Dodecylmaltosid verloren gehen. Dodecylmaltosid wird im Allgemeinen als ein mildes Detergenz betrachtet, jedoch führt die Inkubation des TOM-holo-Komplexes mit Dodecylmaltosid zur Dissoziation der schwach assoziierten Rezeptorkomponenten Tom70 und Tom20 [12]. Die bestimmte Komplexgröße wäre mit einem tetrameren Oxa1-Komplex kompatibel. Es ist allerdings bekannt, dass Membranproteine nach Solubilisation mit nichtionischen Detergenzien eine signifikante Menge an Detergenz gebunden haben können [130]. Entsprechend ist eine exakte Aussage über die Stöchiometrie des Komplexes schwierig. Interessanterweise oligomerisiert die bakterielle Sec-Translokase, welche zumindest teilweise mit dem bakteriellen Oxa1-homologen YidC interagiert, während der Translokation zu einem Tetramer [144]. Obwohl die genaue oligomere Zusammensetzung des YidC-Komplexes noch unklar ist, wurde berichtet, dass es in Nativgelen teilweise als

Homodimer migriert [145]. Neuere Untersuchungen am YidC-Komplex aus *E. coli* legen auch in Bakterien eine homotetramere Struktur des Komplexes nahe (Bernstein, unveröffentlicht). Berücksichtigt man die niedrige Sequenzhomologie der unterschiedlichen Oxa1-Homologen, ist die funktionelle Austauschbarkeit der Oxa1-Homologen ([68, 76] und diese Arbeit) durch einen homooligomeren Komplex erklärbar. Nur ein homooligomerer Komplex mag in der Lage sein, die grundlegenden Insertionsaufgaben zu bewerkstelligen, ohne auf die Interaktion mit anderen Komponenten angewiesen zu sein. Somit favorisieren die Daten ein Modell, in dem die Oxa1-Translokase aus einem Proteinkomplex besteht, der höchstwahrscheinlich aus vier Oxa1-Untereinheiten gebildet wird.

Welche Domänen sind für die Bildung dieses Komplexes verantwortlich? Die Analyse der Primärsequenzen der Oxa1-Proteine zeigt eine Region im C-Terminus, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit hat, *coiled coil*-Strukturen auszubilden. Es ist bekannt, dass diese Strukturen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln [146]. Die Größe des Oxa1-Komplexes bleibt jedoch auch nach der Reinigung erhalten, obwohl während der Reinigungsprozedur hohe Salzkonzentrationen verwendet werden. Somit ist die Oligomerisierung der Oxa1-Untereinheiten über ihre *coiled coil*-Domänen eher unwahrscheinlich. Die Interaktion der Oxa1-Untereinheiten untereinander wird möglicherweise über hydrophobe Wechselwirkungen ihrer Transmembrandomänen vermittelt. Dies würde auch erklären, warum das bakterielle YidC ebenfalls Tetramere bildet, obwohl diesem die *coiled coil*-Region fehlt.

5.2.2 Oxa1 als Translokase

Die in den letzten Jahren angesammelten Daten zu Oxa1 weisen auf eine Funktion von Oxa1 bei der Insertion von Membranproteinen von der Matrixseite in die Innenmembran hin. Die genaue molekulare Funktion von Oxa1 bei der Membraninsertion blieb bislang jedoch unklar. Auch ob die Oxa1-Translokase alleine die Membraninsertion vermittelt war noch nicht geklärt. Die Rekonstitution der Oxa1-Translokase in künstliche Lipidvesikel sollte tiefere Einblicke in die Beantwortung dieser Fragen gewähren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich der gereinigte Oxa1-Komplex aus *N. crassa* in künstliche Lipidvesikel rekonstituieren lässt. Dabei nahm Oxa1 zumindest teilweise eine Topologie ein, nach der die mitochondriale Matrixseite von Oxa1 nach außen exponiert ist. Der rekonstituierte Oxa1-Komplex war dabei funktionell, da er die Membranintegration von Untereinheit 8 der F_1F_0 -ATPase und für das verkürzte Oxa1 (Oxa1⁴³⁻²⁰⁰) stimulieren konnte. Dies weist darauf hin, dass Oxa1 die Translokation alleine vermitteln kann. Einige Gründe für

