

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

**Charakterisierung der mitochondrialen
TIM22-Translokase des Menschen**

von

Nicole Mühlenbein

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert betreut und von Prof. Dr. Patrick Cramer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 09.09.2004



Nicole Mühlenbein

Dissertation eingereicht am 09.09.2004

1. Gutachter Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am 12.10.2004

Abkürzungen

α	anti
A	Ampere
aa	Aminosäure
AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carboxycyanid-m-chlor-phenylhydrazon
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSP	Dithiobis-succinimidyl-propionat
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\Psi$	Membranpotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tag
FADH ₂	Flavinadenin-dinukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GIP	Generelle Import-Pore
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
His ₆	Hexahistidin-Peptid
Hsp	Hitzeschockprotein
ICP	Optische Emissionsspektroskopie (Inductively Coupled Plasma)
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria Bertani (<i>E. coli</i> -Nährmedium)
lac α	α Untereinheit der β -Galaktosidase
min	Minute
MBS	m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester
MBP	Maltosebindungsprotein
MP	Mitoplasten
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
MSF	mitochondrial import stimulation factor
mt	mitochondrial

MTS	Mohr-Tranebjaerg-Syndrom
NADH	Nikotinamidadeninindinukleotid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NEM	N-ethylmaleimid
nm	Nanometer
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
o-Phe	ortho-Phenanthrolin
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tim	Protein der Translokationsmaschinerie der Innenmembran
TIM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
Tom	Protein der Translokationsmaschinerie der Außenmembran
TOM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
U	enzymatische Einheiten (Unit)
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinimport in Mitochondrien	2
1.1.1	Transport über die Außenmembran: der TOM-Komplex	4
1.1.2	Import in die Matrix und Insertion in die Innenmembran: der TIM23-Komplex	5
1.1.3	Export aus der Matrix: Oxa1	6
1.1.4	Insertion in die Innenmembran: der TIM22-Komplex	7
1.1.5	Chaperone im Intermembranraum: die kleinen Tim-Proteine	8
1.2	Mitochondriale Proteintranslokasen in Säugetieren	11
1.3	Störungen des mitochondrialen Proteinimports	12
1.4	Biogenese der kleinen Tim-Proteine	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Molekularbiologische Methoden	15
2.1.1	DNA-Präparation	15
2.1.1.1	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	
2.1.1.2	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	
2.1.2	Enzymatische Modifikation von DNA	16
2.1.2.1	DNA-Restriktionsverdau	
2.1.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten	
2.1.3	DNA-Reinigung und -Analyse	17
2.1.3.1	Ethanol-fällung	
2.1.3.2	Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA	
2.1.3.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	
2.1.3.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	
2.1.3.5	DNA-Sequenzierung	
2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	18
2.1.5	Verwendete Plasmide	19
2.1.6	Klonierungsstrategien	20
2.1.7	Verwendete Primer	22
2.2	Methoden der Hefegenetik	23
2.2.1	Verwendete Hefestämme	23
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.2.3	Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.3	Zellbiologische Methoden	25
2.3.1	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.3.2	Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe	25
2.3.3	Isolierung von Mitochondrien aus kultivierten Zellen	26
2.3.4	Sucrose-Stufengradient zur Anreicherung von Mitochondrien	26
2.3.5	Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran	27
2.3.6	In vitro-Proteinimport radioaktiv markierter Vorstufenproteine in isolierte Mitochondrien	27
2.3.7	Submitochondriale Lokalisierung importierter Proteine	28
2.3.8	Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine	29
2.3.9	Carbonatextraktion	29
2.4	Proteinbiochemische Methoden	29
2.4.1	Methoden zur Analyse von Proteinen	29
2.4.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	

2.4.1.2	Protein-Fällung mit Trichloressigsäure	
2.4.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
2.4.1.4	Blaue Nativgelelektrophorese	
2.4.1.5	Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blau	
2.4.1.6	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose	
2.4.1.7	Autoradiographie	
2.4.2	Präparation von Proteinen	32
2.4.2.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	
2.4.2.2	Protein-Reinigung über Ni-NTA-Agarose	
2.4.2.3	Protein-Reinigung über Amyloseharz	
2.4.2.4	Bestimmung des Zinkgehaltes rekombinanter Proteine	
2.4.2.5	<i>In vitro</i> -Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine	
2.4.3	Gelfiltration	35
2.5	Immunologische Methoden	36
2.5.1	Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	36
2.5.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern	37
2.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	38
2.5.4	Immunopräzipitation	38
2.6	Chemikalien und Geräte	39
2.6.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	39
2.6.2	Geräte	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Identifizierung humaner Komponenten der TIM22-Translokase	42
3.2	Die humanen kleinen Tim-Proteine sind Zink-bindende Proteine	46
3.2.1	Das konservierte Cys4-Motiv ist ein Metall-Bindungs-Motiv	47
3.2.2	Mutationen im Cys4-Motiv zerstören die Metallbindungskapazität der kleinen Tim-Proteine	48
3.2.2.1	Die DDP1 ^{C66W} -Mutation verhindert die Interaktion mit Tim13	
3.3	Charakterisierung der humanen Proteine Tim9, Tim10a und Tim10b	51
3.3.1	Tim9, Tim10a und Tim10b sind mitochondriale Proteine	52
3.3.2	Tim9, Tim10a und Tim10b sind mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert	53
3.3.2.1	Tim9, Tim10a und Tim10b zeigen unterschiedliche Membranaffinitäten	
3.3.3	Tim9, Tim10a und Tim10b sind in zwei hetero-oligomeren Komplexen organisiert	55
3.3.3.1	Die beiden hetero-oligomeren Tim-Komplexe unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht	
3.3.4	Tim9, Tim10a und Tim10b sind in Kontakt zu Tim22	59
3.4	Funktionsuntersuchungen der humanen Tim-Proteine im heterologen Hefesystem	60
3.4.1	Funktionsuntersuchungen der kleinen Tim-Proteine	60
3.4.2	Funktionsuntersuchungen von Tim22	61
3.4.2.1	Import von humanem Tim22 in Mitochondrien aus Hefe	
3.4.2.2	Humanes Tim22 kann das Hefehomolog funktionell nicht ersetzen	
3.5	Die Funktion der humanen kleinen Tim-Proteine beim Import von Carrier-Molekülen	63
3.5.1	Import des humanen ANT3 in Mitochondrien aus Mausleber als Modellsystem	63
3.5.2	Der Import des ANT3 ist abhängig von einem Membranpotential $\Delta\psi$	64
3.5.3	ANT3 wird in die mitochondriale Innenmembran inseriert	65
3.5.4	Stufe III-Translokationsintermediate des ANT3 interagieren mit Tim9 und Tim10a	67
3.6	Identifizierung des humanen C6	69
3.6.1	Das humane C6 ist ein lösliches Protein des mitochondrialen Intermembranraumes	72
3.6.2	C6 bindet Zink und Kupfer über die konservierten Cysteine	73
3.6.3	C6 assembliert zu homo-oligomeren Komplexen	76

3.6.4	C6 spielt eine Rolle bei der Biogenese der kleinen Tim-Proteine	78
4	Diskussion	80
4.1	Die Proteine der TIM22-Translokase sind evolutionär konserviert	80
4.2	Die funktionelle Bedeutung des konservierten Cys4 Motivs	84
4.2.1	Das konservierte Cys4 Motiv der kleinen Tim-Proteine vermittelt die Bindung von Zink	84
4.2.2	Eine Mutation im Zinkfinger-Motiv führt zum Verlust der Interaktion von DDP1 und Tim13	85
4.3	Struktur und Funktion des menschlichen TIM22-Komplexes	87
4.4	Identifikation eines neuen mitochondrialen Metalloproteins im Intermembranraum	92
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	96
	Danksagung	109
	Lebenslauf	110

1 Einleitung

Mitochondrien sind Zellorganellen, die eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Eine wichtige Aufgabe liegt in der Synthese von ATP, das als universeller Energieüberträger der Aufrechterhaltung zellulärer Strukturen und Funktionen dient. Durch Verbrennung von Nährstoffen werden Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH₂ gewonnen. Diese werden in den Mitochondrien von den Atmungskettenkomplexen I – IV schrittweise oxidiert. Dabei wird ein Protonengradient über die Innenmembran generiert, dessen Abbau durch die ATP-Synthase (Komplex V) an die Synthese von ATP gekoppelt ist. Neben dem Abbauweg der Kohlenhydrate sind auch die Fettsäureoxidation und der Aminosäureabbau ganz oder teilweise in den Mitochondrien lokalisiert und tragen zur Energiegewinnung bei. Die Zahl der Mitochondrien hängt vom Energiebedarf der Zelle ab (1 bis einige 100 000). Neben ihrer Bedeutung bei der Erzeugung von ATP sind Mitochondrien Ort einer Reihe weiterer Stoffwechselwege, wie z.B. der Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden, Phospholipiden und Häm sowie der Assemblierung von prosthetischen Eisen/Schwefel-Gruppen. Darüber hinaus spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei zellulären Funktionen wie der Calcium-Homöostase, der Apoptose oder der Entstehung und dem Abbau freier Sauerstoffradikale.

Mitochondrien haben eine komplexe Struktur; sie sind vom Zytosol durch zwei Membranen abgegrenzt, die Aussen- und die Innenmembran. Die Membranen unterteilen das Organell in zwei wässrige Subkompartimente, den Intermembranraum und die Matrix. Die Innenmembran bildet Ausstülpungen, die in den Matrixraum reichen und als Cristae bezeichnet werden. Die überwiegende Zahl der mitochondrialen Proteine wird im Zellkern kodiert und an zytosolischen Ribosomen translatiert. Mitochondrien besitzen darüber hinaus ein eigenes Genom, die mitochondriale DNA (mtDNA), und einen eigenen Proteinsyntheseapparat. Das menschliche Mitochondrium enthält schätzungsweise bis zu 2000 Proteine, wovon allerdings nur dreizehn, allesamt Proteinunterheiten des ATP-generierenden Systems in der Innenmembran, von der mitochondrialen DNA kodiert werden.

Alle anderen Proteine müssen vom Zytosol in die Mitochondrien transportiert und dort in die entsprechenden Zielkompartimente sortiert werden.

1.1 Proteinimport in Mitochondrien

Die Biogenese der Mitochondrien erfolgt nicht *de novo*, sondern durch Ausdehnung und Teilung präexistierender Organellen. Mitochondrien enthalten hochkomplexe Sortierungsmaschinerien in der Außen- und Innenmembran, die einen ständigen Import von neuen Proteinen in bestehende Strukturen ermöglichen.

Alle Proteine, die in das Mitochondrium importiert werden sollen, enthalten eine mitochondriale Targetingsequenz. Weitere Signale bestimmen, ob sie in eine der Membranen inseriert werden, bis in die Matrix transportiert werden, oder im Intermembranraum verbleiben. Die meisten löslichen Matrixproteine, aber auch einige Innenmembran- und Intermembranraumproteine werden mit einer N-terminalen Präsequenz von etwa 20 bis 60 Aminosäuren synthetisiert, die nach dem Import in die Matrix proteolytisch abgespalten wird. Andere Vorstufenproteine wie alle Außenmembranproteine, die meisten Innenmembranproteine und einige Intermembranraumproteine enthalten interne topogene Signale, die nicht abgespalten werden. Präsequenzen und interne Importsignale werden von unterschiedlichen Rezeptoren auf der Außenseite der Mitochondrien erkannt. Die Vorstufenproteine werden dann unter Verbrauch von ATP durch Proteinkanäle in der Außenmembran, den TOM-Komplex (Translocase of the Outer Membrane), und in der Innenmembran, die TIM22- und TIM23-Komplexe (Translocase of the Innner Membrane), transportiert und in das jeweilige Zielkompartiment sortiert. Die Mechanismen des Proteinimports in Mitochondrien sind besonders in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und in dem roten Brotschimmelpilz *Neurospora crassa* gut charakterisiert (Bauer et al., 2002; Neupert, 1997; Pfanner and Geissler, 2001) (Abb. 1).

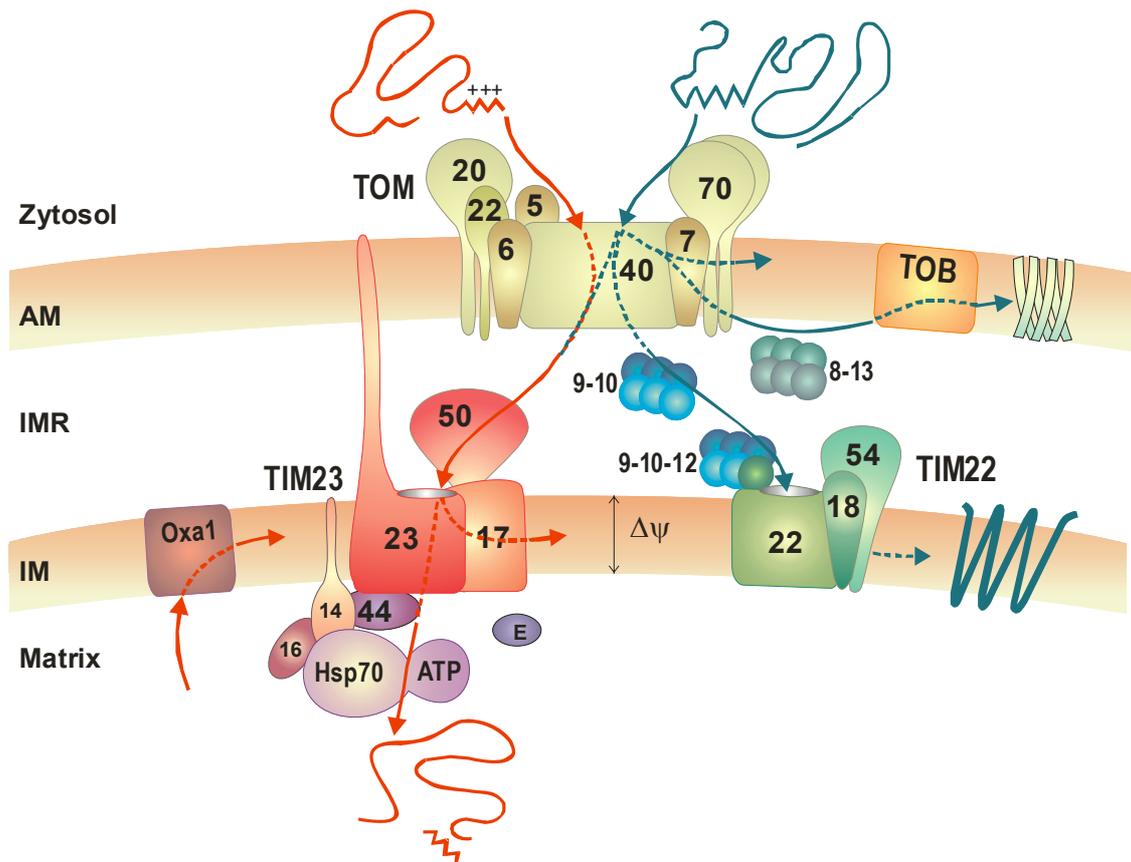


Abb. 1 Schematische Übersicht über die mitochondriale Proteinimportmaschinerie der Hefe. Vorstufenproteine werden durch den TOM-Komplex über die Außenmembran (AM) transportiert. Dabei binden Präsequenzen an die Rezeptoren Tom20 und Tom22, während Tom70 interne Signalsequenzen erkennt. Die Insertion in die Außenmembran wird durch den TOM-Komplex vermittelt. Proteine mit komplexer Topologie werden mit Hilfe des Tob55 inseriert. Der Transport über bzw. in die Innenmembran(IM) wird von den Innenmembran-Translokasen TIM23 und TIM22 vermittelt. Präsequenz-enhaltende Vorstufenproteine werden mit Hilfe des TIM23-Komplexes der Innenmembran in die Matrix transportiert. Der an der Matrixseite assoziierte molekulare Motor bestehend aus Tim44, Tim14, Tim16, Hsp70 und dem Co-Chaperon Mge1 treibt die Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix unter Verbrauch von ATP voran. Der TIM22-Komplex in der Innenmembran katalysiert die Insertion einer Klasse von Membranproteinen mit internen Signalsequenzen. Der Transport dieser hydrophoben Proteine über den Intermembranraum (IMR) erfolgt mit Hilfe der kleinen Tim-Proteine. Der Tim9-Tim10-Komplex und der an Tim22 assoziierte Tim9-Tim10-Tim12-Komplex vermitteln den Import von Metabolit-Carriern, während der Tim8-Tim13 Komplex den Import von Tim23 unterstützt. Der Oxa1-Komplex in der Innenmembran vermittelt die Membraninsertion von Proteinen aus der Matrix. Die Bezeichnungen der Proteine orientieren sich an ihrem apparenten Molekulargewicht.

1.1.1 Transport über die Außenmembran: der TOM-Komplex

Die mitochondriale Außenmembran ist nur für kleine Moleküle bis zu einer Größe von etwa 5 kDa durchlässig. Der Transport von Vorstufenproteinen über die Außenmembran sowie die Insertion von Proteinen mit einfacher Topologie in die Membran wird durch den TOM-Komplex katalysiert (Übersichtsartikel: (Endo and Kohda, 2002; Meisinger et al., 1999; Rapaport, 2002). Die Kerndomäne dieser Translokase, auch GIP (General Import Pore) genannt, besteht aus der kanalbildenden Komponente Tom40, Tom22 sowie den kleinen Komponenten Tom5, Tom6 und Tom7 (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998; Kunkele et al., 1998). Weitere Bestandteile des TOM-Komplexes sind die initialen Rezeptoren Tom20 und Tom70. Tom20 erkennt bevorzugt aminoterminaler Präsequenzen, während Tom70-Oligomere als Rezeptoren für hydrophobe Vorstufenproteine mit internen 'Targeting'-Signalen fungieren (Abe et al., 2000; Sollner et al., 1989; Sollner et al., 1990). Beide binden an Tom22, das die Vorstufenproteine zu Tom40 transferiert (van Wilpe et al., 1999). Die Assemblierung von Tom22 und Tom40 wird durch Tom6 unterstützt (Alconada et al., 1995; Dekker et al., 1998). Tom5 weist auch Rezeptoreigenschaften auf und ist vermutlich am Transfer der Präproteine zu Tom40 beteiligt (Dietmeier et al., 1997). Tom7 dagegen fördert die Dissoziation des Komplexes, um eine laterale Insertion eines Vorstufenproteins in die Außenmembran zu ermöglichen (Honlinger et al., 1996). Tom40, das einzige essentielle Tom-Protein (Baker et al., 1990; Vestweber et al., 1989), bildet pro GIP zwei bis drei Kanäle mit einem Durchmesser von etwa 2 nm (Ahting et al., 1999; Kunkele et al., 1998). Der Transport eines Proteins durch den TOM-Komplex wird energetisch möglicherweise dadurch begünstigt, dass die Präsequenz mit einer höheren Affinität an Bindungsstellen an Tom40 oder Tom22 auf der *trans*-Seite der Außenmembran bindet (Mayer et al., 1995a).

In der Außenmembran wurde vor kurzem ein weiterer Komplex identifiziert, der essentiell für die Topogenese von ' β -barrel' Proteinen ist; er wird als der TOB-Komplex (Topogenesis of Mitochondrial Outer Membrane β -barrel proteins) oder SAM-Komplex (Sorting and Assembly Machinery) bezeichnet. Vorstufenproteine mit komplexer Topologie, wie das ' β -barrel' Protein Tom40, passieren zuerst den TOM-Komplex und anschließend wird ihre Insertion in die Außenmembran durch den TOB-Komplex vermittelt (Wiedemann et al., 2003). Der TOB-Komplex enthält neben Mas37 das essentielle Tob55 (Sam50) (Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003). Tob55 ist in Eukaryonten evolutionär konserviert und weist Sequenzähnlichkeit zu dem bakteriellen Omp85 auf. Gereinigtes Tob55 zeigt in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Ringstruktur mit fünffacher Rotationssymmetrie.

Es interagiert während ihres Imports direkt mit ' β -barrel' Vorstufenproteinen (Paschen et al., 2003).

1.1.2 Import in die Matrix und Insertion in die Innenmembran: der TIM23-Komplex

Für den Weitertransport in die Matrix oder die Innenmembran kooperiert der TOM-Komplex in der Außenmembran mit zwei TIM-Komplexen in der Innenmembran, dem TIM23- und TIM22-Komplex.

Der Import von Präsequenz-enthaltenden Proteinen wird von der TIM23-Translokase vermittelt (Übersichtsartikel: (Bauer et al., 2000; Jensen and Dunn, 2002; Kunkele et al., 1998; Neupert, 1997; Rehling et al., 2003b). Dies sind zumeist lösliche Matrixproteine, aber auch einige Innenmembranproteine. Der TIM23-Komplex besteht aus den membranintegralen Untereinheiten Tim17 und Tim23 in äquimolaren Mengen. Tim44 ist von der Matrixseite aus mit dem TIM23-Komplex assoziiert (Dekker et al., 1993; Emtage and Jensen, 1993; Horst et al., 1993; Maarse et al., 1994; Moro et al., 1999; Ryan et al., 1994). Weitere Bestandteile sind Tim50 (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002) und Tim14 (Mokranjac et al., 2003b). Tim17 und Tim23 sind verwandte Proteine mit jeweils vier Transmembrandomänen, die den Proteinkanal in der Innenmembran bilden (Berthold et al., 1995; Truscott et al., 2001). Der N-Terminus von Tim23 durchspannt darüber hinaus die Außenmembran (Donzeau et al., 2000). Damit ist Tim23 das erste bekannte Protein, das Außenmembran und Innenmembran durchspannt und somit in enge räumliche Nähe bringt. Dadurch kann eine effiziente Kooperation mit dem TOM-Komplex unterstützt werden. Die Intermembranraumdomäne von Tim23 kann $\Delta\Psi$ -abhängig dimerisieren und exponiert damit negative Ladungen, die als Rezeptor für eine positiv geladene Präsequenz dienen. Die Bindung einer Präsequenz induziert die Dissoziation des Dimers und damit die Öffnung des Translokationskanals (Bauer et al., 1996). Tim50 exponiert eine große C-terminale Domäne in den Intermembranraum, die mit Tim23 interagiert. Es steht mit Präproteinen während des Imports in Kontakt (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002) und man nimmt an, dass die Intermembranraumdomänen von Tim23 und Tim50 in Kooperation die Translokation über die äußere und innere Membran verbinden (Mokranjac et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002). Die Deletion von Tim50 führt zwar zu einer deutlichen Reduktion im Import von Matrixproteinen, der Import von Intermembranraumproteinen mit einem 'Stop-Transfer' Signal ist dahingegen nur leicht reduziert (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a).

Für die Translokation der Vorstufenproteine in die Matrix sind ein Membranpotential $\Delta\Psi$ über der Innenmembran sowie ATP in der Matrix als Energiequelle erforderlich (Neupert and Brunner, 2002). Die Translokationspore übernimmt während des Imports keine aktive Rolle, sie erlaubt sogar die freie Oszillation eines Vorstufenproteins im Kanal (Berthold et al., 1995; Ungermann et al., 1994). Um die vektorielle Translokation von Proteinen zu ermöglichen, ist von der Matrixseite ein molekularer Motor assoziiert, der die Translokation des Vorstufenproteins in die Matrix antreibt. Dieser Motor besteht aus Tim44, mitochondrialem Hsp70 (mtHsp70) und seinem Ko-Chaperon Mge1, sowie Tim14 und Tim16 (Frazier et al., 2004; Kozany et al., 2004; Kronidou et al., 1994; Matouschek et al., 2000; Mokranjac et al., 2003b; Moro et al., 1999; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Am Ausgang des Importkanals bindet Hsp70 an die austretenden Vorstufenproteine und hindert sie dadurch am Zurückgleiten. In wiederholten Zyklen von Bindung und Freisetzung in einem ‚Hand-über-Hand‘ Mechanismus werden die Vorstufenproteine unter Verbrauch von ATP vollständig in die Matrix importiert (Neupert and Brunner, 2002; Okamoto et al., 2002; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Der Import wird durch die Prozessierung der Targetingsequenz durch MPP (Mitochondriale Prozessierungspeptidase) und die Faltung des Proteins durch mitochondriale Chaperone vollendet.

1.1.3 Export aus der Matrix: Oxa1

Eine weitere Klasse von Innenmembranproteinen, die auch Homologe in Prokaryonten aufweisen, wird zuerst über den TIM23-Komplex in die Matrix importiert. In einem zweiten unabhängigen Schritt werden diese Vorstufenproteine mit Hilfe des Oxa1 von der Matrixseite in die Innenmembran inseriert (Hell et al., 1998; Stuart, 2002). Oxa1 ist ein evolutionär konserviertes integrales Innenmembranprotein, das der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie angehört (Kuhn et al., 2003). Es weist fünf Transmembrandomänen auf, wobei der N-Terminus zum Intermembranraum, der C-Terminus zur Matrixseite exponiert ist. Oxa1 ist nicht nur für den Import einer Reihe von nukleär kodierten Proteinen verantwortlich, sondern vermittelt auch die Membraninsertion von mitochondrial kodierten Proteinen (Herrmann et al., 1997). Hierbei interagiert Oxa1 direkt mit der naszierenden Proteinkette; der C-Terminus von Oxa1 ist dabei mit mitochondrialen Ribosomen in Kontakt (Hell et al., 2001; Szyrach et al., 2003). Die Insertion von Proteinen durch Oxa1 verläuft demnach kotranslational.

1.1.4 Insertion in die Innenmembran: der TIM22-Komplex

Eine weitere Translokase in der inneren mitochondrialen Membran, der TIM22-Komplex, vermittelt den Import von polytopischen Membranproteinen, die keine N-terminale Präsequenz aufweisen (Sirrenberg et al., 1996); zu ihnen gehören vor allem die mitochondrialen Carrier-Proteine (Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1996), aber auch andere Innenmembranproteine wie die Importkomponenten Tim23, Tim17 und Tim22 (Kaldi et al., 1998; Leuenberger et al., 1999; Paschen et al., 2000). Bei allen handelt es sich um sehr hydrophobe Proteine, die mit mehreren Transmembrandomänen die Innenmembran durchspannen. Sie enthalten über die gesamte Proteinsequenz verteilt mehrere, bisher nicht genau charakterisierte, interne Targetingsignale.

Die TIM22-Translokase besteht in der Hefe aus den membranintegralen Komponenten Tim22, Tim54 und Tim18 sowie den peripheren kleinen Tim-Proteinen Tim12, Tim9 und Tim10 (Adam et al., 1999; Kerscher et al., 1997; Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 1998a; Koehler et al., 1998c; Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998).

Tim22 ist die zentrale Komponente des TIM22-Komplexes. Es weist strukturelle Ähnlichkeit mit Tim17 und Tim23 auf und enthält wie diese vier Transmembrandomänen (Sirrenberg et al., 1996). Die N- und C-Termini sind zum Intermembranraum exponiert. Diese strukturellen Gemeinsamkeiten legen nahe, dass die kodierenden Gene durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind (Bauer et al., 1999b; Paschen et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996).

Tim22 ist das einzige essentielle Protein des membranintegralen Teils des TIM22-Komplexes. Tim22 bildet ähnlich wie Tim23 einen Translokationskanal in der Innenmembran. Dies wurde anhand von rekombinant exprimiertem und in Liposomen rekonstituiertem Tim22 nachgewiesen. Der Kanal wird durch Anlegen einer Spannung aktiviert und weist eine Porengröße von 11 bis 18 Å auf. Er reagiert spezifisch auf ein synthetisches Peptid, das auf dem internen Targetingsignal eines Carriers basiert, aber nicht auf Präsequenzen (Kovermann et al., 2002). In Experimenten mit gereinigtem TIM22-Komplex konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die native Translokase aus einer Doppel-Pore besteht, deren zwei Kanal-Aktivitäten eng miteinander gekoppelt sind. Die treibende Kraft für die Proteintranslokation, das Membranpotential $\Delta\Psi$, wirkt dabei zuerst auf das Vorstufenprotein selbst und dann auf den Proteinkanal (Rehling et al., 2003a).

Die Funktion von Tim54 liegt vermutlich in der Stabilisierung des TIM22-Komplexes. Hefemutanten, in denen Tim54 deletiert wurde, sind lebensfähig, aber in Mitochondrien

dieser Hefezellen ist der TIM22-Komplex destabilisiert (Kovermann et al., 2002). Eine direkte Rolle von Tim54 beim Proteinimport konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die genaue Funktion von Tim18 ist ebenfalls nicht bekannt; es ist möglicherweise an der Assemblierung und Stabilisierung des TIM22-Komplexes beteiligt (Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000). Tim18 ist wie Tim54 nicht essentiell und bindet nicht an Vorstufenproteine während des Imports.

1.1.5 Chaperone im Intermembranraum: die kleinen Tim-Proteine

Beim Import von hydrophoben Membranproteinen kooperieren Tim22 und Tim54 mit kleinen, strukturell verwandten Hilfsproteinen im Intermembranraum, Tim9, Tim10, Tim12, Tim8 und Tim13 (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998a; Koehler et al., 1999; Koehler et al., 1998c; Paschen et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Sie werden aufgrund ihres geringen Molekulargewichts auch 'kleine Tim-Proteine' genannt. Sie sind Mitglieder einer Familie von Proteinen, die typischerweise vier konservierte Cystein-Reste enthalten. Mit diesem Cys₄-Motiv binden sie zweiwertige Metall-Ionen und bilden somit wahrscheinlich eine typische Zinkfingerstruktur. Tim9, Tim10 und Tim12 sind in zwei verschiedenen, hetero-oligomeren Komplexen im Intermembranraum organisiert: einem Tim9-10-Komplex und einem Tim9-10-12-Komplex. Nur der Tim9-10-12-Komplex ist eng mit der Innenmembran assoziiert und bildet mit Tim22, Tim54 und Tim18 einen 300-kDa Komplex (Adam et al., 1999; Sirrenberg et al., 1998), der Tim9-10-Komplex hat ein Molekulargewicht von 70 kDa und ist löslich im Intermembranraum. Zur Untersuchung der Funktion von Tim9, Tim10 und Tim12 wird oft ihre Rolle in dem ausführlich charakterisierten Import von Carrier-Vorstufenproteinen verwendet:

In der Hefe gibt es 35 verschiedene mitochondriale Carrier-Proteine (Nelson et al., 1998). Sie sind für den Austausch von Metaboliten zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol verantwortlich. Der ADP/ATP-Carrier (AAC) ist unter allen Carriern am häufigsten vertreten und wurde in vielen Studien als Modellprotein für den Import von Carriern verwendet. Es konnten fünf Stufen während des Imports des AAC unterschieden werden (Abb. 2). AAC-Vorstufenproteine werden nukleär kodiert und im Zytosol synthetisiert. Dort schützt die Bindung durch zytosolische Chaperone wie Hsp70 oder MSF vor Aggregation und ermöglicht die Erkennung durch die Importrezeptoren auf der Außenmembran (Stufe I) (Hachiya et al., 1993; Komiya et al., 1997). Die verschiedenen Importsignale binden an mehrere Moleküle des Rezeptors Tom70 und induzieren dessen Oligomerisierung (Stufe II)

(Ryan et al., 1999; Wiedemann et al., 2001). Die Loslösung des AAC von Tom70 erfolgt ATP-abhängig und ermöglicht die Translokation über die Außenmembran (Stufe III) (Hachiya et al., 1995). Sie erfolgt wie bei Präproteinen mit N-terminaler Targetingsequenz über den TOM-Komplex, allerdings nicht in Form einer gestreckten Polypeptidkette, sondern in teilweise gefalteter Konformation (Endres et al., 1999; Wiedemann et al., 2001). Während das dritte Modul noch im TOM-Komplex gebunden ist, werden die zum Intermembranraum exponierten Module von dem löslichen Tim9-10-Komplex gebunden (Stufe IIIa) (Adam et al., 1999; Endres et al., 1999). Tim9 und Tim10 binden hierbei präferentiell an die Transmembrandomänen, aber auch an die Loops des Carriers (Curran et al., 2002; Vasiljev et al., 2003). Die Ablösung des AAC vom TOM-Komplex erfordert einen intakten Tim9-10-Komplex im Intermembranraum (Truscott et al., 2002). Es erfolgt eine Übergabe von dem Tim9-10-Komplex auf Tim9-10-12, der über Tim12 fest an den TIM22-Komplex in der Innenmembran assoziiert sind. Dabei bleibt das Vorstufenprotein noch an den TOM-Komplex gebunden (Stufe IIIb) (Endres et al., 1999). Es existiert also kein lösliches Translokationsintermediat im Intermembranraum.

Die kleinen Tim-Proteine halten somit vermutlich die Vorstufenproteine während des Imports in einem importkompetenten Zustand, indem sie den hydrophoben Proteinen im wässrigen Milieu ihre native Konformation sichern. Die Insertion des AAC in die Innenmembran über den TIM22-Komplex (Stufe IV) ist von der Anwesenheit eines Membranpotentials abhängig. In der Innenmembran erfolgt die Assemblierung des AAC zum funktionellen Dimer (Stufe V).

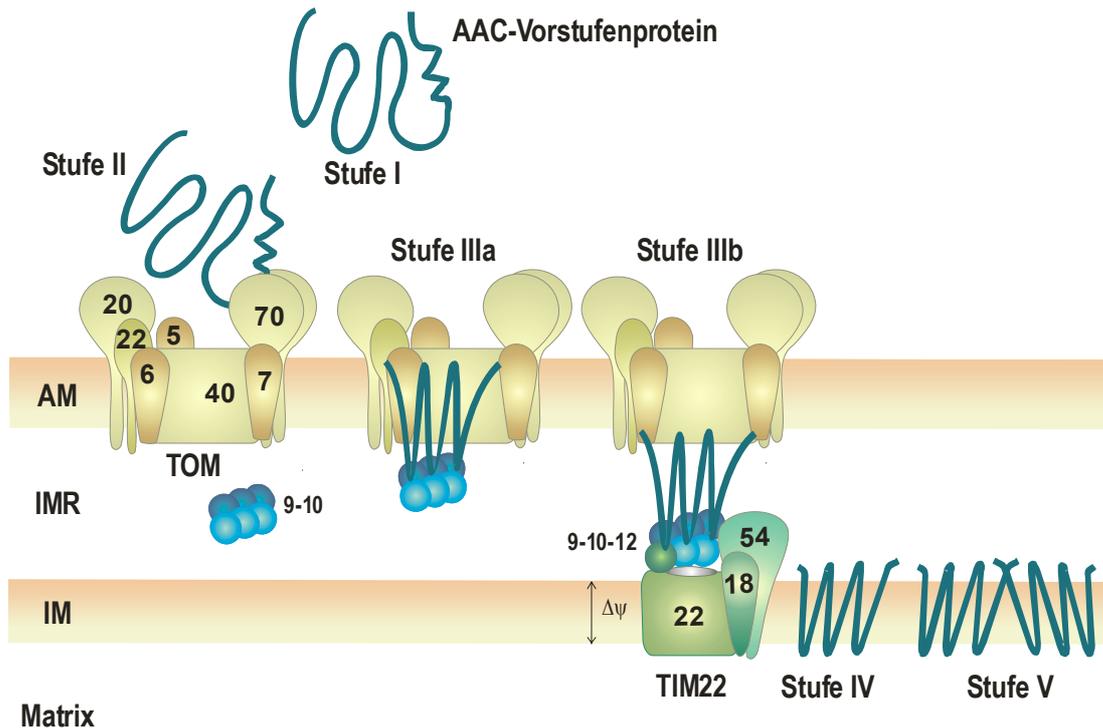


Abb. 2 Schematische Darstellung der einzelnen Stufen beim Import des AAC. AAC-Vorstufenproteine werden im Zytosol synthetisiert und dort von Chaperonen gebunden (Stufe I). Interne Signalsequenzen werden von dem Außenmembranrezeptor Tom70 erkannt (Stufe II). Der Transport der Vorstufenproteine über die Außenmembran erfolgt über den TOM-Komplex, an dessen Intermembranraumseite sie von einem Komplex aus Tim9 und Tim10 gebunden werden (Stufe IIIa). Der Tim9-Tim10-Komplex hält die hydrophoben Carrier-Proteine bei der Passage durch den Intermembranraum in einem importkompetenten Zustand und bindet über Tim12 an den TIM22-Komplex (Stufe IIIb), der die Insertion in die Membran vermittelt (Stufe IV). Dort erfolgt die Assemblierung zum funktionellen Dimer (Stufe V).

Die Hefe kodiert für zwei weitere Cys₄-Zinkfinger-Proteine, Tim8 und Tim13, die strukturell mit den anderen kleinen Tim-Proteinen verwandt sind (Koehler et al., 1999; Paschen et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen sind sie jedoch nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefezellen. Sie bilden ebenfalls einen hetero-oligomeren 70 kDa-Komplex im Intermembranraum.

Tim8 und Tim13 unterscheiden sich von Tim9, Tim10 und Tim12 in ihrer Substratspezifität. Sie sind nicht am Import der Carrier, sondern anderer hydrophober Membranproteine wie Tim23 beteiligt (Leuenberger et al., 1999; Paschen et al., 2000). Die Unterstützung des Imports von Tim23 durch den Tim8-13-Komplex ist bei einem hohen Membranpotential nicht erforderlich. Wenn aber das Membranpotential niedrig ist, scheint die Effizienz der

Translokation von Tim23 über die Außenmembran verringert. Unter diesen Bedingungen ist die Insertion von Tim23 in die Innenmembran von der Bindung des Tim8-13-Komplexes an das Translokationsintermediat abhängig (Paschen et al., 2000).

Sie spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Biogenese von ' β -barrel' Proteinen der Außenmembran. Vor kurzem wurde gezeigt, dass kleine TIM-Komplexe des Intermembranraums an der Bildung von frühen Assemblierungs-Intermediaten während des Imports von Tom40 beteiligt sind (Hoppins and Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004).

1.2 Mitochondriale Proteintranslokasen in Säugetieren

Im Gegensatz zu den umfangreichen Daten, die über die mitochondrialen Importsysteme der Hefe in den letzten Jahren gesammelt wurden, ist von den entsprechenden Translokasen in Mitochondrien von Säugetieren bisher relativ wenig bekannt. Vorstufenproteine aus Hefe oder aus *N. crassa* konnten *in vitro* in Säugetiermitochondrien importiert werden. Genauso wurden auch Säugetierproteine in Mitochondrien aus niedrigeren Eukaryonten importiert. Die Energieanforderungen sind bei diesen Experimenten ähnlich. Es liegt deshalb nahe zu vermuten, dass die Importsysteme evolutionär stark konserviert sind.

Es wurden bereits einige Proteinhomologe zu den aus Hefen bekannten Importkomponenten in Säugetieren identifiziert (Hoogenraad et al., 2002). Zu den bisher bekannten Komponenten des TOM-Komplexes gehören die Rezeptoren Tom70, Tom20 und Tom22 sowie das kanalbildende Tom40. Weiterhin wurde ein humanes Homolog zu Tom7 gefunden, das evolutionär hochkonserviert ist. Es assembliert nicht, wie in der Hefe, in präexistierende Komplexe, sondern in ein 120 kDa Intermediat (Johnston et al., 2002). Homologe zu Tom5 und Tom6 konnten bisher nicht in humanen Datenbanken identifiziert werden. Allerdings konnten mit Antikörpern gegen Tom40 aus Rattenmitochondrien kleine Proteine mitgefällt werden, bei denen es sich um entsprechende Tom5, Tom6 und Tom7 Proteine handeln könnte (Suzuki et al., 2000). Humanes Tom20 kann als funktionelles Homolog zu Tom20 den entsprechenden Deletionsphänotyp in der Hefe komplementieren und mit Tom-Untereinheiten in der Hefe interagieren (Goping et al., 1995; Hanson et al., 1996). Überexpression des humanen Tom20 in Säugetierzellen führt zu einer drastischen Veränderung der Morphologie und Verteilung der Mitochondrien. Es wurde daher spekuliert, dass es an der Assoziation der Mitochondrien mit dem Zytoskelett beteiligt sein könnte (Yano et al., 1997). Ein menschliches Homologes zu Tom70 enthält zwei TPR-Motive und ist in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert (Edmonson et al., 2002). Tom22 ist fest mit Tom40 in einem Komplex von etwa 400 kDa assoziiert und bindet das lose assoziierte Tom20 (Suzuki et al.,

2000; Yano et al., 2000). Es wurden darüber hinaus noch weitere Komponenten in der Außenmembran von humanen Mitochondrien identifiziert, die am Proteinimport beteiligt sind, aber zu denen in der Hefe keine Homologe bekannt sind. Dazu gehört Metaxin, das Ähnlichkeit zu Mas37 aufweist und nicht mit Untereinheiten des TOM Komplexes assoziiert ist (Abdul et al., 2000; Armstrong et al., 1997). Humanes Tom34 zeigt Sequenzhomologie zu Tom70 (Nuttall et al., 1997) und übernimmt möglicherweise ähnliche Funktionen wie Tom70, da es interne Sequenzen von Vorstufenproteinen erkennt und nicht Präsequenzen (Mukhopadhyay et al., 2002). Tom34 ist mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert, aber hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass spezifische Antikörper gegen Tom34 den Import von einigen mitochondrialen Vorstufenproteinen inhibieren (Chewawiwat et al., 1999).

Auch für die Komponenten der TIM23-Translokase in der Innenmembran, Tim17, Tim23 und Tim44, konnten bereits Homologe in Säugetieren identifiziert werden (Bauer et al., 1999a; Bomer et al., 1996; Ishihara and Mihara, 1998; Wada and Kanwar, 1998). Tim44 ist in der Hefe fest mit dem TIM23-Komplex assoziiert; in Säugetieren ist es nur leicht gebunden und eher als lösliches Protein in der Matrix vorzufinden (Bauer et al., 1999a; Ishihara and Mihara, 1998). Im Gegensatz zur Hefe wurden in Säugetieren zwei Tim17-Homologe nachgewiesen, Tim17a und Tim17b. Sie werden beide in den meisten fötalen und adulten Geweben exprimiert, was es unwahrscheinlich macht, dass es sich hier um gewebsspezifische oder entwicklungspezifische Isoformen handelt. Sie formen zwei getrennte Komplexe mit Tim23, Tim17a-Tim23 und Tim17b-Tim23, die jeweils ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa aufweisen (Bauer et al., 1999a). Die funktionelle Signifikanz zweier TIM23-Komplexe ist aber bisher ungeklärt, sie könnte eine Anpassung an unterschiedliche Substratspezifitäten in höheren Eukaryonten darstellen.

1.3 Störungen des mitochondrialen Proteinimports

Das menschliche Homolog des Tim8 ist DDP1 (Deafness Dystonia Peptide 1), das genauso wie Tim8 als Chaperon im Intermembranraum an dem Import von Innenmembranproteinen wie Tim23 beteiligt ist (Rothbauer et al., 2001). Mutationen im X-chromosomal lokalisierten *DDP1*-Gen sind mit dem Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS) assoziiert, einer seltenen progressiven neurodegenerativen Erkrankung. Die typischen Syndrome des MTS sind sensorineurale Taubheit, Dystonie, sowie eine Vielzahl weiterer neurologischer Symptomen wie mentale Retardierung oder kortikale Blindheit (Mohr and Mageroy, 1960; Tranebjaerg et al., 1995). In den meisten Patienten kommt es aufgrund von Leserasterverschiebungen oder

Stopmutationen zu einem vollständigen Verlust des DDP1-Proteins. Bisher ist nur eine einzige Punktmutation bekannt, die zu einem Aminosäureaustausch in DDP1 führt. Hierbei wird eines der konservierten Cysteine, die in den Hefeproteinen an der Bindung von Metall-Ionen beteiligt sind, durch ein Tryptophan ersetzt (C66W) (Tranebjaerg et al., 2000). Mit DDP1 wurde somit erstmals eine Komponente, die am Import von Proteinen beteiligt ist, mit einer mitochondrialen Krankheit in Verbindung gebracht.

1.4 Biogenese der kleinen Tim-Proteine

Über den Import der kleinen Tim-Proteine selbst ist bisher noch wenig bekannt. Er erscheint sehr einfach, da er lediglich die Translokation über die Außenmembran in den Intermembranraum erfordert. Die Erkennung der Vorstufenproteine erfolgt nicht über die Rezeptoren Tom20, Tom22 oder Tom70; Tom5 wurde als möglicher Rezeptor vorgeschlagen (Kurz et al., 1999). Für den effizienten Import wird weder ATP noch ein Membranpotential über der Innenmembran benötigt. Die Vorstufenproteine werden in entfaltetem Zustand über die Außenmembran transportiert, erst im Intermembranraum nehmen sie eine gefaltete Konformation ein. Es wurde angenommen, dass die Faltung die treibende Kraft für den Import darstellt, da sie die Proteine daran hindert, in das Zytosol zurückzugleiten. Für einen effizienten Import und eine stabile Faltung der kleinen Tim Proteine sind die konservierten Cysteine und die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen erforderlich (Lutz et al., 2003). Die Inkorporation von Zn^{2+} -Ionen im Intermembranraum könnte also Voraussetzung für die korrekte Faltung der Proteine sein. Bisher ist noch nicht bekannt, auf welchem Weg die kleinen Tim Proteine Zn^{2+} -Ionen aufnehmen können. Es ist anzunehmen, dass ein bisher nicht identifizierter Faktor im Intermembranraum existiert, der die Übergabe von Zn^{2+} -Ionen an die kleinen Tim Proteine vermittelt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten der TIM22-Translokase im Menschen. Eine Besonderheit der TIM22-Translokase ist die Unterstützung des Imports der hydrophoben Membranproteine durch kleine Hilfsproteine im Intermembranraum. Im Rahmen von Vorarbeiten in unserem Labor wurden sechs humane Homologe zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe identifiziert: ein Tim9- und zwei Tim10-Homologe (Tim10a und Tim10b), ein Tim13- und zwei Tim8-Homologe (DDP1 und DDP2). Mit Datenbankanalysen sollten weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie aus verschiedenen Eukaryonten identifiziert werden und ihre evolutionäre Konservierung untersucht werden.

Alle kleinen Tim-Proteine zeichnen sich durch ein konserviertes Metallbindungsmotiv aus, das aus vier Cysteinresten gebildet wird. Es sollte untersucht werden, ob die humanen Proteine Metallionen binden können und somit in der Lage sind, eine Zinkfinger-ähnliche Struktur auszubilden. Mutationen, die zu einem Verlust des DDP1-Proteins führen, sind die Ursache für das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom. Bei einem Patienten war eines der vier Cysteine im DDP1 in Folge einer Punktmutation ausgetauscht (DDP1^{C66W}). Es sollte festgestellt werden, welche Konsequenzen sich aus dem Fehlen eines Cysteins für die Metallbindungs-Kapazität und für die Fähigkeit des Proteins, mit seinen Komplexpartnern zu interagieren, ergeben.