die niedrige Insertionseffizienz der Substrate scheinen möglich. Sehr hydrophobe Substrate liegen in der Regel mitochondrial kodiert vor. Der Grund hierfür könnte eine absolute Notwendigkeit der kotranslationalen Insertion sein, um eine Aggregation dieser extrem hydrophoben Proteine zu verhindern. Inwieweit die in Retikulozyten-Lysat hergestellte ATPase8 in einer translokationskompetenten Konformation vorliegt ist unklar. Kürzlich veröffentlichte Studien zum Oxa1-Homologen aus *E. coli*, YidC, zeigen, dass YidC alleine in der Lage ist, Proteine in Proteoliposomen zu inserieren [147, 148]. Interessanterweise werden die Substrate hier entweder in Harnstoff denaturiert zugegeben [147] oder kotranslational inseriert [148]. Damit wird den Proteinen keine Gelegenheit gegeben, eine translokationsinkompetente Konformation einzunehmen. Entsprechend müssen in Mitochondrien alle konservativ sortierten Proteine von Chaperonen in der Matrix in einem translokationskompetenten Zustand gehalten werden. Wahrscheinlich wird mitochondriales Hsp70, welches auch bei der Assemblierung mitochondrial kodierter Proteine assistiert [149], an diesem Prozess beteiligt sein. Für Matrixintermediate konservativ sortierter Proteine ist die Bindung von mtHsp70 nachgewiesen worden [28, 88]. Diese mitochondrialen Chaperone fehlen im rekonstituierten System und es ist fraglich, ob Oxa1 in der Lage ist, gefaltete Proteine vor ihrem Export wieder zu entfalten. Somit ist evtl. nur ein Bruchteil des zur Verfügung gestellten Substrates in einem translokationskompetenten Zustand, welcher dann effizient von Oxa1 in die Membran inseriert werden kann.

Bislang war es unklar, warum das Oxa1-Homologe in Bakterien essenziell ist. Es war bekannt, dass YidC bei der Insertion von Sec-abhängigen Innenmembranproteinen assistiert, jedoch diese Proteine auch nach Depletion von YidC in die Membran inserieren. Die einzigen bekannten Proteine, deren Insertion ausschließlich von YidC abhängig ist, waren die Phagenhüllproteine Pf3 und M13. Driessen und seinen Mitarbeitern gelang es jetzt, die Abhängigkeit der Insertion der Untereinheit *c* der bakteriellen F_1F_0 -ATPase von YidC nachzuweisen [150, 151]. YidC depletierte *inside out*-Vesikel von bakteriellen Innenmembranen sind nicht in der Lage naszierende Untereinheit *c* zu integrieren. Hingegen führt die Translation der Untereinheit *c* in Anwesenheit von Proteoliposomen mit rekonstituierten YidC zur Integration der Untereinheit in die Vesikel [148]. Die zu der Untereinheit *c* homologe Untereinheit der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase, Untereinheit 9, wird in *N. crassa* konservativ sortiert und inseriert Oxa1-abhängig in die mitochondriale Innenmembran [48]. Somit übernehmen beide Proteine auch homologe Funktionen in der Biogenese essenzieller Membrankomplexe. Weiterhin deuten neueste Beobachtungen daraufhin, dass in die bakterielle Innenmembran dirigiertes Oxa1^{Sc} den Wachstumsphänotyp

von YidC-depletierten *E. coli*-Zellen behebt und die Funktion von YidC übernimmt (Preuss, Luirink & Herrmann, unveröffentlichte Daten). Somit sollte es möglich sein, die kotranslationale Insertion durch Verwendung von rekonstituiertem Oxa1 und des sehr leicht zu erhaltenen *E. coli* S135-Lysates zu untersuchen.

5.2.3 Oxa1, eine porenbildende Insertase

Biologische Membranen sind Barrieren zwischen verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Um den Stoffaustausch zwischen diesen Kompartimenten zu gewährleisten, gibt es verschiedene Transportproteine. Transportproteine, welche kleine Metaboliten über die Membran transportieren, bewerkstelligen dies in einer Art *Shuttle*-Mechanismus. Wie aber werden Polypeptidketten über eine Membran transportiert? Die elektronenmikroskopische Aufnahme des TOM-Komplexes zeigt einen großen Proteinkomplex, welcher zwei bzw. drei Vertiefungen in seiner Struktur aufweist [135]. Ob diese Vertiefungen Kanäle darstellen, durch welche die Polypeptidketten transportiert werden, ist noch nicht geklärt. Allerdings wurde durch elektrophysiologische Messungen nachgewiesen, dass der TOM-Komplex in der Lage ist, einen ionenleitenden Kanal über die Membran zu bilden [11, 12, 134, 135]. Durch einen solchen Kanal könnten die Polypeptidketten über die Membran transportiert werden. Da auch für die Insertion von Innenmembranproteinen teilweise umfangreiche Domänen über die Innenmembran transportiert werden müssen, scheint die Bildung eines Kanals durch den Oxa1-Komplex wahrscheinlich. Während die Öffnung der Kanäle der Außenmembran nicht zwingend reguliert sein müssen, sollten die Innenmembrantranslokasen einer strikten Regulation unterworfen sein. Ein stetig geöffneter Kanal in der Innenmembran würde zur Reduktion des Membranpotentials führen, was sehr nachteilig für die Zelle wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Oxa1 in der Lage ist, Ionen über die Membran zu leiten. Interessanterweise ist die Kanalaktivität von Oxa1 abhängig von der angelegten Spannung. Die nötige Spannung ist weitaus höher, als die üblicherweise zur Messung von Außenmembranporen verwendete. Des Weiteren zeigt Oxa1 vollkommen andere Leitungseigenschaften als die veröffentlichten Außenmembranporen Porin, TOM40 und TOB55 [10, 11, 135]. Während diese Proteine bei einer angelegten Spannung von 20 mV klar definierte konstante Poren in einer elektrophysiologischen Messung zeigen, ist eine Ionenleitung durch Oxa1 erst ab einer angelegten Spannung von mindestens 70 mV zu beobachten. Auch zeigt Oxa1 keinen konstanten Kanal, sondern das erhaltene Strommuster zeigt ein „Flackern“. Dieses „Flackern“ könnte durch spannungsinduzierte Konformationsänderungen im Oxa1-Komplex hervorgerufen werden. Für den Tim22-Kanal