Eine Rolle weiterer menschlicher kleiner Tim Proteine bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen ist bisher nicht entdeckt worden, aber nicht ausgeschlossen. Es war daher von großem Interesse, die Organisation und Funktion der humanen Mitglieder der Familie der kleinen Tim-Proteine aufzuklären.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der humanen Komponenten, die entlang des Importweges für mitochondriale Metabolit-Carrier agieren. Dabei sollte insbesondere die strukturelle Organisation der hierbei beteiligten kleinen Tim-Proteine aufgeklärt werden. Dazu gehörten die Lokalisation sowie die Bestimmung der Zusammensetzung und der Größe der gebildeten Komplexe. Unter den sechs humanen kleinen Tim-Proteinen existieren Tim9- und Tim10- Homologe, aber kein Tim12-Homolog. Ein Aspekt war daher die Frage, ob eines dieser Proteine die Funktion von Tim12 ausübt. Ein weiteres Ziel war die Identifikation des humanen Tim22-Proteins und die Analyse der Interaktion des Tim22 mit den kleinen Tim Proteinen im humanen System. Im Vergleich zu den aus der Hefe bekannten Daten sollte untersucht werden, inwieweit die Funktion der humanen Proteine und die Mechanismen des Imports von mitochondrialen Carrier-Vorstufenproteinen im Menschen konserviert sind.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Präparation

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

Minipräparation von DNA

Zur Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurde der "QIAprep Miniprep Kit" der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde der entsprechende Klon in bis zu 5 ml LB_{Amp} Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Diese Übernachtskultur wurde zentrifugiert (4 000 rpm, 10 min, Hettich) und das Bakterienpellet in 250 µl Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/µl RNaseA, pH 8.0) aufgenommen. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) durch mehrmaliges invertieren für maximal 5 min bei RT. Zur Fällung der Proteine, Zelltrümmer und genomischen DNA wurde das Zell-Lysat mit 350 µl Neutralisationspuffer N3 (3 M KAc, pH 5.5) versetzt und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Nach Zentrifugation (13 000 rpm, 10 min, Tischzentrifuge) wurde der Überstand auf Silicagel-Säulen überführt und zentrifugiert (13 000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl H₂O und Zentrifugation (14 000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge) eluiert.

Alternativ zur Reinigung über die Silicagel-Säule konnte die Plasmid DNA aus dem Überstand der Proteinfällung auch durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol und anschließende Zentrifugation (14 000 rpm, 40 min, Tischzentrifuge, 4 °C) gefällt werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

Midipräparation von DNA

Zur Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA (bis zu 100 µg) wurde der "Qiagen Plasmid Midi-Kit" verwendet. Dazu wurden bis zu 50 ml einer Übernachtskultur eingesetzt. Die Pufferlösungen P1, P2 und P3 entsprachen denen des Kits zur Minipräparation und

wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte über Qiagen-Tip 100 Säulen. Aus dem Eluat der Säule wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol und anschließende Zentrifugation (13 000 rpm, 30 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst.

2.1.1.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Dabei werden zwei kurze Oligonukleotide als "Primer" verwendet, die zu den Enden der gewünschten DNA-Sequenzen komplementär sind. Durch wiederholte Zyklen von Aufschmelzung der DNA-Stränge (Denaturierung), Anlagerung der Primer ("Annealing") und Auffüllen der freien 3'-Enden (Elongation) mit einer thermostabilen DNA Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) wird ein spezifischer DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt. Ein typischer präparativer Reaktionsansatz (50 µl) enthielt etwa 10 ng Plasmid-DNA oder cDNA oder 100 ng genomische DNA als Matrize (Template), 10 pmol jedes Primers, 50 µM Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), und 2 U Taq-Polymerase in entsprechendem PCR-Puffer. Im Allgemeinen wurden 25 bis 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 30 sec bis 1 min. Die Annealingtemperatur ist in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer zu wählen. Als Näherung gilt: $T_{\text{Annealing}} = \{4x(\text{G,C}) + 2x(\text{A,T})\} \text{ °C}$

Die Annealingzeit beträgt etwa 30 sec. Die Zeit der Elongation bei 72 °C ist von der Größe des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Als Näherungswert gilt eine Elongationszeit von 1 min für ein Fragment von der Größe einer Kilobase.

2.1.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA-Moleküle entsprechend ihrer spezifischen Erkennungssequenz. Die Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer durchgeführt. Es wurden jeweils 1-2 U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde zwischen 0,1 und 1,0 µg/µl gewählt. Die Inkubationszeiten lagen zwischen einer Stunde und über Nacht bei der für das Enzym angegebenen Temperatur. Die erhaltenen Fragmente und Vektoren wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert und daraus gereinigt.

2.1.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA Fragmenten wurde mit T4 DNA-Ligase durchgeführt. Das optimale Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA hängt von der Größe beider Fragmente ab und kann im einzelnen Fall durch verschiedene Ansätze getestet werden. Als Richtlinie gilt ein dreifacher molarer Überschuß von Vektor. Ein Ansatz von 10 µl enthielt 1 µl des mitgelieferten 10x Ligationspuffers und 1 U T4-Ligase und wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

2.1.3 DNA-Reinigung und -Analyse

2.1.3.1 Ethanolfällung

Durch Ethanolfällung kann DNA konzentriert und von Salzen befreit werden. Dazu wird eine DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt und wahlweise bei –20 °C über Nacht oder eine Stunde bei –80 °C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (14 000 rpm, 40 min, 4 °C, Tischzentrifuge) isoliert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min im Vakuum getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O resuspendiert.

2.1.3.2 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA.

2.1.3.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele in Konzentrationen von 0,7 bis 2 % durchgeführt. Zur Detektion der DNA-Banden wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) verwendet, der in die DNA interkaliert und sie so im UV-Licht (254 nm) sichtbar macht. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Auftragspuffer (0,05 % Xylenxyanol, 0,05 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll 400) versetzt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (890 mM Tris/HCl, 890 mM Borsäure, 5 mM EDTA, pH 8,3). Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen.

2.1.3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem "GFX-PCR DNA and Gel-Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Dazu wurde das Gelstück gewogen und in der dreifachen Menge eines chaotropen Puffers bei 50 °C aufgeschmolzen. Die Lösung wurde auf Silicagelsäulen geladen und zentrifugiert (11 000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl leicht alkalischem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) oder H₂O und Zentrifugation (14 000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge) eluiert.

2.1.3.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei der automatischen DNA-Sequenzanalyse werden DNA-Fragmente, die am 3'-Ende basenspezifische Fluoreszenzmarkierungen tragen, der Größe nach aufgetrennt und anhand der Markierung identifiziert. Durch Mischen von markierten Nukleotiden, die zum Kettenabbruch bei der DNA-Synthese führen, mit dNTPs erhält man in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer Abbruchfragmente jeder Länge. Die benötigten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) synthetisiert. Dazu wurden in einem 10 µl Ansatz 500 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer und 2 µl des Polymerase-Mix eingesetzt. Eine Sequenzier-PCR bestand aus 25 Zyklen 15 sec Denaturierung bei 94 °C, 15 sec Annealing bei 52 °C und 40 sec Elongation bei 60 °C. Zur Aufarbeitung der Sequenzierreaktion wurden die PCR-Produkte mit 170 µl Fällungsmix (125 µl Ethanol, 5 µl 3M Natriumacetat pH 4,8, 40 µl H₂O) 30 min präzipitiert und zentrifugiert (14 000 rpm, 40 min, 4 °C, Tischzentrifuge). Die Pellets wurden mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 13 µl Template Suppression Reagent (TSR) oder H₂O aufgenommen. Die Proben wurden bei 95 °C denaturiert, sofort 5 min auf Eis gekühlt und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt.

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

Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen zur Hitzeschocktransformation wurde eine *E.coli* Übernachtskultur 1:100 in 200 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)

verdünnt und zu einer OD₅₇₈ von 0,3 bis 0,4 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis gekühlt und zentrifugiert (2 500 rpm, 18 min, 4 °C, SS 34-Rotor, Sorvall). Das Bakterienpellet wurde in 60 ml TFB I Puffer (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O, 100 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,9) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (2 500 rpm, 18 min, 4 °C, SS 34-Rotor, Sorvall) wurde das Pellet in 8 ml TFB II Puffer aufgenommen und in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

Hitzeschocktransformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde ein Aliquot kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 4 µl eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zum Hitzeschock 1 bis 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 800 µl LB Medium verdünnt und mindestens 40 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden kurz zentrifugiert (3 000 rpm, 2 min, Tischzentrifuge), das Pellet in 150 µl Medium aufgenommen und auf einer LB_{Amp}-Platte ausplattiert (LB mit 1,5 % (w/v) Agar und 100 µg/ml Ampicillin).

2.1.5 Verwendete Plasmide

pMal cRI	Referenz
MBP-DDP1 (<i>H.s.</i>)	Rothbauer JBC 2001
MBP-DDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>)	Hofmann JBC 2002
MBP-Tim13 (<i>H.s.</i>)	Rothbauer JBC 2001

pQE	Referenz
His ₆ -DDP1 (<i>H.s.</i>) (pQE40)	Hofmann JBC 2002
His ₆ -DDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>) (pQE40)	Hofmann JBC 2002
Tim13-GST (<i>H.s.</i>) (pQE13)	Hofmann JBC 2002

pVT102	Referenz
Tim9 (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
Tim10a (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
Tim10b (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
Tim22 (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit

pGEM4	Referenz
ANT3 (<i>H.s.</i>)	de Marcos Lousa Biochemistry 2002
AAC (<i>N.c.</i>)	Pfanner JBC 1987

2.1.6 Klonierungsstrategien

Klonierungen von DDP1, DDP1^{C66W} und Tim13 in pMal cRI

Zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Maltosebindungsprotein wurde die betreffenden cDNA in einen pMal cRI Vektor (New England Biolabs) kloniert. Mit den Primern DDP1-1F (Bam HI)/ DDP1-1R (Xba I) oder Tim13-1F (BamHI)/ Tim13-1R (Xba) wurde aus spezifischen cDNA-Klonen (Bauer FEBS 1999) in einer PCR-Reaktion die cDNA von DDP1 oder Tim13 amplifiziert, die am 5'-Ende eine Bam HI Schnittstelle und am 3'-Ende eine Xba I Schnittstelle enthielten, die beide in den entsprechenden Primern enthalten waren. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xba I geschnitten und in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pMal cRI Vektor kloniert. Die DDP1^{C66W}-Mutation wurde durch sequenzspezifische Mutagenese erzeugt, mit der an Position 233 der kodierenden Sequenz von DDP1 ein Nukleotid (C → G) ausgetauscht wurde. Dazu wurde von einer DDP1 cDNA als Matrize ausgehend mit den Primern DDP1-1F (Bam HI)/ DDP1^{C66W}-R und DDP1^{C66W}-F/ DDP1-1R (Xba I) zwei getrennte, überlappende PCR-Fragmente amplifiziert, die in einer dritten PCR-Reaktion mit den äußeren Primern DDP1-1F (Bam HI)/ DDP1-1R (Xba I) kombiniert wurden. Die auf diese Weise mutagenisierte cDNA wurde entsprechend mit Bam HI und Xba I in pMal cRI kloniert.

Klonierungen von DDP1, DDP1^{C66W} und Tim13 in pQE

Zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Hexahistidinpeptid wurde die betreffenden cDNA in einen pQE40 Vektor (Qiagen) kloniert. Die Expression von

Fusionsprotein mit C-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) erfolgte von einem modifizierten pQE13 Vektor (Qiagen) (Bauer Cell 1996). Mit den Primern DDP1-1F (Bam HI)/ DDP1-2R (Hind III) wurde aus spezifischen cDNA-Klonen in einer PCR die cDNA von DDP1 oder DDP1^{C66W} amplifiziert, die am 5'-Ende eine Bam HI Schnittstelle und am 3'-Ende eine Hind III Schnittstelle enthielten, die beide in den entsprechenden Primern enthalten waren. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III geschnitten und in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pQE40 Vektor kloniert. Die cDNA von Tim13 wurde mit den Primern Tim13-2F (Eco RI)/ Tim13-2R (Sma I) mit den Schnittstellen Eco RI und Sma I amplifiziert und in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pQE13 Vektor kloniert.

Klonierungen von Tim9, Tim10a, Tim10b und Tim22 in pVT102

Zur heterologen Expression in Hefe wurden die menschlichen Tim Proteine in einen pVT102 Vektor (Vernet Gene 1987) kloniert. Mit den Primern Tim9-F (Bam HI)/ Tim9-R (Hind III), Tim10a-F (Bam HI)/ Tim10a-R (Hind III) und Tim10b-F (Bam HI)/ Tim10b-R (Hind III) wurde aus spezifischen cDNA-Klonen in einer PCR die cDNA von Tim9, Tim10a oder Tim10b amplifiziert und unter Verwendung der Schnittstellen Bam HI und Hind III in einen pVT102 Vektor kloniert. Da Tim22 eine interne Schnittstelle für Bam HI besitzt, wurde dieses PCR-Fragment mit den Primern Tim22-F (Bgl II)/ Tim22-R (Hind III) amplifiziert, mit Bgl II und Hind III geschnitten und in einen mit Bam HI und Hind III geschnittenen pVT102 kloniert.

T/A-Klonierung von PCR-Produkten

Die geringe Aktivität einiger Restriktionsenzyme an Enden von durch PCR erzeugten DNA-Fragmenten führt häufig zu unvollständigen Schnitten, was die Klonierungseffizienz drastisch reduziert. PCR-Produkte wurden daher ohne Restriktionsverdau in die Vektoren pT-Adv (Clontech) oder pGEM-T (Promega) kloniert, die an den 3'-Enden ungepaarte Thymidin-Nukleotide enthalten. Durch Taq-Polymerase erzeugte DNA-Fragmente tragen an den 5'-Enden häufig überhängende Adenosin-Nukleotide und können deshalb direkt in diese Plasmide eingesetzt werden.

2.1.7 Verwendete Primer

Primer	Sequenz
DDP1-1F (Bam HI)	5'-CCC <u>GGA TCC</u> ATG GAT TCC TCC TCC TCT TCC TCC GCG-3'
DDP1-1R (Xba I)	5'-CCC <u>TCT AGA</u> TCA GAA AGG CTT TCT GAG-3'
Tim13-1F (BamHI)	5'-CCC <u>GGA TCC</u> ATG GAG GGC GGC TTC GG-3'
Tim13-1R (Xba)	5'-CCC <u>TCT AGA</u> TCA CAT GTT GGC TCG TTC-3'
DDP1 ^{C66W} -R	5'-CTC AAC CCA GTT CAC AAA AC-3'
DDP1 ^{C66W} -F	5'-TTG TGA ACT GGG TTG AGC-3'
DDP1-2R (Hind III)	5'-CCC <u>AAG CTT</u> TCA GTC AGA AAG GCT TTC TGA G-3'
Tim13-2F (Eco RI)	5'-GGG <u>GAA TTC</u> ATG GAG GGC GGC TTC GG-3'
Tim13-2R (Sma I -stop)	5'-GGG <u>CCC GGG</u> ACA TGT TGG CTC GTT C-3'
Tim9-F (Bam HI)	5'-CCC <u>GGA TCC</u> ATG GCT GCA CAA ATA CC-3'
Tim9-R (Hind III)	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA TCG TGG TTG GCC AAG-3'
Tim10a-F (Bam HI)	5'-CCC <u>GGA TCC</u> ATG GAT CCT CTC AGG GCC CAA C-3'
Tim10a-R (Hind III)	5'-CCC <u>AAG CTT</u> TCA TGC AGG CCC AGA GC-3'
Tim10b-F (Bam HI)	5'-CCC <u>GGA TCC</u> ATG GAG CGG CAG CAG CAG-3'
Tim10b-R (Hind III)	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CTA GCT GCC TGA TGG AGA GAC C-3'
Tim22-F (Bgl II)	5'-CCC <u>AGA TCT</u> ATG GCG GCG GCC GCC CCC AAT GC -3'
Tim22-R (Hind III)	5'-CCC <u>AAG CTT</u> TCA CCG GAG GTA ATA ATC AAT CGC-3'

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W334a	MATa, leu2, ura3-52	Hovland Gene 1989
Tim10(Gal10)	W334a, tim10::TIM10(Gal10), LEU2	Sirrenberg Nature 1998
Tim12(Gal10)	W334a, tim12::TIM12(Gal10), LEU2	Sirrenberg Nature 1998
Tim22(Gal10)	W334a, tim22::TIM22(Gal10), LEU2	Sirrenberg Nature 1996
Tim10(Gal10)+Tim9	W334a, tim10::TIM10(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim9 pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim10(Gal10)+Tim10a	W334a, tim10::TIM10(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim10a pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim10(Gal10)+Tim10b	W334a, tim10::TIM10(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim10b pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim12(Gal10)+Tim9	W334a, tim12::TIM12(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim9 pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim12(Gal10)+Tim10a	W334a, tim12::TIM12(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim10a pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim12(Gal10)+Tim10b	W334a, tim12::TIM12(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim10b pVT102(URA)	diese Arbeit
Tim22(Gal10)+Tim22	W334a, tim22::TIM22(Gal10), LEU2 +Plasmid Tim22 pVT102(URA)	diese Arbeit

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefekulturen erfolgte bei 30 °C in Laktatmedium oder in YPD Medium. Hefestämme, die mit Hilfe eines Auxotrophie-Markers selektiert werden sollten, wurden in SD-Laktatmedium kultiviert, das entsprechend der gewünschten Selektionsbedingungen mit Markersubstanzen supplementiert war.

Hefestämme wurden in 15 % (v/v)-Glyzerin bei –80 °C gelagert. Aus diesen Stammkulturen wurden die Zellen auf den entsprechenden Agarplatten (YPD oder selektive SD-Laktat Platten) ausgestrichen. Mit einer Einzelkolonie wurden 20 ml Medium angeimpft und über Nacht geschüttelt (130 rpm, 30 °C). Für die Isolierung von Mitochondrien wurde diese Vorkultur mehrmals mit frischem Medium auf eine OD₅₇₈ von 0,05 bis 0,1 verdünnt und neu

angezogen. Die Hauptkultur wurde auf eine OD₅₇₈ von 0,1 bis 0,2 angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei einer OD₅₇₈ von 1,0 bis 1,5 geerntet.

2.2.3 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae*

Zur Regulation der Expression von essentiellen Proteinen kann das entsprechende Gen unter der Kontrolle des *Gall10* Promotors exprimiert werden. Dies erlaubt es, unter Abwesenheit von Galaktose im Medium die Expression des Proteins zu vermindern oder sie in Gegenwart von Galaktose zu erhöhen. Zum Test des Wachstumsphänotyps solcher Hefestämme wurden diese in Flüssigkulturen in SD-Laktat Medium angezogen, denen zuerst noch Galaktose (2 %) zugesetzt war. Für die letzten 24 Stunden wurden sie in dem gleichen Medium ohne Galaktose kultiviert und bei einer OD₅₇₈ von 1,0 geerntet. Die Zellen wurden isoliert und dreimal in sterilem H₂O gewaschen. Es wurde dann eine Zellsuspension mit einer OD₅₇₈ von 0,1 in sterilem H₂O hergestellt. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, indem die Zellsuspension jeweils 1:10 weiterverdünnt wurde. Von diesen Verdünnungen wurden je 2 µl auf eine YPD oder YPGal-Platte aufgetragen und bei 30 °C zwei bis drei Tage inkubiert.

2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde eine modifizierte Lithiumacetat-Methode (Gietz Nucleic Acid Res 1992) angewendet. Dabei wurden 25 µl einer Hefekolonie von einer entsprechenden Agarplatte mit einem sterilen Spatel in 1 ml H₂O überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6 000 rpm, 15 sec, Tischzentrifuge) sedimentiert, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und für 5 min bei 30 °C inkubiert. 500 µl der Suspension wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch eine weitere Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde mit 240 µl Transformationspuffer (50 % PEG-3350, 36 µl 1M Lithiumacetat, 10 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), 64 µl H₂O) und 5 µl Plasmid-DNA (0,1 – 5 µg) versetzt und gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 20 min bei 42 °C inkubiert und die Zellen anschließend sedimentiert (6 000 rpm, 15 sec, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde durch vorsichtiges Pipettieren in 200 µl sterilem H₂O aufgenommen und auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Daum (Daum J Biol Chem 1982). Dazu wurden Hefezellen in Flüssigkultur (2.2.2) zu einer OD₅₇₈ von 1,0 bis 1,5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 000 rpm, 5 min, SLA 3000-Rotor, Sorvall, RT) isoliert und das Pellet mit H₂O gewaschen. Das Feuchtgewicht wurde bestimmt und die Zellen wurden in DTT-Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM DTT) in einer Konzentration von 0,5 g/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, reisoliert und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Für den enzymatischen Aufschluß der Zellwände (Bildung von Sphäroplasten) wurden die Zellen in Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH 7.5, 6 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht) in einer Konzentration von 0,15 g/ml aufgenommen und unter Schütteln 30 bis 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Sphäroplastenbildung konnte durch osmotische Lyse getestet werden. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 1 ml H₂O oder 1,2 M Sorbitol gemischt. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD₅₇₈ der Suspension in H₂O 10 – 20 % der Suspension in Sorbitol betrug. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (2 500 rpm, 5 min, SLA 3000-Rotor, Sorvall, 4 °C) reisoliert und in kaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0,2 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF) in einer Konzentration von 0,15 g/ml resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit dem Dounce-Homogenisator (2 x 10 Stöße, 1 Verdünnungsschritt). Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (2500 rpm, 5 min, SLA 3000-Rotor, Sorvall, 4 °C) abgetrennt. Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation (12 000 rpm, 12 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) sedimentiert, mit 10 ml HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7.5) gewaschen, nochmals von ganzen Zellen und Zelltrümmern gereinigt (4000 rpm, 5 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) und erneut isoliert (12 000 rpm, 12 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C). Die Mitochondrien wurden in HS-Puffer aufgenommen und die Proteinkonzentration wurde bestimmt (2.4.1.1). Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe

Die Isolierung von Mitochondrien aus tierischem Gewebe (z.B. Mausleber) erfolgte durch differentielle Zentrifugation. Frisch entnommenes Gewebe wurde gewogen und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in einem Volumen von 10 ml/g M1-Puffer

(250 mM Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA) in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill (7x, 600 rpm) zerkleinert. Die Zellen in diesem Homogenat wurden mit einem Dounce-Homogenisator (2 Stöße, weite Reibkammer, 1 Stoß, schmale Reibkammer) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch dreimalige Zentrifugation (2 500 rpm, 10 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) von Zelltrümmern und Zellkernen befreit. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch eine weitere Zentrifugation (7 000 rpm, 10 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) pelletiert. Die so erhaltenen Mitochondrien konnten direkt für *in vitro*-Importexperimente eingesetzt werden. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurden diese Rohmitochondrien über einen Sucrose-Stufengradienten (2.3.4) weiter angereichert.

2.3.3 Isolierung von Mitochondrien aus kultivierten Zellen

Die Isolation von Mitochondrien aus menschlichen Zellen erfolgte nach einer Methode von Rossmannith (Rossmannith J Biol Chem 1995). Ein Zellpellet von 5×10^9 Zellen in 20 ml PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7.5) wurde aufgetaut und die Zellen mit PBS gewaschen, so dass alle Reste des Kulturmediums entfernt wurden. Die Zellen wurden zentrifugiert (2 500 rpm, 12 min Hettich, 4 °C) und zum Quellen in 180 ml RSB-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 1,5 mM CaCl_2) 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (2 500 rpm, 12 min Hettich, 4 °C), in 20 ml RSB aufgenommen und in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill (4x, 300 rpm) homogenisiert. Anschließend wurden die Zellen noch in einem Dounce-Homogenisator (1 Stoß, schmale Reibkammer) aufgeschlossen. Es wurden weitere 80 ml RSB und 100 ml MS-Puffer (420 mM Mannitol, 140 mM Sucrose, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA) zugegeben. Durch dreimaliges Zentrifugieren des Homogenats (2 500 rpm, 10 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) wurden Zelltrümmer und Zellkerne sedimentiert. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch eine weitere Zentrifugation (11 000 rpm, 30 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) pelletiert. Die so erhaltenen Mitochondrien wurden über einen Sucrose-Stufengradienten (2.3.4) weiter angereichert. Aus dem postmitochondrialen Überstand wurden durch eine Ultrazentrifugation (49 000 rpm, 30 min, Beckman TLA 100-Rotor, 4 °C) Zytoplasma (Überstand) und Mikrosomen (Pellet) gewonnen.

2.3.4 Sucrose-Stufengradient zur Anreicherung von Mitochondrien

Die durch differentielle Zentrifugation erhaltenen Mitochondrien wurden in einem kleinen Volumen M1-Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA) resuspendiert und auf einen 2-Stufen-Sucrosegradienten in einem Ultrazentrifugations-Gefäß geschichtet.

Der 2-Stufen-Gradient setzte sich zusammen aus 3,5 ml USL (1,5 M Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, unten) und 5 ml OSL (1 M Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, oben). Nach der Ultrazentrifugation (20 000 rpm, 25 min, SW 41-Rotor, L8-M Beckmann, 4 °C) sammelten sich intakte Mitochondrien an der Interphase zwischen OSL und USL, nicht intakte Mitochondrien schwammen am oberen Rand. Die Mitochondrien aus der Interphase wurden abgenommen und mit dem gleichen Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) versetzt. Sie wurden durch Zentrifugation (11 000 rpm, 10 min, Tischzentrifuge, 4 °C) weiter konzentriert und in Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.3.5 Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran

Die Öffnung der mitochondrialen Außenmembran (Generierung von Mitoplasten) erfolgt an Hefemitochondrien durch hypotones Schwellen, indem die Mitochondrien 1:10 in 20 mM HEPES/KOH pH 7.4 verdünnt werden. Bei Säugetiermitochondrien ist es auf diese Art nicht möglich, Mitoplasten zu erzeugen. Hier werden zur selektiven Solubilisierung der Außenmembran niedrige Konzentrationen Digitonin verwendet. Die Mitochondrien werden in einer Konzentration von 1 µg/µl in Digitonin-Puffer (0,1 % (w/v) in PBS oder HEPES/KOH pH 7.4, 1 mM PMSF) 30 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten werden durch Zentrifugation isoliert (11 000 rpm, 5 min, Tischzentrifuge, 4 °C), der Überstand enthält die löslichen Proteine des Intermembranraums.

Zur vollständigen Solubilisierung wurden Mitochondrien mit höheren Konzentrationen Digitonin (0,5 % (w/v) in PBS oder HEPES/KOH pH 7.4, 1 mM PMSF) oder mit Triton X-100 (0,5 bis 1,0 % (v/v) in PBS oder HEPES/KOH pH 7.4, 1 mM PMSF) 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation (30 000 rpm, 30 min, Beckman TLA 100-Rotor, 4 °C) enthielt der Überstand das Mitochondrienextrakt.

2.3.6 *In vitro*-Proteinimport radioaktiv markierter Vorstufenproteine in isolierte Mitochondrien

Die zu untersuchenden Vorstufenproteine wurden mit ³⁵S radioaktiv markiert und *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert. Ein Standard-Importansatz umfasste 170 µl und enthielt 1 µg/µl mitochondriales Protein in Importpuffer (0,6 M Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH pH 7.4, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM EDTA, 1 mg/ml fettsäurefreies BSA). Zur Generierung eines Membranpotentials wurden weiterhin 2,5 mM ATP und 5 mM NADH zugesetzt. Sollte das Membranpotential aufgehoben werden, wurde 1 µM Valinomycin bzw. 25 µM Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)

zugegeben. Der Ansatz wurde vorinkubiert (10 min, 25 °C) und der Import durch Zugabe von 3 – 5 % Retikulozytenlysat gestartet. Die Vorstufenproteine wurden für bis zu 20 min bei 25 °C importiert. Die Importreaktion wurde durch Überführung der Proben auf Eis gestoppt. Der Ansatz wurde dreigeteilt, um die submitochondriale Lokalisation der importierten Proteine zu bestimmen.

2.3.7 Submitochondriale Lokalisierung importierter Proteine

Nach dem Import wurden Teile des Ansatzes unter isotonischen Bedingungen (HS-Puffer) oder hypotonischen Bedingungen (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, ggf. 0,1 % (w/v) Digitonin) mit Proteasen behandelt. Unter isotonischen Bedingungen bleibt die mitochondriale Außenmembran intakt und es werden Proteine abgebaut, die unspezifisch an den Mitochondrien haften oder nicht vollständig importiert wurden. Unter hypotonischen Bedingungen wird die Außenmembran durch Schwellen (bzw. selektive Solubilisierung mit Digitonin (2.3.5) geöffnet und die Protease hat Zugang zum Intermembranraum. Hierbei bleiben nur Proteine geschützt, die sich in der Matrix befinden oder die in die Innenmembran inseriert wurden. Vor dem proteolytischen Abbau geschützte Proteine oder Proteindomänen können anschließend mittels SDS-PAGE (2.4.1.3) und Autoradiographie (2.4.1.7) detektiert. Mit diesem Verfahren kann auch die Lokalisation von endogenen Proteinen bestimmt werden, die mit Westernblotting (2.4.1.6) detektiert werden.

Von einem 170 µl Importansatz wurden je 50 µl getrennt untersucht. Ein Teil wurde in HS-Puffer 1:10 verdünnt und unbehandelt gelassen, ein Teil wurde ebenso verdünnt und mit Protease (Proteinase K (PK) 50 bis 200 µg/ml oder Trypsin 50 µg/ml) behandelt und ein Teil wurde in Schwellpuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, ggf. 0,1 % (w/v) Digitonin) 1:10 verdünnt und mit gleichen Konzentrationen Protease behandelt. Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend die Proteolyse durch Zugabe von 2 mM PMSF (bei PK) oder 0,5 µg/µl STI (bei Trypsin) für 5 min auf Eis gestoppt. Die Mitochondrien oder Mitoplasten wurden durch Zentrifugation (14 000 rpm, 7 min, Tischzentrifuge, 4 °C) reisoliert, mit Puffer der Proteaseinhibitor enthielt gewaschen und 1 x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (2.4.1.3), Westernblotting (2.4.1.6) und Autoradiographie (2.4.1.7) analysiert. Als Referenz wurden 10 % des eingesetzten radioaktiv markierten Vorstufenproteins mit aufgetragen.

2.3.8 Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Proteine, die in engem räumlichen Kontakt miteinander stehen, können mit chemischen Quervernetzern kovalent verknüpft werden. In dieser Arbeit wurden die membrangängigen Quervernetzer Dithiobis-succinimidyl-propionat (DSP) und m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) verwendet. DSP ist homobifunktional und verknüpft Proteine über primäre Aminogruppen. MBS ist heterobifunktional und stellt eine Verknüpfung zwischen einer primären Aminogruppe und einer Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes her.

Nach dem Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation reisoliert (11 000 rpm, 5 min, Tischzentrifuge, 4 °C) und in HS-Puffer in einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min mit 100 bis 500 µM Quervernetzer (gelöst in DMSO) inkubiert. Zu einem Kontrollansatz wurde nur DMSO zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Glycin pH 8.0 gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und mit HS-Puffer gewaschen. Sie wurden zur Analyse mit SDS-PAGE (2.4.1.3) in 1xLämmli-Puffer aufgenommen oder solubilisiert und zur Immunfällung (2.5.4) eingesetzt.

2.3.9 Carbonatextraktion

Durch eine Carbonatextraktion werden lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen getrennt (Fujiki J Cell Biol 1982). Dazu wurden die Mitochondrien sedimentiert und in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in einer 0,1 M Na₂CO₃-Lösung pH 11.5 resuspendiert. Die Proben wurden gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Ultrazentrifugation (49 000 rpm, 30 min, Beckman TLA 100-Rotor, 4 °C) wurden die Membranen und integralen Membranproteine sedimentiert. Der Überstand enthielt die löslichen und peripher mit der Membran assoziierten Proteine und wurde mit TCA gefällt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.6) und Immundekoration (2.5.3) analysiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford Anal Biochem 1976) durchgeführt. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Die Proben wurden mit je

1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrats (Biorad) gemischt und 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.4.1.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Fällung von Proteinen aus einem größeren Volumen wurden die Proben mit 12 % (v/v) TCA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert (14 000 rpm, 40 min, Tischzentrifuge, 4 °C) und das Pellet zweimal mit kaltem Aceton (-20 °C) gewaschen. Das Pellet wurde bei 56 °C 2 min getrocknet und in 1x Lämmli-Puffer aufgenommen.

2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli Nature 1970) in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Um Gele mit unterschiedlichen Trenneigenschaften zu erhalten, wurden verschiedene Konzentrationen Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid verwendet. Bei dem verwendeten Elektrophoresesystem (Mini-Protean III, Biorad) hatte das Sammelgel die Abmessung 1 cm x 7,2 cm und das Trenngel 7 cm x 7,2 cm bei einer Dicke von 0,75 mm.

Trenngel 10 – 17,5 % (w/v) Acrylamid, 0,08 – 0,3 % (w/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,05 % (v/v) TEMED

Sammelgel 5 % (w/v) Acrylamid, 0,033 % (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl pH 6.8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % TEMED

Elektrophorese-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 8.3, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Die Proben wurden in 1x Lämmli-Puffer (60 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) gelöst und 5 bis 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern in Elektrophorese-Puffer bei konstant 25 mA pro Gel. Als Größenstandard wurden Proteinmarker (Biorad oder MBI Fermentas) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder im Gel mit Coomassie Blau gefärbt (2.4.1.5) oder auf Nitrozellulose transferiert (2.4.1.6).

2.4.1.4 Blaue Nativgelelektrophorese

Ganze Proteinkomplexe wurden in einem Blau-Nativgel aufgetrennt (Schagger and von Jagow, 1991). Dazu wurden Mitochondrien in einem geeigneten Detergenz solubilisiert. Durch Zugabe des Farbstoffs Serva Blau G-250 wird eine negative Nettoladung in die Proteinkomplexe eingeführt, die eine Auftrennung im elektrischen Feld erlaubt. Das Sammelgel hatte die Abmessung 14,8 cm x 12,5 cm und das Trenngel 14,8 cm x 2 cm bei einer Dicke von 1,5 mm.

Trenngel	linearer Gradient von 6-13 % (w/v) Acrylamid, 0,36-0,8 % (w/v) Bisacrylamid, und 0-16 % (v/v) Glycerin, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl, pH 7.0, 0,04 % (w/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED
Sammelgel	3,8 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris, pH 7.0, 0,08 % (w/v) APS, 0,08 % (v/v) TEMED
Bodengels	20 % (w/v) Acrylamid, 0,13 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl, pH 7.0, 0,05 % (w/v) APS, 0,025 % (v/v) TEMED

Zur Solubilisierung wurden Mitochondrien in Digitonin (1,0 % (w/v) in PBS pH 7.4, 1 mM PMSF) 30 min auf Eis inkubiert. Nicht solubilisiertes Material wurde durch Ultrazentrifugation (30 000 rpm, 30 min, Beckman TLA 100-Rotor, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde im Verhältnis 10:1 mit Probenpuffer (5 % (w/v) Serva Blau G-250, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 100 mM Bistris/HCl, pH 7.1) versetzt und auf das Nativgel aufgetragen. Der Kathodenpuffer A bestand aus 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, 0,02 % (w/v) Serva Blau XG (pH 7.0). Der Kathodenpuffer B hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings ohne Farbstoff. 50 mM Bistris/HCl (pH 7.0) diente als Anodenpuffer. Die Elektrophorese wurde zuerst bei 100 V gestartet und nach dem Einlaufen der Proben in das Gel bei 500 V fortgesetzt. Die Stromstärke war auf 15 mA limitiert. Sobald die blaue Lauffront des Kathodenpuffers A ca. ein Drittel weit in das Gel eingelaufen war, wurde ein Pufferwechsel von Kathodenpuffer A zu Kathodenpuffer B vorgenommen, während der Anodenpuffer nicht ausgetauscht wurde. Danach wurde die Elektrophorese bei 500 V fortgesetzt. Die Stromstärke war auf 15 mA limitiert. Sobald die blaue Lauffront des Kathodenpuffers A ca. ein Drittel weit in das Gel eingelaufen war, wurde ein Pufferwechsel von Kathodenpuffer A zu Kathodenpuffer B vorgenommen, während der Anodenpuffer nicht ausgetauscht wurde. Danach wurde die Elektrophorese bei 500 V fortgesetzt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die

Proteine auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Folgende Markerproteine dienten als Längenstandard: Rinderthroglobulin (669 kDa) Apoferritin aus Pferdemicke (443 kDa), α -Amylase aus Süßkartoffel (200 kDa) und Alkoholdehydrogenase aus Hefe (150 kDa).

2.4.1.5 Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blau

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Färbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250) bei RT für ein bis zwei Stunden geschüttelt. Um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen und die Proteinbanden sichtbar zu machen wurde das Gel in Entfärbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v)) geschüttelt. Die Entfärbelösung wurde gegebenenfalls erneuert.

2.4.1.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese nach der "Semi dry"-Methode (Towbin PNAS 1979; Kyhse-Anderson J Biochem Biophys Meth 1984) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulose-Membran zwischen mehreren in Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,08 % SDS) getränkte Whatman-3MM Filterpapiere gelegt und zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet. Der Transfer erfolgte für 40 min bis 1,5 h bei 1 mA/cm². Anschließend wurden die Proteine auf der Membran durch Anfärben mit Ponceau S Reagenz sichtbar gemacht und durch Immundekoration (2.5.3) detektiert.

2.4.1.7 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran getrocknet und ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR) wurde für eine entsprechende Zeit aufgelegt. Die Filme wurden entwickelt (Curix 60, Agfa-Gevaert) und die Intensitäten der sichtbaren Banden mit einem Auswertungsprogramm bestimmt (AIDA, Raytest). Alternativ wurden die Signalintensitäten direkt durch einen Phosphorimaging-System (FLA 2000, Fuji) bestimmt.

2.4.2 Präparation von Proteinen

2.4.2.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die hier verwendeten rekombinanten Proteine waren an ein Hexahistidin-Peptid (His₆), an das Maltosebindungsprotein (MBP) oder an Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Sie

wurden von verschiedenen Vektoren (pQE40, pMal oder pQE13) unter der Kontrolle des lac-Promotors in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde das entsprechende Plasmid in den *E. coli* XL1-Blue Stamm transformiert (2.1.4). Jeweils ein positiver Klon wurde über Nacht in 5 ml LB_{Amp} Medium bei 37 °C kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB_{Amp} Medium auf eine OD₅₇₈ von 0,05 bis 0,1 angeimpft. und bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Expression wurde bei 30 °C für 2 - 4 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 000 rpm, 15 min, SLA 3000-Rotor) geerntet. Die Zellpellets konnten bei -80 °C gelagert werden. Für Zinkbindungsexperimente erfolgte die Expression in der Gegenwart von 0,5 – 1 mM Zinkacetat.

2.4.2.2 Reinigung von Proteinen über Ni-NTA-Agarose

Die Fusion eines Proteins an ein N-terminales Hexahistidin-Peptid erfolgt durch Klonierung der entsprechenden Sequenz in einen pQE40 Vektor und Expression des Fusionsproteins in *E. coli*. Die sechs Histidinreste binden bei der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) an immobilisierte Nickel-Ionen, die von den Nitrilotriacetat-Gruppen des Harzes komplexiert werden. Die Elution erfolgt mit Imidazol, das anstelle von Histidin an die Nickel-Ionen bindet und so das Fusionsprotein verdrängt.

Die mit IPTG induzierten Zellen wurden aufgetaut und in Lysepuffer (1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 10 mM Imidazol) aufgenommen. Durch Zugabe von Lysozym (100 µg/ml) und Inkubation für 1 h auf Eis wurde die Zellwand aufgelöst. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Beschallen mit einer Makrospitze (3 x 30 sec Pulse, Branson Sonifier, Stufe 4, 80 % Leistung) auf Eis weiter aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (13 000 rpm, 20 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) abgetrennt. Eine Ni-NTA-Säule (Gelbettvolumen 1 ml) wurde mit fünf Säulenvolumina Lysepuffer äquilibriert. Das lösliche Zellextrakt aus dem Überstand wurde auf die Säule geladen, mit 20 Säulenvolumina Waschpuffer (1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 20 mM Imidazol) gewaschen und mit Elutionspuffer (1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 300 mM Imidazol) in 1 ml Fraktionen eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.4.1.3) und Coomassie-Färbung (2.4.1.5) analysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (2.4.1.1) bestimmt.

2.4.2.3 Reinigung von Proteinen über Amyloseharz

Die Fusion eines Proteins an ein N-terminales Maltosebindungsprotein (MBP) erfolgt durch Klonierung der entsprechenden Sequenz in einen pMal Vektor und Expression des Fusionsproteins in *E. coli*. Die Vorteile dieser Methode liegen darin dass MBP-Fusionsproteine zumeist löslich sind, in großen Mengen exprimiert werden und sich ohne wesentliche Verunreinigungen aufreinigen lassen. Das Maltosebindungsprotein bindet bei der Aufreinigung an die Maltose-Einheiten des Amyloseharzes (New England Biolabs). Die Elution erfolgt mit Maltose, die das Fusionsprotein von dem Harz verdrängt.

Die mit IPTG induzierten Zellen wurden aufgetaut und in Lysepuffer (1x PBS pH 7.4, 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM Zinkacetat) aufgenommen, mit Lysozym (100 μ g/ml) versetzt für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mehrmals beschallt (3 x 30 sec Pulse, Branson Sonifier, Stufe 4, 80 % Leistung). Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation (13 000 rpm, 20 min, SS 34-Rotor, Sorvall, 4 °C) wurde der Überstand auf eine Amylosesäule (Gelbettvolumen 4 ml) geladen, die mit Säulenpuffer (1x PBS pH 7.4, 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) äquilibriert war. Die Säule wurde mit 5 –15 Säulenvolumina Säulenpuffer gewaschen. Das Protein wurde mit Elutionspuffer (1x PBS pH 7.4, 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 mM Maltose) in 1 ml Fraktionen eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (2.4.1.3) und Coomassie-Färbung (2.4.1.5) analysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (2.4.1.1) bestimmt.

Bei der Bestimmung des Zinkgehaltes von MBP-Fusionsproteinen wurden Vergleichsproben mit N-ethylmaleimid (NEM) vorbehandelt. Dazu wurde das lösliche Zellextrakt vor dem Laden auf die Säule mit 40 mM NEM versetzt und 1 h bei 4 °C inkubiert.

2.4.2.4 Bestimmung des Zinkgehaltes rekombinanter Proteine

Der Zinkgehalt von MBP-Fusionsproteinen, die über Amyloseharz gereinigt waren, wurde durch Optische Emissionsspektroskopie mit Anregung durch ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP) bestimmt. Die Messung erfolgte bei der zinkspezifischen Wellenlänge von 213,857 nm (Varian-Vista Simultan Spektrometer).

Gereinigte MBP-Fusionsproteine mit bekannter Proteinkonzentration ($\geq 300 \mu$ g/ml) in Elutionspuffer wurden direkt zur Messung eingesetzt. Zur Bestimmung des Hintergrundes von Zink Ionen im Puffer wurden die Fraktionen, die vor und nach der Elution des Proteins von der Säule gesammelt wurden, mit analysiert.

2.4.2.5 *In vitro* Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Mitochondriale Vorstufenproteine wurden *in vitro* in einer gekoppelten Transkriptions-/Translations-Reaktion synthetisiert und dabei radioaktiv markiert. Dazu wurde die entsprechende Sequenz in einen pGEM4-Vektor kloniert, in dem sie unter der Kontrolle des SP6 Promotors transkribiert wird. Die Translation erfolgte im gleichen Ansatz in Kaninchen-Retikulozytenlysat (TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) in Gegenwart von ^{35}S -Methionin (Pelham Eur J Biochem 1976). Ein Standardansatz von 50 μl enthielt 2 μg Plasmid-DNA, 2 μl TNT-Puffer, 1 μl Aminosäuremix ohne Methionin, 1 μl RNasin, 25 μl TNT-Kaninchen Retikulozytenlysat, 2 μl ^{35}S -Methionin (ICN) und 1 μl SP6 RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert, anschließend wurde der Einbau des radioaktiven Methionins durch Zugabe von 20 mM Methionin gestoppt. Zur Abtrennung aggregierter Proteine wurde das Lysat zentrifugiert (30 000 rpm, 20 min, Beckman TLA 100-Rotor, 4 °C). Das Lysat wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Gelfiltration

Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte von Proteinen und Proteinkomplexen erfolgte durch Analyse von Mitochondrienextrakten in einer Gelfiltration. Dazu wurden isolierte Mitochondrien in Digitoninpuffer (0,5 % (w/v) Digitonin, 1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF) oder in Tritonpuffer (0,5 – 1 % (v/v) Triton X-100, 1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF) solubilisiert (2.3.5). Eine Superose12-Gelfiltrationssäule (Amersham) wurde mit drei Säulenvolumina Laufpuffer (0,05 % (w/v) Digitonin oder 0,05 % (v/v) Triton in PBS pH 7.4) äquilibriert und das lösliche Mitochondrienextrakt auf die Säule geladen. Die Chromatographie erfolgte in einer gekühlten FPLC-Anlage (Amersham) bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt, die mit TCA gefällt (2.4.1.2) und mittels SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.6) und Immundekoration (2.5.3) analysiert wurden. Das Molekulargewicht wurde anhand einer Eichkurve mit Markerproteinen bestimmt: Rinderthyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin aus Pferdemilz (443 kDa), b-Amylase aus Süßkartoffel (200 kDa), Alkoholdehydrogenase aus Hefe (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase aus Rindererythrozyten (29 kDa), Cytochrom c aus Pferdeherz (12 kDa).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Spezifische Antiseren wurden entweder gegen synthetische Oligopeptide oder rekombinante Proteine generiert. Um Oligopeptide als Antigene einzusetzen wurden diese an ein Trägerprotein gekoppelt. Dazu wurde bei der Synthese (Neosystem) ein zusätzliches Cystein angefügt, das die Kopplung an aktiviertes Trägerprotein (Keyhole-limpet-Hämocyanin, KLH oder Ovalbumin, OVA: Inject Maleimide Activated KLH/OVA-Kit, Pierce) erlaubt. Zur Kopplung wurden 2 mg des Peptids in 200 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 gelöst. 2 mg Maleimid-aktiviertes KLH oder Ovalbumin wurden in 200 µl H₂O aufgenommen, sofort mit der Peptidlösung vermischt und 2 h bei RT inkubiert. Das Konjugat wurde durch eine PD-10 Säule in einen anderen Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2) überführt. Es wurden Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.1.1) und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Rekombinante Proteine wurden gereinigt und in Aliquots zu 75 µg bei -20 °C gelagert.