der Innenmembran wurde ein ähnliches „Flackern“ gemessen [152]. Tim22 inseriert polytopische Membranproteine von der Intermembranraumseite in die Innenmembran. Dieser Prozess ist strikt membranpotentialabhängig, benötigt jedoch keine Energie in Form von ATP. Schnelle durch das Membranpotential induzierte Konformationsänderungen könnten helfen, Transmembrandomänen mechanisch in die Innenmembran zu inserieren [152]. Auch der Export von Proteinen von der Matrixseite in die innere Membran benötigt ein hohes Membranpotential [28, 88]. Für die konservative Sortierung der Untereinheit 9 aus *N. crassa* wurde berichtet, dass diese ebenfalls abhängig von Matrix-ATP sei [28]. Das Matrix-ATP wird benötigt, um das an mtHsp70 gebundene Importintermediat in einem ATP-verbrauchenden Schritt zu lösen [28] und hat wahrscheinlich nichts mit dem eigentlichen Exportprozess zu tun. Auch besitzt Oxa1 keine ATPase-Domäne. Die strikte Abhängigkeit vom Membranpotential zusammen mit dem schnellen „Schalten“ des Oxa1-Komplexes in elektrophysiologischen Messungen favorisieren ein Modell, in dem Oxa1 durch schnelle Konformationsänderungen die Insertion der Transmembrandomänen sowie den Export hydrophiler Proteindomänen über die Membran vermittelt. Die Schaltgeschwindigkeit dieser Komplexe ist mit einer herkömmlichen Verstärker-Schreiber-Anordnung nur bedingt aufzulösen. Tim22 zeigt bis zu vier Schaltvorgänge pro Sekunde unter normalen Bedingungen und mehr als 120 Schaltvorgänge pro Sekunde nach Stimulation mit einem Tim22-spezifischen Zielsequenzpeptid [152]. Die Trägheit des für diese Arbeit verwendeten Schreibers ist zu groß, um solche Vorgänge aufzuzeichnen. Es wäre interessant, die Eigenschaften des Oxa1-Kanals in einer adäquaten Messapparatur genauer zu untersuchen. Lassen sich für Oxa1 auch distinkte Subleitfähigkeiten mit unterschiedlicher Porengröße wie für Tim22 nachweisen? Lässt sich der Oxa1-Kanal durch Zusatz von spezifischen Peptiden stimulieren? Hier wäre es sehr interessant, welche Bereiche in zu exportierenden Proteinen als Erkennungssequenz für die Oxa1-Translokase fungieren. Diese Erkennungssequenz ist bislang unbekannt.

Der Zusatz von gereinigten Ribosomen stimuliert die Leitfähigkeit von Oxa1. Es ist unklar, ob nun allein die Ribosomen die Kanalaktivität stimulieren oder ob das Vorhandensein einer naszierenden Kette notwendig ist. Elektronenmikroskopische Bilder von Mitochondrien zeigen, dass mitochondriale Ribosomen fast vollständig mit der Innenmembran assoziiert sind [34] und Oxa1 ist *in vitro* an mitochondriale Ribosomen gebunden [36]. Interessanterweise ergibt die Stimulation der Leitfähigkeit von Oxa1 mit isolierten Ribosomen ein anderes Strommuster als die Stimulation durch Anlegen einer hohen Spannung. Das erhaltene Muster durch Stimulation mit Ribosomen spiegelt das Verhalten

einer stabilen langsam schaltenden Pore wider. Schnelle Konformationsänderungen mögen bei einer kotranslationalen Insertion nicht nötig sein, da die benötigte Energie zur Translokation aus dem vorrantschieben der naszierenden Kette bei der Translation gewonnen werden könnte.

Somit könnte die Oxa1-Translokase in zwei unterschiedlichen Modi arbeiten: (a) konservativ sortierte Proteine könnten durch membranpotentialinduzierte Bewegungen der Oxa1-Domänen in die Membran inseriert werden, und (b) bei kotranslational inserierenden Substraten bildet Oxa1 eine stabile Pore, um der sich vorschiebenden naszierenden Kette den Weg in und über die Membran zu ermöglichen.