Zur Immunisierung der Kaninchen wurde jeweils ein Aliquot der Antigenlösung mit dem gleichen Volumen Immunstimulans (Titermax, CytRX zur Erstinjektion; inkomplettes Freundesches Adjuvans, Behringwerke für alle folgenden Injektionen) vermischt und dem Kaninchen subkutan im Rückenbereich injiziert. Weitere Injektionen erfolgten in einem Abstand von mindestens 4 Wochen. Zwölf Tage nach jeder Folgeinjektion wurden dem Kaninchen 20 bis 30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde zur vollständigen Gerinnung einige Stunden bei 8 °C gelagert. Das Serum wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (4 000 rpm, 10 min, Hettich) gewonnen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die in dieser Arbeit zur Gewinnung von spezifischen Antiseren verwendeten Peptide entsprachen in ihrer Sequenz den C-Termini der menschlichen Tim Proteine.

Antikörper	Peptidsequenz
Tim9 – C	CLAAKAGLLGQPR
Tim10a – C	CLMKRVQQSSGPA
Tim10b – C	CAAEPGVSPSGS
DDP1 – C	CKSKPVFSESLSD
DDP2 – C	CSRFAQIVQKGGQ
Tim13 – C	CYNSRLQRERANM

Ein spezifisches Antiserum gegen Tim22 wurde durch Injektion eines MBP-Fusionsproteins mit den Aminosäuren 24 – 166 des Tim22 (MBP-Tim22²⁴⁻¹⁶⁶) gewonnen.

Ein weiterer Antikörper gegen Tim22 wurde gegen das Peptid CFDPKDPYRTPTAKE gewonnen (Pineda).

2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Reinigung eines Antikörpers aus dem Serum wurde eine Affinitätssäule hergestellt, an die das jeweilige Antigen gekoppelt war. Peptide wurden dazu an Iodoacetyl-aktiviertes SulfoLink Gel (Pierce) gekoppelt, Proteine an CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham).

Die Kopplung von Peptiden an SulfoLink Gel erfolgte über die freien Sulfhydrylgruppen der endständigen Cysteine. Dazu wurden bei Raumtemperatur 2 ml SulfoLink-Gel in einer Säule mit 6 Säulenvolumen Kopplungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.5, 5 mM EDTA) äquilibriert. 2 mg des Peptids wurden in 2 ml Kopplungspuffer gelöst, zu dem Gel gegeben und 15 min unter leichter Bewegung inkubiert. Die Säule wurde 30 min stehen gelassen und mit 3 Säulenvolumen Kopplungspuffer gewaschen. Um alle noch freien Iodoacetylgruppen zu blockieren, wurde ein Säulenvolumen 50 mM Cystein in Kopplungspuffer zugegeben und weitere 15 min unter leichter Bewegung inkubiert. Die Säule wurde 30 min stehen gelassen, mit 16 Säulenvolumen 1M NaCl, dann mit 16 Säulenvolumen 0,05 % NaN₃ gewaschen und darin bei 4 °C gelagert.

Die Kopplung von rekombinanten Proteinen an CNBr-Sepharose erfolgte über freie Aminogruppen. Dazu wurde rekombinantes Protein gereinigt und durch eine PD-10 Säule in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8.3) überführt. 0,4 g CNBr-Sepharose wurden in 4 ml 1mM HCl resuspendiert, in eine Säule gefüllt und mit 120 ml 1 mM HCl äquilibriert. Die Protein enthaltenden Eluate der PD-10 Säule wurden vereinigt, auf die Säule gegeben und 1,5 h bei RT unter leichter Bewegung inkubiert. Die Säule wurde mit 15 ml Kopplungspuffer gewaschen. Die Kopplung wurde durch eine Inkubation unter leichter Bewegung mit 20 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8.0 für 2 h beendet. Die Säule wurde in drei Zyklen mit alternierendem pH-Wert gewaschen (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4.0 und dann 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 8.0, je 15 ml), mit 25 ml 10 mM Tris/HCl pH 7.5 äquilibriert und unter Zusatz von 0,02 % NaN₃ bei 4 °C gelagert.

Zur Affinitätsreinigung des Antikörpers wurde die mit Antigen gekoppelte Säule mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM Glycin pH 2.5; 10 mM Tris/HCl pH 8.8; 100 mM Natriumphosphat pH 11.5 und 10 mM Tris/HCl pH 7.5 gewaschen. Ein Aliquot des Serums (4 ml) wurde mit 10 ml 10 mM Tris /HCl pH 7.5 gemischt und mit 1 mM PMSF versetzt. Das

Serum wurde mit einer peristaltischen Pumpe 1,5 h kontinuierlich auf die Säule geladen. Die Säule wurde mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 20 ml 500 mM NaCl und 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7.5 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Glycin pH 2.5 und 100 mM Citrat pH 4.0. Es wurden jeweils 10 Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die Elutionen wurden sofort mit 1M Tris neutralisiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Säule wurde mit 10 ml 10 mM Tris/HCl gewaschen und unter Zugabe von 0,02 % NaN₃ gelagert.

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Zum Immunologischen Nachweis wurden Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.1.3) und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (2.4.1.6). Alle folgenden Inkubationen der Membran wurden durch Schütteln oder Rollen bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden zunächst durch Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in Tween-TBS (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) für 30 min abgesättigt. Die Immundekoration einzelner Proteine erfolgte mit spezifischen Antiseren oder gereinigten Antikörpern (2.5.2) je nach Titer in Verdünnungen von 1:50 bis 1:2000 in Magermilch/Tween-TBS für mindestens eine Stunde, in den meisten Fällen über Nacht. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit Tween-TBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation für 1 h mit einem zweiten Antikörper, der entweder aus Ziege gegen Kaninchen-Immunglobulin G gerichtet oder aus Kaninchen gegen Maus-Immunglobulin G gerichtet war und an den Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (Dako). Dieser Antikörper wurde 1:1000 bis 1:5000 in Magermilch/Tween-TBS verdünnt. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit Tween-TBS gewaschen. Die gebundene Peroxidase wurde mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm Super RX) nachgewiesen.

2.5.4 Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation einzelner Proteine aus einem Proteingemisch oder Koimmunopräzipitation in einem Komplex gebundener Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden gereinigte Antikörper oder Antiseren an Protein A-Sepharose (PAS, Amersham) gekoppelt, die eine hohe Affinität für Immunglobuline der Klasse G besitzt und sich leicht durch kurze Zentrifugation sedimentieren lässt. Dazu wurden 25 µl PAS in IP-Puffer (1x PBS pH 7.4, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF) äquilibriert. Zu der PAS wurden 50 – 100 µl affinitätsgereinigter Antikörper oder 5 – 20 µl Antiserum in einem Gesamtvolumen von 500

µl IP-Puffer gegeben und für 3 h bei 4 °C unter leichter Bewegung inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit Solubilisierungspuffer (0,5 % (w/v) Digitonin oder 0,5 – 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7.4, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF) abgetrennt.

Mitochondrien wurden solubilisiert (2.3.5) und das lösliche Extrakt mit den an PAS gekoppelten Antikörpern für 3 – 16 h unter leichter Bewegung bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 500 µl IP-Puffer inkubiert. Die PAS wurde sedimentiert und die Proteine aus dem Überstand mit TCA gefällt (2.4.1.2). Nach dreimaligem Waschen in IP-Puffer wurden an die PAS gebundene Proteine durch Inkubation in 20 µl 2x Lämmli-Puffer bei 95 °C für 5 min eluiert. Die gebundenen und nicht gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.4.1.3), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.1.6) und Immundekoration (2.5.3) analysiert.

2.6 Chemikalien und Geräte

2.6.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Amersham-Pharmacia, Freiburg: ECL Reagenz für Western Blots, Protein A-Sepharose

BioRad, München: Proteinreagenz für die Konzentrationsbestimmung ('Proteinassay')

Biozym, Hess. Oldendorf: Agarose

Behringwerke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans

CytRX, Norcross, USA: Immunstimulanz 'Titer Max'

Dako, Hamburg: HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus IgG

DIFCO, Detroit, USA: Hefeextrakt, Pepton

Fermentas, St. Leon-Rot: Taq-Polymerase, Molekulargewichtsstandard für SDS-Gele

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat XR

Macherey-Nagel, Düren: Filterpapier, Gelextraktionskit

Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide

New England Biolabs, Schwalbach: Amyloseharz, pMal-cRI-Vektor, Restriktionsenzyme

Pierce, Rochester, USA: DSP, MBS

Promega, Heidelberg: T4-DNA-Ligase, pGEM-Vektoren, Retikulozytenlysat TNT-SP6

Qiagen, Hilden: Mini-, Midiprep-Kit zur Plasmidpräparation, Ni-NTA-Agarose, Penta-His-Antikörper, pQE-Vektoren

Roth, Karlsruhe: Puffersubstanzen

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

Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Serva Blau, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, TEMED
Sigma, München: Ammoniumperoxodisulfat (APS), Aminosäuren, BSA (fettsäurefrei), Cytochrom c, Glycerin, β -Mercaptoethanol, Oligomycin, Oligonukleotide, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A, Proteinase K, DTT, RNase A
Peqlab, Erlangen: Nukleotide
Töpfer, Dietmannsried: Magermilchpulver
USBiological, Swampscott, USA: Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren

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

2.6.2 Geräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Curix 60
Amersham, Freiburg: Peristaltische Pumpe P-1, FPLC-System mit Pumpe, Ventil, Gradientenmischer Fraktionskollektor FRAC-200, Gelfiltrationssäule Superose12, Spannungsgeräte
Applied Biosystems, Darmstadt: Abi Prism 310 Genetic Analyzer, Gene Amp PCR System 9700
Bachofer, Reutlingen: Tischzentrifugen, Magnetprüher
Beckman Instruments, München: Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischzentrifuge Optima TL, einschließlich Rotoren und Zentrifugenröhrchen
BioRad, München: Mini-Protean III, Semi-Dry Blotkammer
Branson, Heusenstamm: Ultraschallgerät Sonifier S75
Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifuge (kühlbar), Reaktionsgefäße, Thermomixer
Fuji, Düsseldorf: Phosphoimaging System FLA-2000
Heraeus, Osterode: Brutschränke, Inkubatoren
Hettich, München: Zentrifuge Rotixa KS
Janke&Kunkel, Staufen: Vortex-Mixer
Memmert, Schwalbach: Sterilisationsschrank S40
Mettler Toledo, Giessen: Laborwaagen
Perkin Elmer, Überlingen: Gene Amp PCR System 9600
Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-160A

Sigma, München: Elektrophoresekammern für Agarosegele

Kendro, Langenselbold: Zentrifugen Sorvall RC5B-Plus und Rotoren

Unitron, Zürich, Schweiz: Schüttelinkubatoren

Varian, Palo Alto, USA: Varian-Vista ICP OES Simultan-Spektrometer

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung humaner Komponenten der TIM22-Translokase

Die TIM22-Translokase der Hefe besteht aus den membranintegralen Komponenten Tim22, Tim54 und Tim18 sowie den Intermembranraumchaperonen Tim12, Tim9, Tim10, Tim8 und Tim13. Mittels Datenbankanalyse wurden die humanen Homologe dieser Hefepoteine auf cDNA-Ebene identifiziert. Dazu wurden humane EST ('expressed sequene tag') Datenbanken auf der Grundlage der entsprechenden ORF-Sequenzen ('open reading frame') der Hefe durchsucht.

Die Homologiesuche in humanen Datenbanken ergab mehr als 50 ESTs mit Ähnlichkeit zu Tim22 aus Hefe, die es erlaubten, eine vollständige cDNA von 1669 bp Länge zu assemblieren. Diese cDNA kodiert für ein Protein mit 194 Aminosäuren. Die entsprechenden homologen cDNAs aus Maus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) konnten auf gleiche Weise identifiziert werden (Tab. 1).

Name	Spezies	cDNA	ORF	Accession Nummer
hTim22	Homo sapiens	1669 bp	585	AF155330
mTim22	Mus musculus	1062 bp	585	AF223950
rTim22	Rattus norvegicus	1019 bp	573	AF223951

Tab. 1 Tim22 cDNA-Sequenzen aus Mensch, Maus und Ratte. Die cDNA-Sequenzen wurden durch Suche in EST-Datenbanken identifiziert. Die aus den Datenbanken der Ratte assemblierten ESTs ergaben eine cDNA, die im 5'-Bereich unvollständig ist.

Die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz des menschlichen Tim22 ist zu 26 % ähnlich zu dem Tim22-Protein aus Hefe und zu 95 % und 97 % zu den Tim22-Proteinen aus Ratte und Maus (Abb. 3). Die Konservierung ist besonders im Bereich der vier vorhergesagten

Ähnlichkeit zu Tim10 ist aber deutlich geringer als die des Tim10a zu Tim10. Keines der drei Proteine konnte als direktes Homolog zu Tim12 identifiziert werden (Tab. 2).

Ein Tim13-Homolog wird von einem bereits als *ppv1* beschriebenen Gen kodiert, das im 3'-UTR des humanen Lamin B Gens lokalisiert ist (Biamonti et al., 1992). Dieses Gen wurde anhand seiner Sequenzhomologie der Familie der kleinen Tim-Proteine zugeordnet und in Tim13 umbenannt. DDP1 und DDP2 wurden bereits früher als zwei homologe Sequenzen zu Tim8 aus Hefe beschrieben (Jin et al., 1996; Koehler et al., 1999) (Tab. 2).

Humane Sequenz	Hefe Homolog	Transkriptgröße	Proteingröße	Chromosomale Lokalisation	Accession-Nummer	Literaturverweis
Tim8a/DDP1	Tim8	1169 bp	97 aa	Xq22.1	U66035	(Jin et al., 1999)
Tim8b/DDP2	Tim8	823 bp	83 aa	11q22.1q22.2	AF150087	(Bauer et al., 1999c)
Tim9	Tim9	1027 bp	89 aa	14q21	AF150100	(Bauer et al., 1999c)
Tim10a	Tim10 (Tim12)	658 bp	90 aa	11p11-p12	AF150089	(Bauer et al., 1999c)
Tim10b	Tim10 (Tim12)	1469 bp	103 aa	11p15.3-p15.5	AF150105	(Bauer et al., 1999c)
Tim13	Tim13	763 bp	95 aa	19p13.1- 19p13.3	AF144700	(Bauer et al., 1999c)
Pseudo-DDP1	-	1067 bp	-	2q22-q23	U66034	(Jin et al., 1999)
Pseudo-DDP2	-	-	-	Xq27.2	AC002407	(Chen et al., 1997)

Tab. 2 Übersicht über die humanen Mitglieder der Familie der kleinen Tim-Proteine

Die Suche in weiteren EST und genomischen Datenbanken verschiedener Eukaryonten ermöglichte die Identifizierung 44 weiterer ORFs mit Ähnlichkeit zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe (Abb. 4). Dies legt nahe, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie in allen eukaryontischen Organismen exprimiert werden. Sie alle haben ein konserviertes Cys₄-Motiv mit der Konsensus-Abfolge CX₃C-X₁₄₋₁₇-CX₃C. Da in dieser Domäne die Proteine am stärksten konserviert sind, erfolgte ihre Einteilung in verschiedene Gruppen nach einem Sequenzvergleich innerhalb dieses Motivs und angrenzender Bereiche.

Name	Organismus	Motiv	Aa	Accession
Tim9	<i>H.sapiens</i>	LGTYNKLTETCFDLCVKD__FTTREVKPEETTCSHCLQKYLKMTQRISMRFQE	89	AF150100
Tim9	<i>M.musculus</i>	LGTYNKLTETCFDLCVKD__FTTREVKPEEVTCSHCLQKYLKMTQRISVRFQE	89	AF150101
Tim9	<i>Da.rerio</i>	LGTYNKLTENCFMDCVKD__FTTREVKPEETTCSSECLQKYLKMTQRISMRFQE	84	AF150107
Tim9	<i>C.elegans</i>	LTVYNTLSERCFNACARD__YTTSTLTKDEGSCVSCQIDKQMLVNRFRMLVFAE	111	AF150109
Tim9	<i>S.cerevisiae</i>	MRLYSNLVERCFDTCVND__FTTSKLTNKEQTCIMKCSKFLKHSERVGQRFQE	87	AF093244
Tim9	<i>A.nidulans</i>	MTMYSKLVQRCFDDCVND__FTTKSLISREEGCVMRCVDFKMGKSQRLENERFQE	90	AF150110
Tim9	<i>D.melanogaster</i>	FTLYNKVTELCSFRCVND__LSQRDLGGHEDLCVDRCVTKFARFNQNMKVYVD	117	AF150104
Tim9	<i>Ar.thaliana</i>	LRMYNSLVERCFXDCFDS__FXRXXQKQEECTVMRCAEKFLKHTMRVGNRFSE	93	AF150111
Tim9	<i>Me.crystallinum</i>	LRMYNNLVERCFDTCVDS__FRRKTLDKQEECTVKRCAEKFLKHSMRVGLRFAE	93	AF150112
Tim9	<i>O.sativa</i>	LRMYNSLVERCFDTCVDT__FRRKTLDKQEEESCVRCAEKFLKHSMRVGMRFAE	93	AF150113
Tim10a	<i>H.sapiens</i>	ADMYNRMTSACHRKCVPV_HYKEAELSKGESVCLDRCVSKYLDIHERMGKKLTE	90	AF150089
Tim10a	<i>M.musculus</i>	ADMYNRMTSACHRKCVPV_HYKEAELSKGESVCLDRCVSKYLDIHERMGKKLTE	90	AF150090
Tim10a	<i>R.norvegicus</i>	ADMYNRMTSACHRKCVPV_HYKEAELSKGESVCLDRCVSKYLDIHERMGKRLTE	90	AF150091
Tim10b	<i>H.sapiens</i>	LLVYNRMTELCFQRCVPS_LHHRALDAEEEAELHSCAGKLIHSNHRMLMAAYVQ	103	AF150105
Tim10b	<i>M.musculus</i>	LLVYNRMTELCFQRCVPS_LHHRALDAEEEAELHSCAGKLIHSNHRMLMAAYVH	100	AF150103
Tim10b	<i>R.norvegicus</i>	LLVYNRMTELCFQRCVPS_LHHRALDAEEEAELHSCAGKLIHSNHRMLMAAYVH	100	AF150106
Tim10a	<i>C.elegans</i>	SDMYRRMTNSCQAKCIAT_AFRESELTKGEAVCLDRCAKYLDVHEKLGKRLTS	86	AF150094
Tim10b	<i>C.elegans</i>	LTQYNLVAEQCFCNSCVNE__FGSRTVSGKEESCANNCLDKFLKMTQRVSQRFQE	90	AF150109
Tim10	<i>Ci.intestinalis</i>	ADMYNRMTSSCHKKCIIST_RYDGTDLKEGEAVCIDRCVAKYLDIHEQIGKKLTE	115	AF150095
Tim10	<i>D.melanogaster</i>	SDLYNRMTNACHKKCIPP_RYSESELGKEMVCLDRCAKYLDIHEKIGKKLTA	92	AF150092
Tim10	<i>Bo.mori</i>	SDMYNRLVSACHRKCIPV_KYHEPELGGESVCLDRCAVQYLDVHERIG.	70	AF150098
Tim10	<i>S.cerevisiae</i>	TDMPNKLNVNCKYKCIINT_SYSEGELNKNESVCLDRCAKYFETNVQVGENMQK	93	U10555
Tim12	<i>S.cerevisiae</i>	CSTFNNILSTCLEKCIPIHEGFGEPDLTKGEQCCIDRCVAKMHYSNRLIGGFVQT	109	P32830
Tim10	<i>A.nidulans</i>	TDMPNRLSESCSKCIPN_DYREGDLNKGESVCLDRCVGKFFEVNFKVSEKMQG	93	AF150097
Tim10	<i>Ar.thaliana</i>	VELFNKLAQTCFNKCVDK_RYKEAELNMGENSECIDRCVSKYQVNGMVGQLLSA	83	AF150093
Tim10	<i>L.esculentum</i>	VEMFNKLTHTCFKCVEN_KYKSELNMGENSECIDRCVSKYQVTVNLVGTLLGN	81	AF150096
Tim10	<i>P.taeda</i>	VELFNKLTCTCFDKCIER_RYKSELNMGESCVDRCVAKYQVTSIVGQLLGS	84	AF144706
Tim8	<i>C.elegans</i>	TEQVHTLTGRCDVCFADYRP_PSKMDGKTQTCFQNCVNRMIDASNFVMEHLISK	83	AF150086
Tim8a	<i>H.sapiens</i>	QQLVHQMTTELCWEKCMD__KP_GPKLDSRAEACFVNCVERFIDTSQFILLNRLEQ	97	U66035
Tim8a	<i>M.musculus</i>	QQLVHQMTTELCWEKCMD__KP_GPKLDSRAEACFVNCVERFIDTSQFILLNRLEQ	97	AF150081
Tim8a	<i>R.norvegicus</i>	QQLVHQMTTELCWEKCMD__KP_GPKLDSRAEACFVNCVERFIDTSQFILLNRLEQ	97	AF150082
Tim8b	<i>H.sapiens</i>	TAQVHHFMELCWDKCVVE__KP_GNRLDSRTENCLSSCVDRFIDTTLAITSRFAQ	83	AF150087
Tim8b	<i>M.musculus</i>	TAQVHHFMELCWDKCVVE__KP_GSRLDSRTENCLSSCVDRFIDTTLAITGRFAQ	83	AF196314
Tim8b	<i>R.norvegicus</i>	TAQVHHFMELCWDKCVVE__KP_GSRLDSRTENCLSSCVDRFIDTTLAITGRFAQ	83	AF196315
Tim8	<i>D.melanogaster</i>	NAQIHFNEICWEKCIIG__KP_STKLDHATETCLSNVDRFIDTSLITQRFQAQ	88	AF142424
Tim8	<i>Ss.pombe</i>	QQAITHQFTSTCWPKCIGNI__GNKLDKSEEQCLQNCVERFLDCNFHIIKRYAL	98	AF143537
Tim8	<i>S.cerevisiae</i>	QMSIQFTNICFKKCVESVN__DNLSSQEEQCLSNVNAFLDTNIRIVNGLQN	87	YJR135wa
Tim8	<i>N.crassa</i>	QGGQTHALTDSCWKKCVTSPI_KTNQLDKAEVCMADCVREFLDVNLTIMAHVQK	92	AF142423
Tim8	<i>Ar.thaliana</i>	NEMVSKMTSVCDKCIITSA_P_GSKFSSSESSCLTHCAQRYMDMSMIIMKRFNS	77	AF150083
Tim8	<i>Ma.domesticus</i>	NEMVGKLTNVCDKCIITGT_P_GSKFSSSESACLANCARRYLDMSMIIM	71	AF150084
Tim13	<i>H.sapiens</i>	QELLQRMTDKCFRKCIGK_P_GGSLDNSEQKCIAMCDRYMDANNTVSRAYNSR	95	AF144700
Tim13	<i>R.norvegicus</i>	QELLQRMTDKCFRKCIGK_P_GGSLDNSEQKCIAMCDRYMDANNTVSRAYNSR	95	AF144701
Tim13	<i>M.musculus</i>	QELLQRMTDKCFRKCIGK_P_GGSLDNSEQKCIAMCDRYMDANNTVSRAYNSR	95	AF144702
Tim13	<i>Br.malayi</i>	QNMITDXSERCLTKCITX_P_GSALSXTERQCLQRCMDRFMETYXLASQXLQNR	98	AF144705
Tim13	<i>C.elegans</i>	QNLVTDISEKCTNKCIITA_P_GSSLASGEKQCLQRCMDRFMESWNLVSTLQHR	108	AF144704
Tim13	<i>S.cerevisiae</i>	TENVNKISENCFEKCLTS_P__YATRNDACIDQCLAKYMRSWNVISKAYISR	105	G7157
Tim13	<i>Ss.pombe</i>	GELISKINENCFDRCIPE_P_GSTFDPNKESCVSKCMERYMDANNTVSRFYISR	95	AF143538
Tim13	<i>Ar.thaliana</i>	EELIETLRKCFDRCVTX_P_GSSLGGSESSCISRCVERYMEATAIISRSLFTQ	87	AF144703
Tim13	<i>O.sativa</i>	QEFLETVGNKCFKCVTK_P_GSSLGSGSESSCISRCVDRIEATGIVSRXLFXS	84	AF150080

Abb. 4 Sequenzvergleich der Bereiche um das Cys₄-Motiv von Mitgliedern der Familie der kleinen Tim-Proteine in verschiedenen Eukaryonten. Die Domänen mit dem Konsensus-Motiv CX₃C-X₁₄₋₁₇-CX₃C und angrenzende Bereiche (49-54 Aminosäuren) der kleinen Tim-Proteine verschiedener Spezies wurden mit Hilfe des MegAlign Programmes (DNASTar) verglichen. Die Gesamtlängen der Proteine sowie die GenBank Accession-Nummern sind angegeben. Die Gattungsnamen wurden folgendermaßen abgekürzt: A., *Aspergillus*; Ar., *Arabidopsis*; B., *Brassica*; Bo., *Bombyx*; Br., *Brugia*; C., *Caenorhabditis*; Ci., *Ciona*; Da., *Danio*; D., *Drosophila*; H., *Homo*; L., *Lycopersicon*; Ma., *Malus*; Me., *Mesembryanthemum*; M., *Mus*; N., *Neurospora*; O., *Oryza*; P., *Pinus*; R., *Rattus*; S., *Saccharomyces*; Ss., *Schizosaccharomyces*.

3.2 Die humanen kleinen Tim-Proteine sind Zink-bindende Proteine

Die Funktion der konservierten Cysteine ist noch ungeklärt. Motive aus Cysteinen in Kombination mit Histidinen sind in verschiedenen Proteinklassen als Metallbindungsmotive bekannt. Cystein-Motive dienen in vielen DNA- oder RNA-bindenden Proteinen auch zur Ausbildung von Zinkfingerstrukturen. Das in den kleinen Tim-Proteinen konservierte doppelte CX₃C-Motiv stellt ein bisher uncharakterisiertes potentiell Metallbindungsmotiv dar. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die Proteine Tim10 und Tim12 aus *S. cerevisiae* Zn²⁺-Ionen binden können (Sirrenberg et al., 1998). Es sollte nun geprüft werden, ob die vier Cysteine in den humanen kleinen Tim-Proteinen ebenfalls die Bindung von Zn²⁺ vermitteln und somit zur Bildung einer Zinkfingerstruktur beitragen können.

Die Fähigkeit zur Bindung von Zink wurde an rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen getestet. Dazu wurde als Vertreter der kleinen Tim-Proteine das DDP1 und sein Partnerprotein, das humane Tim13 ausgewählt, die im menschlichen Intermembranraum einen löslichen Komplex bilden (Rothbauer et al., 2001). Beide Proteine wurden als Fusionsproteine zusammen mit dem Maltosebindungsprotein (MBP) in *E. coli* exprimiert (MBP-DDP1 bzw. MBP-Tim13). Die Expression erfolgte unter Zugabe von 1 mM Zn²⁺-Ionen, die Lyse der Zellen erfolgte in einem Puffer mit gleicher Zn²⁺-Konzentration. Die MBP-Fusionsproteine wurden über eine Amylose-Säule affinitätsgereinigt. Als Kontrollprotein wurde das α -Fragment der β -Galaktosidase als Fusionsprotein an MBP (MBP- α) unter den gleichen Bedingungen exprimiert und aufgereinigt (Abb. 5).

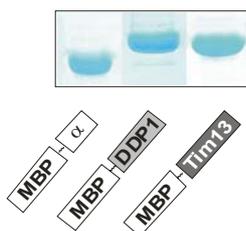


Abb. 5 Gereinigte MBP-Fusionsproteine für die Bestimmung des Gehaltes an Zn²⁺ mit ICP. DDP1 und Tim13 wurden als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über eine Amylose-Säule gereinigt. Als Kontrolle wurde das α -Fragment der β -Galaktosidase ebenfalls als MBP-Fusionsprotein gereinigt. Die Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Die Bestimmung des Zinkgehaltes der gereinigten Proteine erfolgte mittels optischer Emissionsspektroskopie mit Anregung durch ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP). Die Atomabsorption wurde bei den für Zink spezifischen Wellenlängen 206,200 nm und 213,857 nm gemessen. Dabei wurde das stärkste Signal bei 213,857 nm erhalten. Bezogen auf die Proteinkonzentration ergab sich ein berechnetes Verhältnis von etwa 1 mol Zn²⁺ pro mol Protein für MBP-DDP1 und für MBP-Tim13 (Abb. 6A oben und Mitte); MBP- α dagegen

enthielt nur minimale Mengen von Zn^{2+} (Abb. 6B). DDP1 und Tim13 sind somit zinkbindende Proteine.

3.2.1 Das konservierte Cys₄-Motiv ist ein Metall-Bindungs-Motiv

Um zu testen, ob die Cysteinreste für die Koordination des Zn^{2+} verantwortlich sind, wurden diese vor der Affinitätsreinigung mit N-ethylmaleimid (NEM) spezifisch modifiziert. Durch NEM werden die Sulfhydrylgruppen alkyliert, so dass sie die Fähigkeit zur Bindung von Zn^{2+} -Ionen verlieren. Wie in Abb. 6A (*unten*) zu sehen ist, ist die Signalintensität in MBP-DDP1 nach Vorbehandlung mit NEM deutlich reduziert. Das berechnete molare Verhältnis von Zn^{2+} zu MBP-DDP1 wird durch NEM auf Hintergrundniveau vermindert (Abb. 6B). Dies zeigt, dass die Zinkbindung spezifisch durch die konservierten Cysteine vermittelt wird.

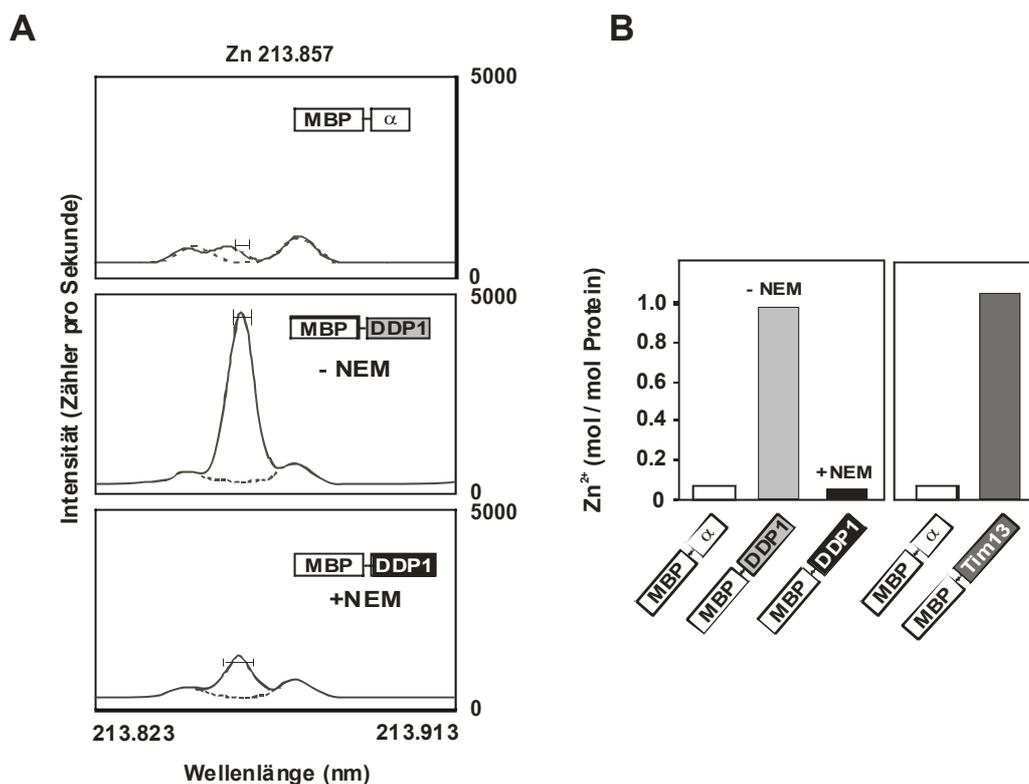


Abb. 6 Zinkgehalt von DDP1 und Tim13 Fusionsproteinen. (A) ICP-Analyse von MBP- α und MBP-DDP1 mit und ohne Vorbehandlung mit NEM. Gezeigt sind die Signalintensitäten bei der zinkspezifischen Wellenlänge von 213, 857 nm. (B) MBP-DDP1 und MBP-Tim13 binden äquimolare Mengen Zn^{2+} . Berechnete molare Verhältnisse von Zn^{2+} zu MBP- α , MBP-Tim13 und MBP-DDP1 mit und ohne Vorbehandlung mit NEM.

3.2.2 Mutationen im Cys₄-Motiv zerstören die Metallbindungskapazität der kleinen Tim-Proteine

Mutationen im DDP1 sind die Ursache des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms, einer progressiven neurodegenerativen Erkrankung. In einem Fall wurde eine Punktmutation beschrieben, die zu einem Austausch des letzten konservierten Cysteins gegen ein Tryptophan (C66W) führt (Tranebjaerg et al., 2000). Das Fehlen eines von vier funktionellen Cysteinen scheint zur Dysfunktion des Proteins zu führen. Es sollte daher getestet werden, wie sich die C66W-Mutation auf die Metallbindungseigenschaften des DDP1 auswirkt. Dazu wurde durch sequenzspezifische Mutagenese ein Nukleotidaustausch von Cytosin gegen Thymidin an der Position 233 der DDP1-cDNA eingeführt. Diese erlaubte im Folgenden die Expression eines DDP1^{C66W}-Proteins. MBP-DDP1 und MBP-DDP1^{C66W} wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die Proteine wurden, wie oben beschrieben, über eine Amylose-Säule aufgereinigt. Im Anschluß wurde mittels ICP die Menge des gebundenen Zinks quantifiziert. Im Vergleich zu MBP-DDP1 war der Gehalt an Zn²⁺ in MBP-DDP1^{C66W} deutlich vermindert (Abb. 7A). Das berechnete molare Verhältnis von Zn²⁺ zu Protein lag im Fall des DDP1 erneut bei etwa 1:1. Für das MBP-DDP1^{C66W} ergab sich ein Quotient, der nur leicht über dem Hintergrundniveau lag, das auch in MBP- α nachzuweisen war (Abb. 7B). Der Austausch eines der vier Cysteine führt also zum kompletten Verlust der Metallbindungsfähigkeit.

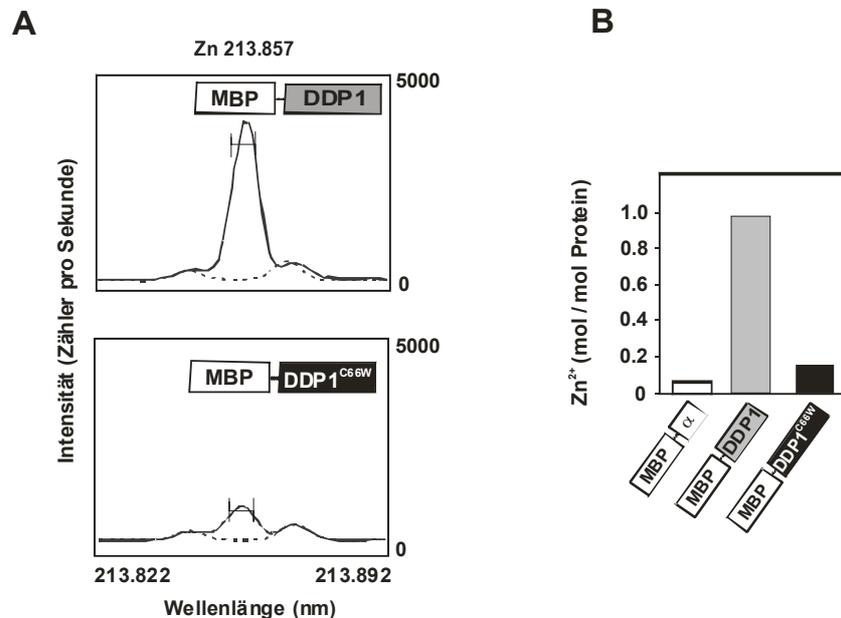


Abb. 7 Zinkgehalt von MBP-DDP1 und MBP-DDP1^{C66W}. (A) ICP-Analyse von MBP-DDP1 und MBP-DDP1^{C66W}. Gezeigt sind die Signalintensitäten bei der zinkspezifischen Wellenlänge von 213, 857 nm. (B) MBP-DDP1^{C66W} bindet kein Zn²⁺. Berechnete molare Verhältnisse von Zn²⁺ zu MBP- α , MBP-DDP1 und MBP-DDP1^{C66W}.

3.2.2.1 Die DDP1^{C66W}-Mutation verhindert die Interaktion mit Tim13

Die ICP-Messungen haben gezeigt, dass DDP1^{C66W} nicht mehr in der Lage ist, Zn²⁺-Ionen zu binden. Es stellte sich also die Frage, ob die Zinkbindung im DDP1 einen Einfluss auf die Interaktion mit seinem Partnerprotein Tim13 ausübt.

Um dies zu testen, wurde ein zweistufiges Interaktionsexperiment durchgeführt. Dazu wurden DDP1 oder DDP1^{C66W} mit N-terminalem Hexahistidinpeptid (His₆-DDP1 oder His₆-DDP1^{C66W}) und Tim13 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (Tim13-GST) rekombinant in *E. coli* exprimiert. Im ersten Schritt wurden His₆-DDP1 bzw. His₆-DDP1^{C66W} an Ni-NTA-Agarose gebunden und so eine DDP1 bzw. DDP1^{C66W}-Affinitätssäule erhalten. Dann wurden beide Säulen mit einem löslichen *E. coli*-Extrakt, der Tim13-GST enthielt, inkubiert. Nach intensivem Waschen der Säulen wurden gebundene Proteine mit Imidazol eluiert und Aliquots der Elutionsfraktionen analysiert (Abb. 8A und B, *links*). Tim13-GST koeluierte mit His₆-DDP1 in Fraktion 4. Von der anderen Säule eluierte His₆-DDP1^{C66W} in der gleichen Fraktion wie DDP1, aber diese enthielt nur Spuren von Tim13-GST. Um eine unspezifische Bindung des GST-Fusionsproteins an die Ni-NTA-Säule auszuschließen, wurde ein zweiter Reinigungsschritt angeschlossen. Dabei wurden die Elutionsfraktionen 3–5 beider Ni-NTA-Säulen jeweils mit reduzierter Glutathion-Sepharose inkubiert. Glutathion-Sepharose bindet spezifisch GST-Fusionsproteine, aber keine Hexahistidinpeptid-Fusionsproteine. Nach dem Waschen wurden gebundene Proteine in Lämmli-Puffer eluiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und jeweils zur Hälfte durch Immundekoration (Abb. 8A *Mitte* und B *rechts*) und Färbung mit Coomassie (Abb. 8A *rechts*) analysiert. Die von der His₆-DDP1-Säule koeluierten Proteine konnten auch nach dem zweiten Reinigungsschritt zusammen nachgewiesen werden. His₆-DDP1^{C66W} hingegen war nach der zweiten Reinigung nicht mehr detektierbar, es konnten nur Spuren von Tim13-GST nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass DDP1 und Tim13 *in vitro* interagieren. Anhand der Proteinmengen auf dem mit Coomassie gefärbten Gel konnte eine Stöchiometrie von Tim13-GST zu His₆-DDP1 von etwa 1:1 abgeschätzt werden. Die Mutation innerhalb des Zinkfingermotivs des DDP1 führt zum Verlust der Interaktion mit Tim13.

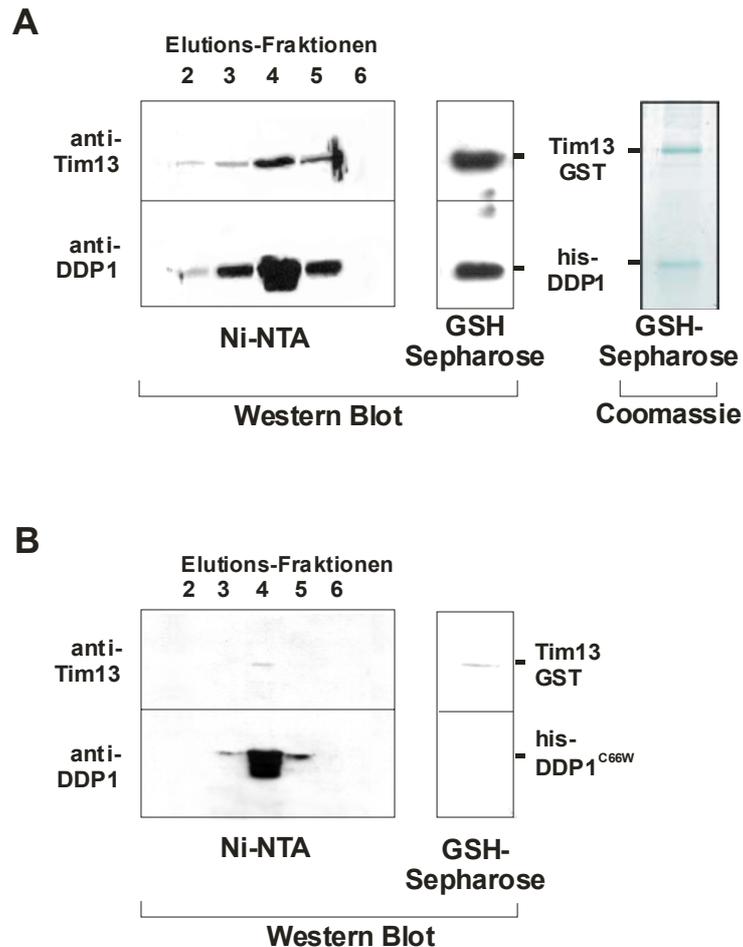


Abb. 8 Der Aminosäureaustausch im Zinkfingermotiv (DDP1^{C66W}) verhindert die Interaktion mit Tim13. (A) His₆-DDP1 und Tim13-GST wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert, die Zellen wurden aufgeschlossen und das His₆-DDP1 enthaltende Lysat wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen um eine DDP1-Affinitätssäule zu erhalten. Nach dem Waschen der Säule mit 20 mM Imidazol wurde das Tim13-GST enthaltende Lysat über Nacht mit diesem Säulenmaterial inkubiert. Es wurde ausgiebig gewaschen und dann mit 300 mM Imidazol eluiert. Aliquots der Elutionsfraktionen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit gereinigten Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 analysiert. Das Tim13-GST koeluierte mit His₆-DDP1 (*links*). In einem zweiten Reinigungsschritt wurden die Haupt-Elutionsfraktionen von der Ni-NTA-Säule auf Glutathion-Sepharose geladen. Nach intensivem Waschen wurde das gesamte gebundene Material von der Sepharose in Lämmli-Puffer eluiert und in zwei Teilen auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Ein Teil wurde auf einem Immunoblot analysiert (*Mitte*) und der andere Teil wurde mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (*rechts*). His₆-DDP1 und Tim13 lagen in stöchiometrischen Mengen vor. (B) Das gleiche Experiment wurde mit His₆-DDP1^{C66W} durchgeführt. Elutionen von der Ni-NTA-Säule enthielten His₆-DDP1^{C66W}, aber nur Spuren von Tim13 (*links*). Diese Fraktionen wurden ebenfalls auf Glutathion-Sepharose geladen, über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Immunoblot analysiert (*rechts*).

3.3 Charakterisierung der humanen Proteine Tim9, Tim10a und Tim10b

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, konnten sechs humane homologe Sequenzen zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe identifiziert werden. Drei von diesen Sequenzen kodieren für Homologe der in der Hefe essentiellen Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 (Abb. 9). Davon war eines das eindeutige Homolog von Tim9. Es zeigte 56,3 % Ähnlichkeit zu Hefe-Tim9, während die Ähnlichkeit zu Tim10 und Tim12 nur 44,1 % bzw. 41,8 % betrug (Tab. 3). Ein weiteres Protein wurde mit einer Ähnlichkeit von 56,4 % zu Tim10 eindeutig als Tim10-Homolog identifiziert und Tim10a genannt. Das dritte Protein wies geringere Ähnlichkeiten zu den drei Hefeproteinen auf (39,8 bis 41,8 %) (Tab. 3). Es wurde nur durch den Vergleich des Bereiches um das Zinkfingermotiv als Tim10-Homolog eingeordnet und als Tim10b bezeichnet.

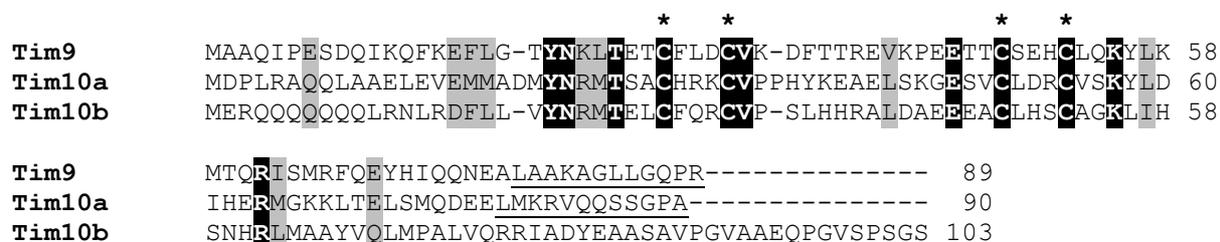


Abb. 9 Sequenzvergleich der humanen zu Tim9, Tim10 und Tim12 homologen Proteine. Die humanen Proteine wurden als Tim9, Tim10a und Tim10b bezeichnet. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hervorgehoben. Die konservierten Cysteine (Cys₄-Motiv) sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die unterstrichenen Aminosäuren im C-Terminus stellen die Peptide dar, gegen die Antikörper generiert wurden.

	hTim9	hTim10a	hTim10b
S.c. Tim9	38,5 (56,3) %	19,8 (47,9) %	20 (41,8) %
S.c. Tim10	16,7 (44,1) %	30,7 (56,4) %	15,5 (39,8) %
S.c. Tim12	13,6 (41,8) %	22,0 (45,9) %	18,4 (41,7) %

Tab. 3 Sequenzhomologien der Tim9/10-Proteine aus Mensch zu Tim9, Tim10 und Tim12 aus Hefe in Prozent der identischen Aminosäuren (in Klammern: ähnliche Aminosäuren). Die Sequenzvergleiche erfolgten mit dem ClustalW Programm des EBI (European Bioinformatics Institute) (Thompson et al., 1994).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die in der Datenbank identifizierten Sequenzen tatsächlich für authentische mitochondriale Proteine kodieren. Darüber hinaus sollten die strukturellen Eigenschaften der menschlichen Homologe und ihre funktionelle Bedeutung charakterisiert werden.