Die in dieser Arbeit etablierten Ansätze zur Rekonstitution der Oxa1-Translokase und ihrer elektrophysiologischen Analyse werden wichtige Grundlagen sein, die mechanistische Arbeitsweise der Oxa1-Translokase in Zukunft aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Ein essenzieller Schritt in der Biogenese der Mitochondrien ist der Import von Vorstufenproteinen aus dem Zytosol in die mitochondrialen Subkompartimente. Viele Proteine inserieren hierbei von der Matrixseite aus in die Innenmembran. Das Innenmembranprotein Oxa1 spielt dabei eine sehr wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Mba1 als eine weitere mitochondriale Komponente identifiziert, welche für die effiziente Proteininsertion benötigt wird. Wie Oxa1 interagiert auch Mba1 spezifisch sowohl mit mitochondrialen Translationsprodukten, als auch mit konservativ sortierten kernkodierten Proteinen während ihrer Insertion in die Innenmembran. Obwohl Oxa1 und Mba1 in ihrer Funktion und Substratspezifität überlappen, können beide unabhängig von einander agieren. Somit ist Mba1 Teil der mitochondrialen Proteinexportmaschinerie und die erste identifizierte Komponente eines Oxa1-unabhängigen Insertionsweges in die mitochondriale Innenmembran.

Des Weiteren wurde das Protein Oxa1 in Bezug auf Architektur und Funktionsweise näher untersucht. Hierzu wurde das Oxa1-Protein aus *N. crassa* Mitochondrien isoliert und charakterisiert. Das Protein bildet einen homooligomeren Komplex, welcher in Dodecylmaltosid eine Größe von 200-300 kDa zeigt. Der gereinigte Komplex lässt sich in künstliche Lipidvesikel rekonstituieren und ist in der Lage die Modellproteine ATPase8 und Oxa1⁴³⁻²⁰⁰ zu inserieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit zum ersten Male gezeigt, dass Oxa1 alleine in der Lage ist, Proteine in Membranen zu inserieren.

Das gereinigte Oxa1-Protein zeigt in elektrophysiologischen Messungen kanalbildende Aktivitäten. Die Kanalcharakteristika von Oxa1 unterscheiden sich abhängig von der Stimulation. Wird die Leitfähigkeit durch eine hohe Spannung ($U > 70$ mV) angeregt, erhält man ein Strommuster, welches ein sehr schnelles „Flackern“ zeigt. Werden hingegen isolierte mitochondriale Ribosomen bei niedriger Spannung ($U = 20$ mV) zugesetzt, zeigen sich langsam schaltende Poren. Somit scheint Oxa1 in zwei unterschiedlichen Modi zu arbeiten, je nachdem ob es posttranslational kernkodierte Proteine oder kotranslational mitochondrial kodierte Proteine in die Membran inseriert.

7 Literatur

1. Trevors, J.T., *Possible origin of a membrane in the subsurface of the Earth*. Cell Biol Int, 2003. **27**(6): p. 451-7.
2. Trevors, J.T., *Early assembly of cellular life*. Prog Biophys Mol Biol, 2003. **81**(3): p. 201-17.
3. Gupta, R.S. and G.B. Golding, *The origin of the eukaryotic cell*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(5): p. 166-71.
4. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
5. Herrmann, J.M. and W. Neupert, *Protein transport into mitochondria*. Curr. Opin. Microbiol., 2000. **3**: p. 210-214.
6. Neupert, W., *Protein import into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 863-917.
7. Paschen, S.A. and W. Neupert, *Protein import into mitochondria*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 101-112.
8. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(2): p. 51-2.
9. Hoppins, S.C. and F.E. Nargang, *The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12396-405.
10. Paschen, S.A., et al., *Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 862-6.
11. Ahting, U., et al., *Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1151-60.
12. Ahting, U., et al., *The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 959-68.
13. Mokranjac, D., et al., *Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria*. EMBO J., 2003. **22**(4): p. 816-825.
14. Kozany, C., et al., *The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(3): p. 234-41.
15. Mayer, M.P., *Timing the catch*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(1): p. 6-8.

16. Truscott, K.N., et al., *A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 707-13.
17. Mokranjac, D., et al., *Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria*. Embo J, 2003. **22**(19): p. 4945-56.
18. Neupert, W. and M. Brunner, *The protein import motor of mitochondria*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002. **3**(8): p. 555-565.
19. Okamoto, K., et al., *The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation*. Embo J, 2002. **21**(14): p. 3659-71.
20. Cumsky MG, T.C., Ko C, and Poyton RO., *Structural analysis of two genes encoding divergent forms of yeast cytochrome c oxidase subunit V*. Mol. Cell. Biol., 1987. **7**: p. 3511-3519.
21. Lodi, T. and I. Ferrero, *Isolation of DLD gene of Saccharomyces cerevisiae encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase*. Mol. Gen. Genet., 1993. **238**: p. 315-324.
22. Schulze, M. and G. Rödel, *Accumulation of the cytochrome c oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear SCO1 gene*. Mol. Gen. Genet., 1989. **216**: p. 37-43.
23. Glerum, D.M., A. Shtanko, and A. Tzagoloff, *SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20531-5.
24. Endres, M., W. Neupert, and M. Brunner, *Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex*. EMBO J., 1999. **18**: p. 3214-3221.
25. Rojo, E.E., et al., *N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic "positive-inside" rule of membrane protein topology*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19617-22.
26. Dalbey, R.E., A. Kuhn, and G. von Heijne, *Directionality in protein translocation across membranes: the N-tail phenomenon*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(10): p. 380-3.
27. Koll, H., et al., *Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space*. Cell, 1992. **68**(6): p. 1163-75.
28. Rojo, E.E., R.A. Stuart, and W. Neupert, *Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP*. EMBO J., 1995. **14**(14): p. 3445-51.