In der Hefe existiert ein löslicher 70 kDa-Komplex aus Tim9 und Tim10 im mitochondrialen Intermembranraum. Ein zweiter Komplex bestehend aus Tim9, Tim10 und Tim12 ist an das membranintegrale Tim22 assoziiert und bildet mit diesem sowie Tim54 und Tim18 einen 300 kDa-Komplex (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998b). Aus Tab. 3 ist ersichtlich, dass keines der menschlichen Proteine eine ausgeprägte Homologie zu Tim12 aufweist. Da Tim12 in der Hefe essentiell ist und scheinbar kein Homologes im Menschen vorhanden ist, sollte insbesondere untersucht werden, ob eines der Proteine strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeit zu Tim12 aufweist.

3.3.1 Tim9, Tim10a und Tim10b sind mitochondriale Proteine

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von Tim9, Tim10a und Tim10b wurden subzelluläre Fraktionen von HeLa Zellen auf einem Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern analysiert. Die kleinen Tim Proteine waren in der mitochondrialen Fraktion zusammen mit dem mitochondrialen Markerprotein Tim23 zu finden, während sie in der zytosolischen und der mikrosomalen Fraktion nicht detektierbar waren (Abb. 10).

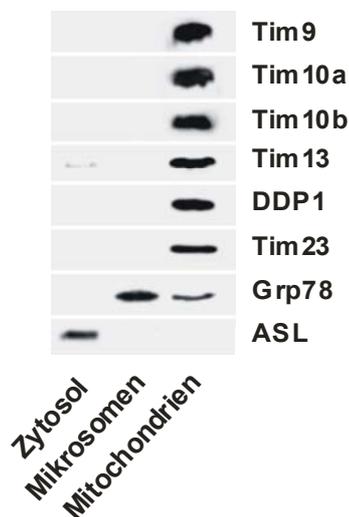


Abb. 10 Tim9, Tim10a und Tim10b sind mitochondriale Proteine. Ein Zellhomogenat aus HeLa Zellen wurde durch Differentialzentrifugation und Ultrazentrifugation über einen Sucrose-Stufengradienten in eine zytosolische, eine mikrosomale und eine mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Gleiche Mengen dieser Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel geladen und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b dekoriert. Als Kontrolle für die mitochondriale, mikrosomale und cytosolische Fraktion wurden Antikörper gegen hTim23, Grp78 und Argininosuccinatlyase (ASL) verwendet.

3.3.2 Tim9, Tim10a und Tim10b sind mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert

Zur Analyse der intramitochondrialen Lokalisation wurden Mitochondrien aus HeLa Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Digitonin behandelt. Digitonin permeabilisiert selektiv die äußere Membran. Durch Zentrifugation wurden die Mitochondrien in eine Membranfraktion und in eine lösliche Fraktion aufgetrennt. Bei einer Digitoninkonzentration von 0,08 % beginnt die Öffnung der Außenmembran; etwa 50 % des löslichen Intermembranraumproteins DDP1 waren im löslichen Überstand zu finden. Bei einer Konzentration von 0,13 % Digitonin war die Außenmembran vollständig geöffnet, während die Innenmembran noch intakt war. Dementsprechend fand sich DDP1 vollständig im Überstand, während das integrale Innenmembranprotein Tim23 noch im Pellet zu finden war.

Die kleinen Tim-Proteine Tim9, Tim10a und Tim10b blieben unter diesen Bedingungen ebenfalls vollständig im Pellet. Erst bei einer Digitoninkonzentration von 0,3 %, bei der auch das Innenmembranprotein Tim23 solubilisiert wurde, wurden auch Tim9, Tim10a und Tim10b in den Überstand abgegeben (Abb. 11). Diese Verteilung war nicht von der Anwesenheit eines Membranpotentials abhängig. Im Gegensatz zu den kleinen Tim-Proteinen DDP1 und Tim13, die als lösliche Komplexe vorliegen, sind Tim9, Tim10a und Tim10b mit der Innenmembran assoziiert. Auch im Vergleich zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998c) zeigen die humanen Homologe eine höhere Affinität zur Innenmembran.

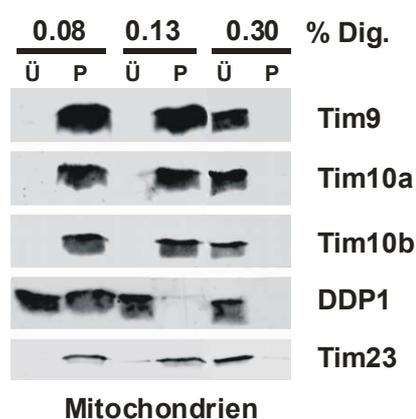


Abb. 11 Schrittweise Öffnung der äußeren Mitochondrienmembran mit ansteigenden Digitoninkonzentrationen.

Humane Mitochondrien aus HeLa Zellen (50 µg) wurden mit ansteigenden Konzentrationen Digitonin (*Dig.*) 30 min auf Eis inkubiert. Das Membranpellet wurde durch Ultrazentrifugation bei 30.000 rpm (TLA100) von den löslichen Bestandteilen abgetrennt. Proteine aus dem Überstand wurden mit TCA gefällt. Die gefällten Überstände (Ü) und die Pellets (P) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a, Tim10b, DDP1 und hTim23 analysiert.

3.3.2.1 Tim9, Tim10a und Tim10b zeigen unterschiedliche Membranaffinitäten

Da die kleinen Tim-Proteine keine Transmembrandomäne besitzen, können sie nur peripher mit der Membran assoziiert sein. Um die Stabilität dieser Assoziation genauer zu untersuchen, wurde die äußere Membran von Mitochondrien aus humaner Leber durch eine niedrige Digitoninkonzentration (0,1 %) geöffnet und die Membranfraktion mit Hochsalzpuffer (0,5 M NaCl) oder alkalischem pH (100 mM Na₂CO₃, pH 11) behandelt. Durch Behandlung mit NaCl wurden Tim9 und Tim10a etwa zur Hälfte von der Membran abgelöst, während Tim10b mit der Membran assoziiert blieb. Durch Carbonatextraktion bei pH 11 werden periphere Membranproteine von der Membran abgelöst. Hier wurden nach Inkubation mit 100 mM Na₂CO₃ Tim9 und Tim10a in den Überstand abgegeben, Tim10b konnte unter diesen Bedingungen nur zur Hälfte freigesetzt werden (Abb. 12). Während Tim9 und Tim10a somit nur relativ lose mit der Membran assoziiert sind, zeigt Tim10b eine starke Membranassoziation.

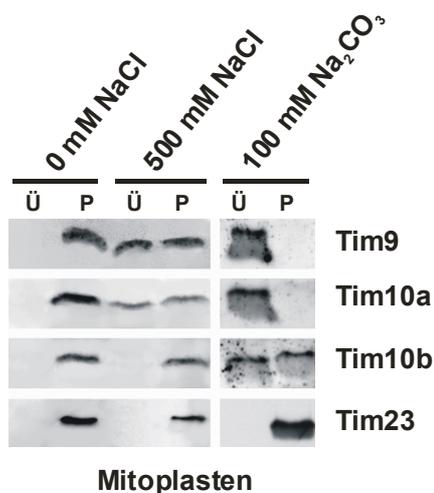


Abb. 12 Membranassoziation von Tim9, Tim10a und Tim10b. Mitochondrien aus humaner Leber (50 µg) wurden mit 0,1 % Digonin 30 min auf Eis vorbehandelt um die äußere Membran zu öffnen, reisoliert und in PBS, in PBS unter Zugabe von 500 mM NaCl oder in 100 mM Na₂CO₃, pH 11, 30 min inkubiert. Die Inkubation mit NaCl erfolgte auf Eis, die Carbonatextraktion bei RT. Membranen wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g pelletiert. Proteine aus dem Überstand wurden mit TCA gefällt. Die gefällten Überstände (Ü) und die Pellets (P) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a, Tim10b und hTim23 analysiert.

Aus der Hefe ist bekannt, dass Tim12 durch Behandlung mit 500 mM NaCl von der Membran nicht ablösbar ist (Adam et al., 1999). Dasselbe Verhalten konnte in diesem Experiment für das Tim10b beobachtet werden. Es weist, ähnlich wie Tim12, eine stärkere Assoziation mit der Membran auf als die anderen kleinen Tim Proteine. Dies wird auch in der Carbonatextraktion sichtbar, Tim10b ist auch hier weniger effizient von der Membran extrahierbar.

3.3.3 Tim9, Tim10a und Tim10b sind in zwei hetero-oligomeren Komplexen organisiert

In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob und wie die kleinen Tim-Proteine miteinander interagieren. Dazu wurden Mitochondrien mit 0,5 % Digitonin solubilisiert und die Tim-Proteine mit affinitätsgereinigten Antikörpern immunopräzipitiert. Tim9 konnte mit Antikörpern gegen Tim9 und gegen Tim10a gefällt werden; ebenso wurde auch Tim10a mit diesen beiden Antikörpern gefällt (Abb. 13 *links*). Mit beiden Antikörpern konnten sowohl Tim9 als auch Tim10a vollständig gefällt werden (Abb. 13 *rechts*). Dies legt nahe, dass Tim9 und Tim10a spezifisch und ausschließlich miteinander in einem Komplex organisiert sind.

Auch Tim10b wurde mit Antikörpern gegen Tim9 und Tim10a, aber auch mit Antikörpern gegen sich selbst quantitativ präzipitiert. Dagegen wurden Tim9 und Tim10a mit einem Antikörper gegen Tim10b nur unvollständig kopräzipitiert. (Abb. 13). Diese Beobachtungen zeigen, dass alle drei Proteine in engem Kontakt zueinander stehen. Basierend auf den Koimmunopräzipitationen scheinen die kleinen Tim Proteine jedoch in zwei verschiedenen hetero-oligomeren Komplexen organisiert zu sein. Ein Komplex besteht aus Tim9 und Tim10a, der andere Komplex enthält Tim9, Tim10a und Tim10b.

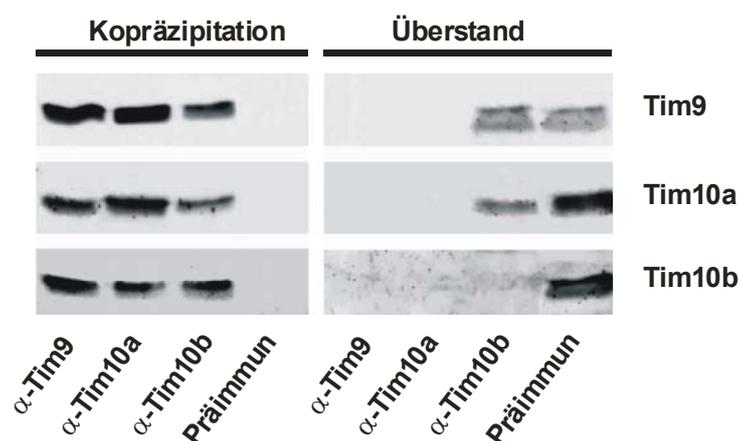


Abb. 13 Tim9, Tim10a und Tim10b liegen in zwei unterschiedlichen Komplexen vor. Isolierte Mitochondrien aus humaner Leber wurden in 0,5 % Digitonin 30 min auf Eis solubilisiert. Aliquots von 50 µg wurden zur Immunopräzipitation mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b eingesetzt. Zur Kontrollpräzipitation wurde Präimmunsereum verwendet. Nach der Depletion mit Antikörpern wurden die Proteine aus dem Überstand mit TCA gefällt. Immunopräzipitate (*rechts*) und ungebundene Proteine (*links*) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b dekoriert.

3.3.3.1 Die beiden hetero-oligomeren TIM-Komplexe unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht

Zur Bestimmung der Größe der beiden Intermembranraumkomplexe wurden Mitochondrien aus Mausleber in 1 % Digitonin solubilisiert und auf einem Blau-Nativgel aufgetrennt. Für die immunologische Detektion der beiden hetero-oligomeren Komplexe wurden Antikörper gegen Tim10a verwendet. Da Tim10a Bestandteil beider Komplexe ist, sollte somit sowohl der Tim9-10a- als auch der Tim9-10a-10b-Komplex analysiert werden. Die Immunodekoration zeigte einen Hauptkomplex mit einem apparenten Molekulargewicht von 400-500 kDa. Ein geringer Teil des Tim10a war in einem Komplex von etwa 80 kDa zu finden (Abb. 14).

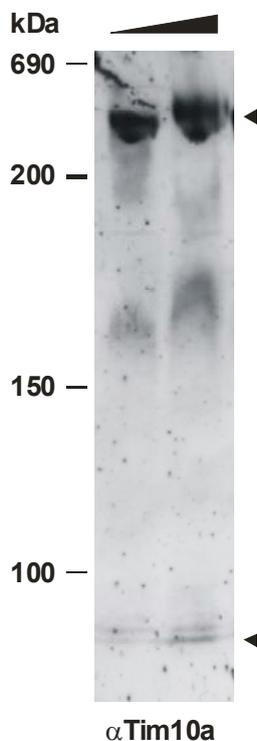


Abb. 14 Tim10a liegt in zwei Proteinkomplexen von unterschiedlicher Größe vor. Mitochondrien aus Mausleber (100 und 200 µg) wurden in 1 % Digitonin 30 min auf Eis solubilisiert und die löslichen Extrakte auf einem Blau-Nativgel mit einer Acrylamidkonzentration von 6-13 % aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörper gegen Tim10a dekoriert. Als Markerproteine wurden Rinderthyreoglobulin (670 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 und 100 kDa) mit aufgetragen. Tim10a wurde in zwei Komplexen von 400-500 kDa und ca. 80 kDa detektiert. Bei einer Größe von etwa 160-170 kDa trat ein unspezifisches Signal auf.

Neben der Blau-Nativ-Gelelektrophorese wurden gelchromatographische Methoden zur Größenbestimmung genutzt. Hierfür wurden Mitochondrien aus humaner Leber in 0,5 % Digitonin solubilisiert und auf einer Superose12-Gelfiltrationssäule chromatographiert. Tim9 und Tim10a waren in zwei Komplexen unterschiedlicher Größe zu finden, einem Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 450-500 kDa und einem Komplex von 70-80 kDa. Unter den gleichen Bedingungen fand sich Tim10b ausschließlich in dem 450-500 kDa-Komplex (Abb. 15A und B *links*).

Die Koimmunfällungen und die Gelchromatographie haben übereinstimmend gezeigt, dass Tim9, Tim10a und Tim10b in zwei Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung vorliegen, einem Tim9-10a- und einem Tim9-10a-10b-Komplex. Diese beiden Komplexe unterscheiden sich darüber hinaus in ihrem Molekulargewicht und in ihrer Assoziation mit der Innenmembran: Der Tim9-10a-10b-Komplex mit einem Molekulargewicht von 450-500 kDa ist fest mit der Innenmembran assoziiert. Der lose assoziierte Tim9-10a-Komplex hat ein Molekulargewicht von 70-80 kDa.

Der höhermolekulare Komplex ist in Triton X-100 nicht stabil (Abb. 15A und B *rechts*) und zeigt damit ein ähnliches Verhalten wie der TIM22-Komplex in der Hefe, der in Digitonin stabil ist, während er nach Lyse in Triton X-100 dissoziiert (Adam et al., 1999; Sirrenberg et al., 1996; Sirrenberg et al., 1998).

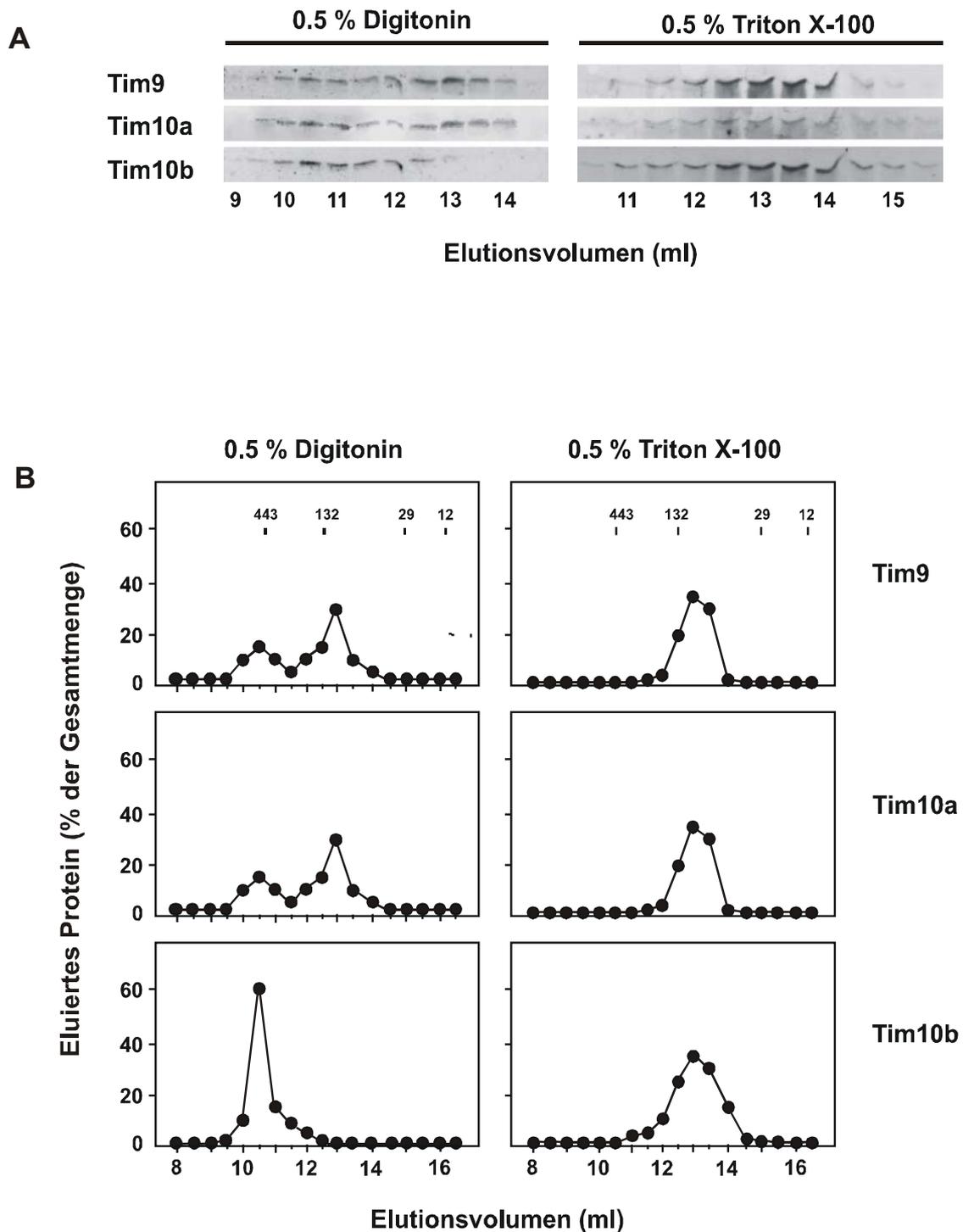


Abb. 15 Bestimmung des Molekulargewichts der kleinen Tim-Proteine. (A) Isolierte humane Mitochondrien wurden in 0,5 % Digitonin oder in 0,5 % Triton X-100 30 min auf Eis solubilisiert und die löslichen Extrakte auf einer Superose12-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Proteine aus den Elutionsfraktionen wurden mit TCA gefällt, mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b analysiert. (B) Elutionsprofile der untersuchten Proteine. Die Signalintensitäten aus A wurden mit Densitometrie quantifiziert. Die Elutionen der als Größenstandard verwendeten Proteine (Apoferitin 443 kDa, Rinderserumalbumin 132 kDa, Carboanhydrase 29 kDa und Cytochrom c 12 kDa) sind angeben.

3.3.4 Tim9, Tim10a und Tim10b sind in Kontakt zu Tim22

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die kleinen Tim-Proteine mit Tim22 interagieren. Mitochondrien aus humaner Leber wurden mit 0,5 % Digitonin solubilisiert und aus den Extrakten wurde mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10b und Tim22 gefällt. Alle drei kleinen Tim-Proteine konnten sowohl mit Antikörpern gegen Tim9 und Tim10b als auch mit einem Antikörper gegen Tim22 gefällt werden. Allerdings konnten die kleinen Tim-Proteine mit dem Antikörper gegen Tim22 nur zum Teil gefällt werden, der weitaus größere Teil verblieb im Überstand. In einem Kontrollexperiment konnte Tim22 mit dem Antikörper gegen Tim22 vollständig gefällt werden. Auch umgekehrt war es möglich, Tim22 mit Antikörpern gegen Tim9 und Tim10b zu immunpräzipitieren (Abb. 16). Auch hier war die Fällung nicht vollständig und ein Teil des Tim22 verblieb im Überstand. Tim9, Tim10a und Tim10b sind demnach in Kontakt mit Tim22. Die unvollständige Fällung der kleinen Tim-Proteine durch Tim22 deutet aber darauf hin, dass es sich hierbei um eine labile Interaktion handelt, oder dass die kleinen Tim-Proteine im Überschuss über Tim22 vorliegen und auch als freie Komplexe vorkommen können.

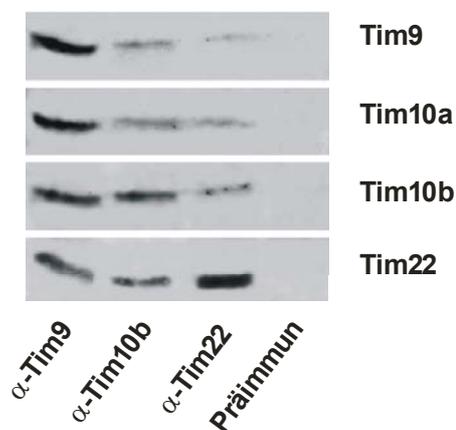


Abb. 16 Tim9, Tim10a, Tim10b interagieren mit Tim22. Isolierte Mitochondrien aus humaner Leber wurden in 0,5 % Digitonin 30 min auf Eis solubilisiert und Aliquots von 50 µg Mitochondrienextrakt wurden zur Immunopräzipitation mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Tim9, Tim10b und Tim22 (Peptidantikörper) eingesetzt. Zur Kontrollpräzipitation wurde Präimmunserum verwendet. Immunopräzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a, Tim10b und Tim22 analysiert.

3.4 Funktionsuntersuchungen der humanen Tim-Proteine im heterologen Hefesystem

3.4.1 Funktionsuntersuchungen der kleinen Tim-Proteine

Trotz der relativ hohen Übereinstimmung auf Aminosäureebene zwischen den kleinen Tim-Proteinen der Hefe und des Menschen gibt es deutliche Unterschiede bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Die bisherigen Daten zeigen, dass beide menschlichen Komplexe, Tim9-10a und Tim9-10a-10b, mit der Innenmembran assoziiert sind. Bisher konnte kein löslicher Komplex gefunden werden. Darüber hinaus ist die Interaktion zwischen diesen Komplexen und dem humanen Tim22 weniger stabil als in der Hefe. Es sollte nun getestet werden, ob die humanen kleinen Tim-Proteine trotz dieser Unterschiede die Funktion ihrer homologen Proteine in der Hefe übernehmen können. Insbesondere sollte getestet werden, welches humane Homologe eventuell die Funktion des Hefe-Tim12 übernehmen kann.