29. Glick, B.S. and G. Von Heijne, *Saccharomyces cerevisiae mitochondria lack a bacterial-type sec machinery*. Protein Sci, 1996. **5**(12): p. 2651-2.
30. Foury, F., et al., *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1998. **440**(3): p. 325-31.
31. Garesse, R. and C.G. Vallejo, *Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 1-16.
32. Andre, J., [Some recent data on the structure and physiology of mitochondria: glycogen, elemental particles, nucleic acids]. Arch Biol (Liege), 1965. **76**(2): p. 277-304.
33. Vignais, P.V., J. Huet, and J. Andre, *Isolation and characterization of ribosomes from yeast mitochondria*. FEBS Lett, 1969. **3**(3): p. 177-181.
34. Watson, K., *The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol., 1972. **55**: p. 721-726.
35. Sanchirico, M.E., T.D. Fox, and T.L. Mason, *Accumulation of mitochondrially synthesized Saccharomyces cerevisiae Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs*. EMBO J., 1998. **17**: p. 5796-5804.
36. Szyrach, G., et al., *Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria*. Embo J, 2003. **22**(24): p. 6448-57.
37. Jia, L., et al., *Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: The importance of the C-terminal hydrophilic region of Oxa1*. EMBO J., 2003. **22**(24): p. 6438-47.
38. Poyton, R.O., D.M. Duhl, and G.H. Clarkson, *Protein export from the mitochondrial matrix*. Trends Cell Biol, 1992. **2**(12): p. 369-75.
39. Pajic, A., et al., *Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria*. FEBS Lett., 1994. **353**(2): p. 201-206.
40. Sevarino, K.A. and R.O. Poyton, *Mitochondrial membrane biogenesis: identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980. **77**(1): p. 142-146.
41. Fujiki, Y., et al., *Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1982. **93**(1): p. 97-102.
42. McKee, E.E., J.E. McEwen, and R.O. Poyton, *Mitochondrial gene expression in saccharomyces cerevisiae. II. Fidelity of translation in isolated mitochondria from wild type and respiratory-deficient mutant cells*. J. Biol. Chem., 1984. **259**(14): p. 9332-9338.

43. Clarkson, G.H. and R.O. Poyton, *A role for membrane potential in the biogenesis of cytochrome c oxidase subunit II, a mitochondrial gene product*. J Biol Chem, 1989. **264**(17): p. 10114-8.
44. Herrmann, J.M., et al., *Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II - Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(45): p. 27079-27086.
45. Nagley, P., et al., *Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2091-5.
46. He, S. and T.D. Fox, *Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(8): p. 1449-60.
47. Hell, K., et al., *Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space*. FEBS Lett., 1997. **418**: p. 367-370.
48. Hell, K., et al., *Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2250-5.
49. Hell, K., W. Neupert, and R.A. Stuart, *Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA*. EMBO J., 2001. **20**: p. 1281-1288.
50. Liu, G., T.B. Topping, and L.L. Randall, *Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9213-7.
51. Collier DN, B.V., Weiss JB, and Bassford PJ Jr., *The antifolding activity of SecB promotes the export of the E. coli maltose-binding protein*. Cell, 1988. **53**: p. 273-283.
52. Lill, R., W. Dowhan, and W. Wickner, *The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins*. Cell, 1990. **60**(2): p. 271-80.
53. Briggs, M.S., et al., *In vivo function and membrane binding properties are correlated for Escherichia coli lamB signal peptides*. Science, 1985. **228**(4703): p. 1096-9.
54. Batenburg, A.M., et al., *Penetration of the signal sequence of Escherichia coli PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alterations of lipid organization*. Biochemistry, 1988. **27**(15): p. 5678-85.
55. Yahr, T.L. and W.T. Wickner, *Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4393-401.
56. Schiebel, E., et al., *$\Delta\mu_H^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase*. Cell, 1991. **64**: p. 927-939.

57. Duong, F. and W. Wickner, *The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling*. *Embo J*, 1997. **16**(16): p. 4871-9.
58. de Gier, J.W., et al., *Assembly of a cytoplasmic membrane protein in Escherichia coli is dependent on the signal recognition particle*. *FEBS Lett*, 1996. **399**(3): p. 307-9.
59. Seluanov, A. and E. Bibi, *FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(4): p. 2053-5.
60. Ulbrandt, N.D., J.A. Newitt, and H.D. Bernstein, *The E. coli signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 187-96.
61. de Gier, J.W., et al., *Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(25): p. 14646-51.
62. Poritz, M.A., et al., *An E.coli ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mamalian SRP*. *Science*, 1990. **250**: p. 1111-1115.
63. Prinz, A., et al., *Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA*. *EMBO J*, 2000. **19**(8): p. 1900-1906.
64. Scotti, P.A., et al., *YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase*. *EMBO J*, 2000. **19**: p. 542-549.
65. Rohrer, J. and A. Kuhn, *The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane*. *Science*, 1990. **250**(4986): p. 1418-21.
66. Samuelson, J.C., et al., *YidC mediates membrane protein insertion in bacteria*. *Nature*, 2000. **406**(6796): p. 637-41.
67. Berks, B.C., F. Sargent, and T. Palmer, *The Tat protein export pathway*. *Mol Microbiol*, 2000. **35**(2): p. 260-74.
68. Bonnefoy, N., et al., *Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxa1- mutation in Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(25): p. 11978-82.
69. Saaf, A., et al., *Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30415-8.
70. Samuelson, J.C., et al., *Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in Escherichia coli: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(37): p. 34847-52.

71. Kiefer, D., et al., *Negatively charged amino acid residues play an active role in orienting the Sec-independent Pf3 coat protein in the Escherichia coli inner membrane*. *Embo J*, 1997. **16**(9): p. 2197-204.
72. Kiefer, D. and A. Kuhn, *Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control*. *Embo J*, 1999. **18**(22): p. 6299-306.
73. Chen, M., et al., *Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(10): p. 7670-7675.
74. Houben, E.N., et al., *Nascent Lep inserts into the Escherichia coli inner membrane in the vicinity of YidC, SecY and SecA*. *FEBS Lett.*, 2000. **476**(3): p. 229-233.
75. Sundberg, E., et al., *ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria*. *Plant Cell*, 1997. **9**: p. 717-730.
76. Moore, M., et al., *Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(3): p. 1529-32.
77. Woolhead, C.A., et al., *Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p. 40841-6.
78. Kogata, N., et al., *Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids*. *FEBS Lett*, 1999. **447**(2-3): p. 329-33.
79. Tu, C.J., D. Schuenemann, and N.E. Hoffman, *Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 27219-24.
80. Yuan, J., et al., *ATP stimulates signal recognition particle (SRP)/FtsY-supported protein integration in chloroplasts*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 32400-4.
81. Moore, M., et al., *Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(7): p. 1245-54.
82. Klostermann, E., et al., *The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 2002. **368**(Pt 3): p. 777-81.
83. Bauer, M., et al., *PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast*. *Mol. Gen. Genet.*, 1994. **245**: p. 272-278.

84. Bonnefoy, N., et al., *OXA1, a Saccharomyces cerevisiae nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis*. J Mol Biol, 1994. **239**(2): p. 201-12.
85. Meyer, W., U. Bomer, and E. Pratje, *Mitochondrial inner membrane bound Pet1402 protein is rapidly imported into mitochondria and affects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes*. Biol Chem, 1997. **378**(11): p. 1373-9.
86. Altamura, N., et al., *The Saccharomyces cerevisiae OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase*. FEBS Lett, 1996. **382**(1-2): p. 111-5.
87. Kermorgant, M., N. Bonnefoy, and G. Dujardin, *Oxa1p, which is required for cytochrome c oxidase and ATP synthase complex formation, is embedded in the mitochondrial inner membrane*. Curr Genet, 1997. **31**(4): p. 302-7.
88. Herrmann, J.M., W. Neupert, and R.A. Stuart, *Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p*. Embo J, 1997. **16**(9): p. 2217-26.
89. Hamel, P., et al., *Functional complementation of an oxa1- yeast mutation identifies an Arabidopsis thaliana cDNA involved in the assembly of respiratory complexes*. Plant J, 1997. **12**(6): p. 1319-27.
90. Saracco, S.A. and T.D. Fox, *Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded Saccharomyces cerevisiae Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane*. Mol. Biol. Cell, 2002. **13**(4): p. 1122-1131.
91. Rep, M., et al., *Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both Afg3 and Rca1 when over-expressed*. Curr Genet, 1996. **30**(3): p. 206-11.
92. Paul, M.F. and A. Tzagoloff, *Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit F1-ATPase assembly in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1995. **373**(1): p. 66-70.
93. Arlt, H., et al., *The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4837-47.
94. Arlt, H., et al., *The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria*. Cell, 1996. **85**(6): p. 875-85.
95. Leonhard, K., et al., *AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria*. Embo J, 1996. **15**(16): p. 4218-29.

96. Rep, M. and L.A. Grivell, *MBA1 encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain*. FEBS Lett, 1996. **388**(2-3): p. 185-8.
97. Yoshikawa, S., K. Shinzawa-Itoh, and T. Tsukihara, *Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution*. J Bioenerg Biomembr, 1998. **30**(1): p. 7-14.
98. Tsukihara, T., et al., *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1136-44.
99. Taanman, J.W. and R.A. Capaldi, *Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22481-5.
100. Joseph-Horne, T., D.W. Hollomon, and P.M. Wood, *Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 179-95.
101. Poyton, R.O. and J.E. McEwen, *Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 563-607.
102. Grivell, L.A., *Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(2): p. 121-64.
103. Hell, K., et al., *Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4571-8.
104. Green-Willms, N.S., T.D. Fox, and M.C. Costanzo, *Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(4): p. 1826-1834.
105. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
106. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
107. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
108. Hashemzadeh-Bonehi, L., et al., *Importance of using lac rather than ara promoter vectors for modulating the levels of toxic gene products in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1998. **30**(3): p. 676-8.
109. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**: p. 19-27.
110. Rothstein RJ, *One-step gene disruption in yeast*. Methods Enzymol., 1983. **101**,: p. 202-211.

111. Preuss, M., et al., *Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1085-96.
112. Behrens, M., G. Michaelis, and E. Pratje, *Mitochondrial inner membrane protease 1 of Saccharomyces cerevisiae shows sequence similarity to the Escherichia coli leader peptidase*. Mol. Gen. Genet., 1991. **228**: p. 167-176.
113. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
114. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. **79**: p. 267-271.
115. Khyse-Anderson, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose*. J. Biochem. Biophys. Methods, 1984. **10**: p. 203-207.
116. Pelham, H.R.B. and R.J. Jackson, *An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates*. Eur. J. Biochem., 1976. **67**: p. 247-256.
117. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248-254.
118. Daum, G., P.C. Böhni, and G. Schatz, *Import of proteins into mitochondria: cytochrome b_2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria*. J. Biol. Chem., 1982. **257**(21): p. 13028-13033.
119. Law, R.H., et al., *ATP synthase from Saccharomyces cerevisiae*. Methods Enzymol, 1995. **260**(133): p. 133-63.
120. Lanzetta, P.A., et al., *An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate*. Anal Biochem, 1979. **100**(1): p. 95-7.
121. Nargang, F.E., et al., *The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(15): p. 12846-12853.
122. Lemaire, C., et al., *Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F_0 -ATPase subunit accumulation in an oxa1 deletion mutant of Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 23471-23475.
123. Hamel, P., et al., *Mutations in the membrane anchor of yeast cytochrome c_1 compensate for the absence of Oxa1p and generate carbonat-extractable forms of cytochrome c_1* . Genetics, 1998. **150**: p. 601-611.

124. Claros, M.G. and P. Vincens, *Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences*. Eur J Biochem, 1996. **241**(3): p. 779-86.
125. Rapaport, D., et al., *Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(32): p. 20150-20155.
126. Ackerman, S.H. and A. Tzagoloff, *ATP10, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F_1 - F_0 complex*. J. Biol. Chem., 1990. **265**: p. 9952-9959.
127. Kyte J, a.D.R., *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J. Mol. Biol., 1982. **157**;: p. 105-132.
128. Lupas, A., *Predicting coiled-coil regions in proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(3): p. 388-93.
129. Ito, A., *Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(3): p. 611-6.
130. Moller, J.V. and M. le Maire, *Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18659-72.
131. Rigaud, J.L., et al., *Detergent removal by non-polar polystyrene beads*. Eur Biophys J, 1998. **27**(4): p. 305-319.
132. Rigaud, J.L., et al., *Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins*. J Struct Biol, 1997. **118**(3): p. 226-35.
133. Lacapere, J.J., et al., *Two-dimensional crystal formation from solubilized membrane proteins using Bio-Beads to remove detergent*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **834**: p. 9-18.
134. Künkele, K.P., et al., *The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31032-9.
135. Künkele, K.P., et al., *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1009-19.
136. Baumann, F., W. Neupert, and J.M. Herrmann, *Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix*. J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 21405-21413.
137. Herrmann, J.M. and N. Bonnefoy, *Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxal translocase*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2507-12.

138. Saint-Georges, Y., et al., *Role of positively charged transmembrane segments in the insertion and assembly of mitochondrial inner-membrane proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001. **98**: p. 13814-13819.
139. Lai-Zhang, J., Y. Xiao, and D.M. Mueller, *Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F_1 -ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae**. EMBO J., 1999. **18**: p. 58-64.
140. Soubannier, V., *La sous-unité 4 dans le second pied de la F1F0-ATP synthase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*: Étude topologique de cette sous-unité dans le processus de dimérisation/oligomérisation de l'enzyme.*, in *Sciences Biologiques et Médicales, Biologie Santé*. 2002, Université Victor Ségalen Bordeaux 2: Bordeaux. p. 199.
141. Hunte, C., et al., *Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment*. Structure Fold. Des., 2000. **8**(6): p. 669-684.
142. Hughes, T.R., et al., *Functional discovery via a compendium of expression profiles*. Cell, 2000. **102**: p. 109-126.
143. Meyer, W., M. Bauer, and E. Pratje, *A mutation in cytochrome oxidase subunit 2 restores respiration of the mutant *pet ts1402**. Curr Genet, 1997. **31**(5): p. 401-7.
144. Manting, E.H., et al., *SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel*. Embo J, 2000. **19**(5): p. 852-61.
145. van der Laan, M., et al., *Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner*. EMBO Rep., 2001. **2**(6): p. 519-523.
146. Lupas, A., *Coiled coils: new structures and new functions*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(10): p. 375-82.
147. Serek, J., et al., *Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins*. Embo J, 2004. **23**(2): p. 294-301.
148. Van Der Laan, M., et al., *F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis*. J Cell Biol, 2004. **165**(2): p. 213-22.
149. Herrmann, J.M., et al., *Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA*. J. Cell Biol., 1994. **127**(4): p. 893-902.
150. van der Laan, M., et al., *A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5801-6.

151. Yi, L., et al., *YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F(1)F(0)ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase*. *Biochemistry*, 2003. **42**(35): p. 10537-44.
152. Kovermann, P., et al., *Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel*. *Mol Cell*, 2002. **9**(2): p. 363-73.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Paschen, S. A., T. Waizenegger, T. Stan, **M. Preuss**, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert. 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866

Nargang, F.E., **M. Preuss**, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2002. The homooligomeric Oxa1 protein forms an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 277, 12846-12853

Preuss, M., K. Leonhard, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2001. Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *S. cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 153, 1035-1045

Danksagung

Nun kommen wir zum letzten Abschnitt der Doktorarbeit, der Danksagung. Also dem Teil der Doktorarbeit, der wirklich von jedem gelesen wird, der dieses Werk in die Hand nimmt. Somit ergreife ich die Möglichkeit hier allen zu danken, die mir in dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und auf deren Hilfe ich mich jederzeit verlassen konnte.

Zu aller erst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die lehrreiche Zeit an seinem Institut. Sein fortwährendes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Erfolg meiner Arbeit und zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen, der sich bereiterklärt hat, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Herrn Dr. Johannes Herrmann danke ich sehr herzlich für die sehr gute Anleitung und Unterstützung. Seine vielfältigen Ideen und Anregungen, sowie zahlreichen Diskussionen und seine fast grenzenlose Begeisterungsfähigkeit haben wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

So manche Experimente dieser Arbeit waren nur in Kooperation mit Forschern außerhalb des Institutes möglich. In diesem Zusammenhang möchte Prof. Dr. Frank Nargang für den *N. crassa* Stamm K5-15-23-1 und die gute Zusammenarbeit im Laufe des Projektes sowie Prof. Dr. Roland Benz für die Gastfreundschaft in seinem Labor und die Einführung in die Elektrophysiologie danken. Des Weiteren möchte ich noch Dr. Lutz Eichacker und seinen Mitarbeitern für die massenspektrometrischen Untersuchungen danken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen bedanken, die mit mir den meisten Teil des Forschungsalltages verbracht und versüßt haben. Besonders möchte ich mich hier bei Dejana bedanken. In unseren zahlreichen Diskussionen, ob wissenschaftlich oder privat, hat sie mich durch ihren Humor immer wieder aufgemuntert und die Dinge wieder auf das Wesentliche reduziert. Des Weiteren möchte ich Martin S. danken, der mit großer Begeisterung jedes Problem diskutierte und auf dessen Unterstützung ich mich immer verlassen konnte. Außerdem möchte ich den jetzigen und ehemaligen Kollegen der Hannes-Gruppe danken, Gregor – für seine Unterstützung bei jeglichen Linux-Problemen und den vielen außerlaborlichen Aktivitäten, Frank – für seinen tiefschwarzen Humor und die aufmunternden Worte während den diversen Frustphasen (als Team mit Dejana ward Ihr einfach unschlagbar!), Sölchen – for the many nice discussions about science, movies etc., Stefan – für den sehr eigenen Musikgeschmack und des gemeinsamen Verfechtens der lauten Musik, Tom, Petra R., Tanja, Heike, Nikola, Martin O. und last, but not least Silvia, die mich

in der ersten Hälfte meiner Doktorarbeit tatkräftig und überaus geschickt unterstützt hat. Nicht vergessen möchte ich natürlich all den anderen Kollegen des Labors wie auch den Ehemaligen zu danken, allen voran natürlich den Leuten aus dem benachbarten Bene-Lab, Flo, Marlies, Kai und Jutta, aber natürlich auch SAP, Carsten und natürlich Markus D., der mich während seiner Zeit im Labor mit Süßigkeiten versorgte und auch nach seiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand und für mich immer ein offenes Ohr hatte.

Ein großes Dankeschön gilt auch Frau Braun, welche mir das Arbeiten mit *N. crassa* beigebracht hat. Ebenso möchte ich mich bei Marica für die stete Belieferung mit *N. crassa* Mitochondrien bedanken.

Den Mitarbeitern des Sekretariats, Frau Döge, Frau Farsen und Frau Hauck danke ich vielmals für die freundliche Hilfe beim Erledigen der bürokratischen Dinge im Laufe einer Doktorarbeit und den „Jungs von der Werkstatt“, die das Leben im Labor durch das Bauen und Reparieren der diversen Apparaturen um einiges erleichtert haben.

Ich möchte mich auch bei meiner Conny bedanken, die mich in der Schlussphase der Doktorarbeit mit viel Verständnis mit dem Labor geteilt und unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für ihre immerwährende private Unterstützung danken, ohne welche diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Marc Preuß

Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
22.08.1972	Geboren in Mannheim
1979-1983	Schillerschule Viernheim (Grundschule)
1983-1992	Albertus-Magnus-Schule Viernheim (Gymnasium)
1992	Abitur
1992-1993	Wehrdienst im ABC-Abwehrbataillon 750, Bruchsal
10/1993-09/1999	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt
01/1999-08/1999	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Arne Skerra am Institut für Biologische Chemie der Technischen Universität München in Freising. Titel der Arbeit: Konstruktion von ‚Anticalinen‘ durch angewandtes Protein Design
seit 11/1999	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München