Die Hefepoteine Tim10 und Tim12 sind essentielle Proteine. Die Inaktivierung der entsprechenden Gene hat somit einen letalen Phänotyp zur Folge. Daher wurden Hefestämme verwendet, in denen Tim10 und Tim12 unter der Kontrolle des regulierbaren GAL10 Promotors stehen und somit durch Wegnahme von Galaktose herunterreguliert werden können (Sirrenberg et al., 1998). In diese Hefestämme wurden die humanen Komponenten Tim9, Tim10a und Tim10b jeweils einzeln transformiert und das Wachstum der Hefen in Abwesenheit von Galaktose untersucht. Unter diesen Bedingungen (Tim10↓ bzw. Tim12↓) ist das Wachstum der Hefezellen stark eingeschränkt (Abb. 17). Die singuläre Expression des humanen Tim9, Tim10a oder Tim10b konnte das Wachstum dieser Hefezellen in Abwesenheit von Galaktose zwar im Vergleich zu den nicht-transformierten Hefen verbessern, allerdings nicht auf das Niveau des Wildtyps (Abb. 17). Die einzelnen Expressionen der humanen kleinen Tim-Proteine ergaben in beiden untersuchten Hefestämmen die gleichen Resultate: Das Fehlen von Tim10 sowie von Tim12 konnte am besten durch die Expression von Tim10a kompensiert werden. Durch die Expression von humanem Tim9 oder Tim10b wurde eine geringere Kompensation erzielt. Es wurde gezeigt, dass keines der untersuchten humanen kleinen Tim-Proteine spezifisch die Funktion des Tim12 ersetzen kann. Vielmehr scheint Tim10a als eine Art 'generelles Chaperon' die Funktion der kleinen Tim-Proteine der Hefe am besten zu übernehmen.

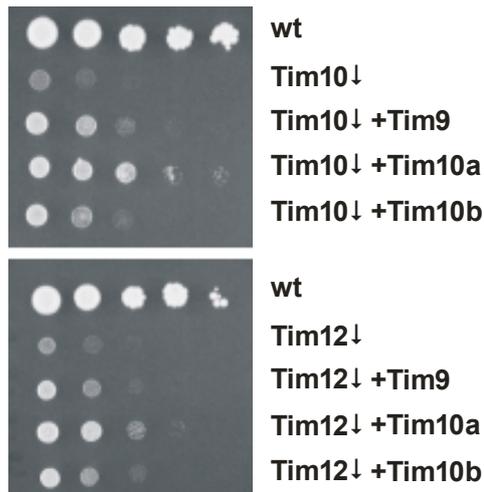


Abb. 17 Die humanen kleinen Tim-Proteine können den Wachstumsphänotyp der Tim10(Gal10) und Tim12(Gal10) Hefestämme in Abwesenheit von Galaktose komplementieren. Die Hefestämme W334a (wt), Tim10(Gal10), Tim10(Gal10)+Tim9, Tim10(Gal10)+Tim10a und Tim10(Gal10)+Tim10b bzw. Tim12(Gal10), Tim12(Gal10)+Tim9, Tim12(Gal10)+Tim10a und Tim12(Gal10)+Tim10b wurden 24 Stunden unter Entzug von Galaktose zu einer OD₅₇₈ von 1,0 herangezogen und in Reihen verdünnt. Jeweils 2 µl der Verdünnungen wurden auf einer YPD-Platte ohne Galaktose aufgetragen.

3.4.2 Funktionsuntersuchungen von Tim22

3.4.2.1 Import von humanem Tim22 in Mitochondrien aus Hefe

Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte menschliche Tim22 zeigt eine Ähnlichkeit von 26 % zum Hefe-Tim22. Die höchste Ähnlichkeit besteht im Bereich der Transmembrandomänen, während sich vor allem die N-terminale hydrophile Region zwischen Hefe und Mensch stark unterscheidet. Es wurde untersucht, ob menschliches Tim22 in Mitochondrien der Hefe importiert werden kann. Hierfür wurden Mitochondrien aus Wildtyp-Hefen isoliert und zunächst mit NADH energetisiert. Das Vorhandensein eines Membranpotentials über der Innenmembran ist unabdingbar für die Insertion von Innenmembranproteinen wie Tim22 (Sirrenberg et al., 1996). Die energetisierten Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Tim22 für 15 min inkubiert und anschließend mit Trypsin behandelt oder unbehandelt gelassen. Der Trypsinverdau erfolgte entweder an ganzen Mitochondrien oder nach Behandlung der Mitochondrien mit Digitonin um die Außenmembran zu öffnen. In intakten Mitochondrien war das Vorstufenprotein zum großen Teil vor Trypsinverdau geschützt. Nach Öffnung der Außenmembran mit Digitonin entstand ein trypsinresistentes Tim22-Fragment (Abb. 18A). Das Auftreten dieses Fragmentes in nicht mit Trypsin behandelten Mitochondrien weist darauf hin, dass ein Teil der Mitochondrien nicht mehr intakt war. Die Größe des Fragmentes von etwa 14 kDa entspricht der erwarteten Größe nach Abspaltung des N-Terminus vor der ersten Transmembrandomäne. Dies zeigt, dass humanes Tim22 in Anwesenheit eines Membranpotentials in Hefemitochondrien importiert und in die Innenmembran inseriert werden kann. Vermutlich ist es dort in einer ähnlichen Topologie wie Hefe-Tim22 organisiert; das heisst die Membran

wird mit vier Transmembrandomänen durchspannt, wobei der N- und der C-Terminus in den Intermembranraum exponiert sind.

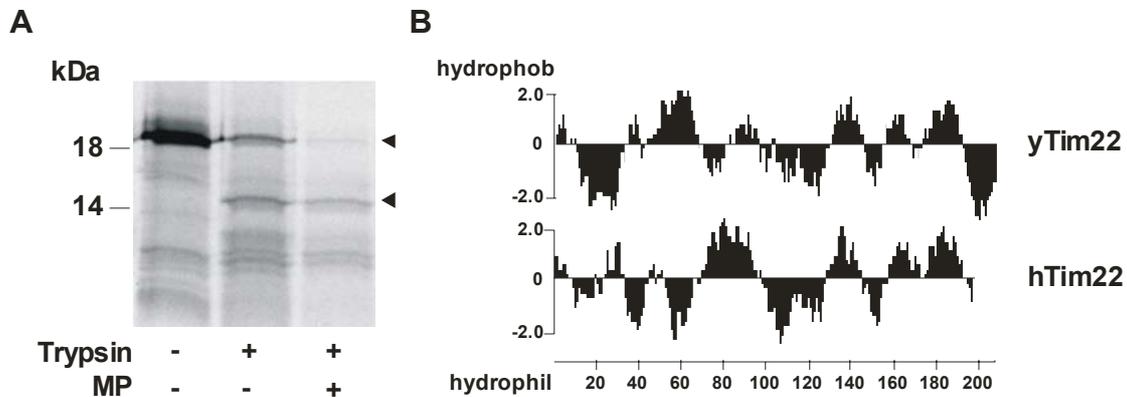


Abb. 18 Humanes Tim22 hat eine ähnliche Topologie wie Tim22 aus Hefe. (A) Humanes Tim22 wurde in Mitochondrien aus Hefe (wt) importiert. Dabei wurde durch Zugabe von NADH ein Membranpotential aufgebaut. Die Mitochondrien wurden mit *in vitro* synthetisiertem ³⁵S-markiertem Vorstufenprotein 15 min bei 25 °C inkubiert. Ein Drittel des Ansatzes wurde unbehandelt gelassen, ein Drittel wurde mit 50 µg/ml Trypsin verdaut und ein Drittel wurde vor dem Trypsinverdau mit 0,1 % Digitonin behandelt, um Mitoplasten (MP) zu erzeugen. Die Mitochondrien wurden sedimentiert durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie analysiert. Das Vorstufenprotein von etwa 19 kDa und das membranintegrale Fragment von etwa 14 kDa sind mit Pfeilspitzen markiert. **(B)** Die Hydropathieprofile der Tim22-Proteine aus Hefe und Mensch wurden nach Kyte-Doolittle erstellt. Sie weisen ein ähnliches Muster von Transmembrandomänen auf.

3.4.2.2 Humanes Tim22 kann das Hefehomolog funktionell nicht ersetzen

Es wurde untersucht, ob das menschliche Tim22 das Hefeprotein funktionell ersetzen kann. Da Tim22 in der Hefe ein essentielles Protein ist, wurde für diese Untersuchungen ein Hefestamm verwendet, in dem Tim22 unter der Kontrolle des regulierbaren GAL10 Promotors exprimiert wird (Sirrenberg et al., 1996).

Gleiche Zellzahlen des Tim22(Gal10)-Stammes, des Tim22(Gal10)+hTim22-Stammes und des isogenen Wildtypstammes wurden auf Mediumplatten ohne Galaktose aufgetragen. In Abwesenheit von Galaktose (Tim22↓) wird endogenes Hefe-Tim22 nicht oder nur auf sehr niedrigem Level exprimiert. Hier führte die Expression von humanem Tim22 zu keinerlei Verbesserung des Wachstums (Abb. 19). Humanes Tim22 ist also, wenn es alleine exprimiert wird, nicht in der Lage, die Funktion des Hefe-Tim22 zu übernehmen.



Abb. 19 Humanes Tim22 kann den Wachstumsphänotyp eines Tim22(Gal10) Hefestammes in Abwesenheit von Galaktose nicht komplementieren. Die Hefestämme W334a (wt), Tim22(Gal10) (Tim22↓) und Tim22(Gal10)+hTim22 (Tim22↓+Tim22) wurden 24 Stunden unter Entzug von Galaktose zu einer OD_{578} von 1,0 herangezogen und in Reihen verdünnt. Jeweils 2 μ l der Verdünnungen wurden auf einer YPD-Platte ohne Galaktose aufgetragen.

3.5 Die Funktion der humanen kleinen Tim-Proteine beim Import von Carrier-Molekülen

Die kleinen Tim-Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 in der Hefe spielen eine wichtige Rolle beim Import von mitochondrialen Metabolit-Carriern. Alle Mitglieder der Familie der Carrier-Proteine sind polytope, hydrophobe Innenmembranproteine. Die kleinen Tim-Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 unterstützen den Import der Carrier-Proteine in einer Chaperon-ähnlichen Weise. Während ihres Transports über die Außenmembran werden sie von Tim9 und Tim10 auf der *trans*-Seite des TOM-Komplexes empfangen und zu Tim22 transferiert. Dabei werden diese stark hydrophoben Moleküle bei dem Passieren des wässrigen Milieus im Intermembranraum in einem importkompetenten Zustand gehalten.

Es war zu vermuten, dass auch die menschlichen Homologe Tim9, Tim10a und Tim10b am Import von Carriern in die Innenmembran beteiligt sind. Zur detaillierten Untersuchung der Rolle der kleinen Tim-Proteine beim Import von Carrier-Molekülen wurden Mitochondrien aus Mausleber verwendet. Als Vertreter der Carrier wurde die leberspezifische Isoform des humanen Adenin-Nukleotid-Transporters ANT3 ausgewählt (Stepien et al., 1992).

3.5.1 Import des humanen ANT3 in Mitochondrien aus Mausleber als Modellsystem

Zunächst wurde getestet, ob der Import des humanen ANT3 in Mitochondrien aus Mausleber als Modellsystem geeignet ist. Dazu wurden vergleichende Importstudien von humanem ANT3 und dem ADP/ATP-Carrier aus *N. crassa* (AAC) in Mausleber- bzw. Hefemitochondrien unternommen. Für jedes Importexperiment wurden frisch isolierte Mitochondrien verwendet, da mit diesen die beste Importeffizienz zu erzielen war.

In parallelen Ansätzen wurden die jeweiligen radioaktiv markierten Vorstufenproteine in Mitochondrien importiert. Durch Behandlung mit Digitonin wurden anschließend Mitoplasten erzeugt und diese mit Proteinase K (PK) inkubiert. AAC konnte sowohl in Mitochondrien aus Hefe als auch in Mausleber-Mitochondrien mit gleicher Effizienz importiert werden. Im

Gegensatz dazu wurde ANT3 in Mausleber-Mitochondrien importiert, aber nicht in Mitochondrien aus Hefe (Abb. 20). Der Import des ANT3 in Mitochondrien aus Mausleber war also effizient genug, um im Folgenden als Modellsystem verwendet zu werden. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass sich möglicherweise im Laufe der Evolution veränderte Importerfordernisse für den Import von Carrierproteinen entwickelt haben.

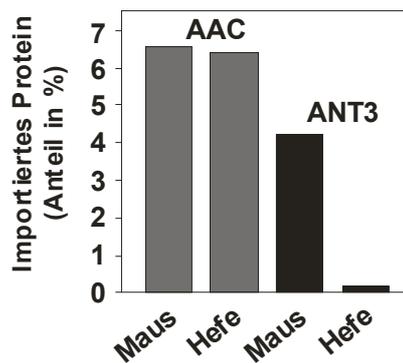


Abb. 20 Import von ANT3 ist in Mausleber-Mitochondrien, aber nicht in Hefemitochondrien möglich. ANT3 und AAC wurden in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber oder in Mitochondrien aus Hefe importiert. Dabei wurde durch Zugabe von NADH ein Membranpotential aufgebaut. Die Mitochondrien wurden mit den *in vitro* synthetisierten ³⁵S-markierten Vorstufenproteinen 15 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit 0,1 % Digitonin behandelt, um Mitoplasten (MP) zu erzeugen und mit 50 µg/ml PK inkubiert. Die Mitochondrien wurden sedimentiert durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie und Densitometrie analysiert.

3.5.2 Der Import des ANT3 ist abhängig von einem Membranpotential $\Delta\Psi$

Als nächstes wurden die Bedingungen für den Import des ANT3 in Mausleber-Mitochondrien genauer untersucht. Dazu wurden Mitochondrien vor der Zugabe von radioaktiv markiertem ANT3 entweder mit NADH energetisiert, um ein Membranpotential $\Delta\Psi$ aufzubauen, oder es wurde das Membranpotential durch Zugabe von Valinomycin/ K^+ und CCCP zerstört. Nach dem Import wurde eine Hälfte des Ansatzes unbehandelt gelassen, die andere wurde mit PK inkubiert. Wurde ANT3 in Anwesenheit eines Membranpotentials importiert, konnte nach Behandlung mit PK importierter ANT3 in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Ohne Membranpotential war der Import von ANT3 nur sehr ineffizient (Abb. 21).

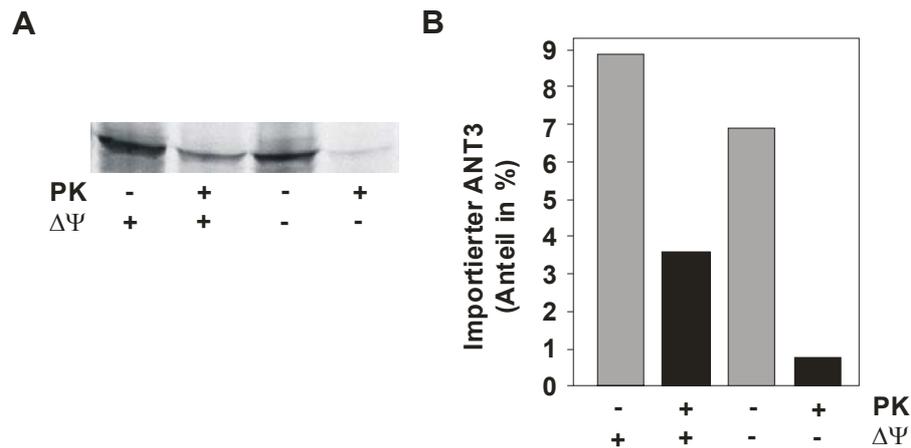


Abb. 21 Import des humanen Adenin-Nukleotid-Transporters (ANT3) ist abhängig von der Anwesenheit des Membranpotentials. (A) Der humane ANT3 wurde in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber importiert. Dabei wurde entweder durch Zugabe von NADH ein Membranpotential aufgebaut oder durch Zugabe von CCCP und Valinomycin/ K^+ das Membranpotential abgebaut. Die Mitochondrien wurden mit *in vitro* synthetisiertem ^{35}S -markiertem Vorstufenprotein 15 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurde die Hälfte des Ansatzes unbehandelt gelassen, die andere Hälfte wurde mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) inkubiert. Die Mitochondrien wurden sedimentiert durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Autoradiographie analysiert. (B) Die Effizienz des Imports von ANT3 mit und ohne Membranpotential aus A wurde durch Densitometrie quantifiziert.

3.5.3 ANT3 wird in die mitochondriale Innenmembran inseriert

In der Hefe ist der Import des ADP/ATP-Carriers (AAC) gut untersucht. Der Import dieses Proteins und die anschließende Insertion in die mitochondriale Innenmembran lässt sich durch die Bildung eines charakteristischen Fragmentes nach Behandlung mit PK an Mitoplasten verfolgen. Ob dies auch für den ANT3 zutrifft, wurde in einem vergleichenden Importexperiment untersucht. Dazu wurde ANT3 oder AAC in Anwesenheit eines Membranpotentials $\Delta\Psi$ in Mitochondrien aus Mausleber importiert. Nach dem Import wurde ein Drittel des Ansatzes unbehandelt gelassen, ein Drittel wurde mit PK inkubiert. Bei einem weiteren Drittel wurde die äußere Membran durch Behandlung mit Digitonin geöffnet und dann mit PK inkubiert. Sowohl ANT3 als auch AAC waren in Mitoplasten resistent gegen Proteasebehandlung, das heißt beide Proteine wurden in die Innenmembran inseriert. Die Membraninsertion des AAC lässt sich durch die Bildung eines proteaseresistenten Fragmentes verfolgen, das um etwa 1 kDa kleiner ist als das Vorstufenprotein (Kerscher et al., 1997; Kubrich et al., 1998; Sirrenberg et al., 1996) (Abb. 22A). Dieses Fragment wurde nach PK-Behandlung des importierten ANT3 nicht generiert. Dies liegt vermutlich daran, dass die hydrophilen Bereiche an N- und C-Terminus des ANT3 im Vergleich zum AAC kürzer sind und keine Schnittstellen für die Protease enthalten.

Zur Untersuchung der Membraninsertion des humanen ANT3 wurde ein weiterer Test durchgeführt. Hierzu wurde humaner ANT3 in frisch präparierte Mitochondrien aus

Mausleber in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Membranpotentials importiert. Anschließend wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt. Nach Import in Anwesenheit eines Membranpotentials war der größte Teil des ANT3 im Membranpellet erhalten. Dies bestätigt, dass der Carrier in die Membran inseriert wurde. Erfolgte der Import in Abwesenheit eines starken Membranpotentials, lag der größte Teil des ANT3 im Überstand vor, der Anteil des inserierten Carriers war wesentlich geringer. Die Membraninsertion des ANT3 erfolgt also in Abhängigkeit von einem Membranpotential (Abb. 22B).

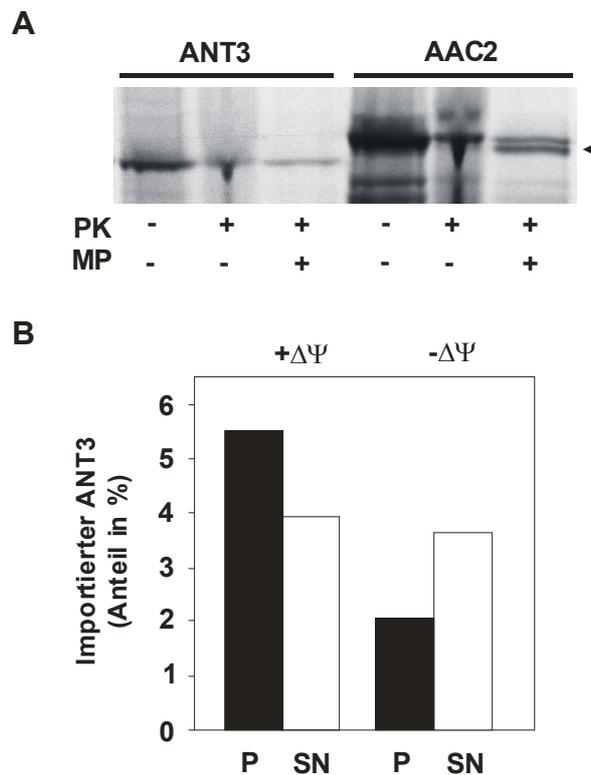


Abb. 22 ANT3 wird in die innere Mitochondrienmembran inseriert (A) ANT3 und AAC wurden in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber importiert. Dabei wurde durch Zugabe von NADH ein Membranpotential aufgebaut. Die Mitochondrien wurden mit den *in vitro* synthetisierten [³⁵S]-markierten Vorstufenproteinen 15 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurde ein Drittel des Ansatzes unbehandelt gelassen, ein Drittel wurde mit 200 µg/ml Proteinase K (PK) inkubiert und ein Drittel wurde vor der PK-Behandlung mit 0,1 % Digitonin behandelt, um Mitoplasten (MP) zu erzeugen. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie analysiert. **(B)** ANT3 wurde in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber importiert. Dabei wurde entweder durch Zugabe von NADH ein Membranpotential aufgebaut oder durch Zugabe von CCCP und Valinomycin/K⁺ das Membranpotential abgebaut. Nach dem Import wurden die Mitochondrien reisoliert und in 100 mM Na₂CO₃ 30 min auf Eis extrahiert. Membranen wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g pelletiert. Proteine aus dem Überstand wurden mit TCA gefällt. Die gefällten Überstände (*Ü*) und die Pellets (*P*) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie und Densitometrie analysiert.

3.5.4 Stufe III-Translokationsintermediate des ANT3 interagieren mit Tim9 und Tim10a

Um die Rolle der kleinen Tim-Proteine beim Import von Carrier-Molekülen zu untersuchen, wurde geprüft, ob sie in Kontakt zu Stufe III-Translokationsintermediaten (s. a. Abb. 2) stehen. Dazu wurden Mitochondrien aus Mausleber isoliert, das Membranpotential durch Zugabe von Valinomycin/ K^+ und CCCP zerstört und radioaktiv markierter ANT3 importiert. Anschließend wurde eine chemische Quervernetzung mit m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) durchgeführt. Nach Lyse der Mitochondrien wurde der lösliche Extrakt mit Antikörpern gegen Tim10a inkubiert, um eventuelle Quervernetzungsprodukte zu kleinen Tim-Proteinen zu präzipitieren. Es wurde ein spezifisches radioaktives Addukt von etwa 40 kDa erhalten (Abb. 23A). Diese Größe entspricht einem ANT3 plus einem Tim10a. Dieses Addukt wurde nicht beobachtet, wenn zur Immunfällung Präimmenserum eingesetzt wurde. Das spezifische Addukt von etwa 40 kDa wurde auch nach Quervernetzung mit Dithio-bis-succinimidylpropionat (DSP) erhalten, bzw. auch wenn mit Antikörpern gegen Tim9 gefällt wurde. Es wies in beiden Fällen die gleiche Größe auf (Abb. 23B). Dies zeigt, dass Tim9 und Tim10a mit dem ANT3 während seines Imports interagieren. Nach Immunfällung mit dem Antikörper gegen Tim10a wurden zusätzliche Quervernetzungsprodukte mit höherem Molekulargewicht erhalten. Diese könnten durch die oligomere Organisation der kleinen Tim Proteine entstehen.

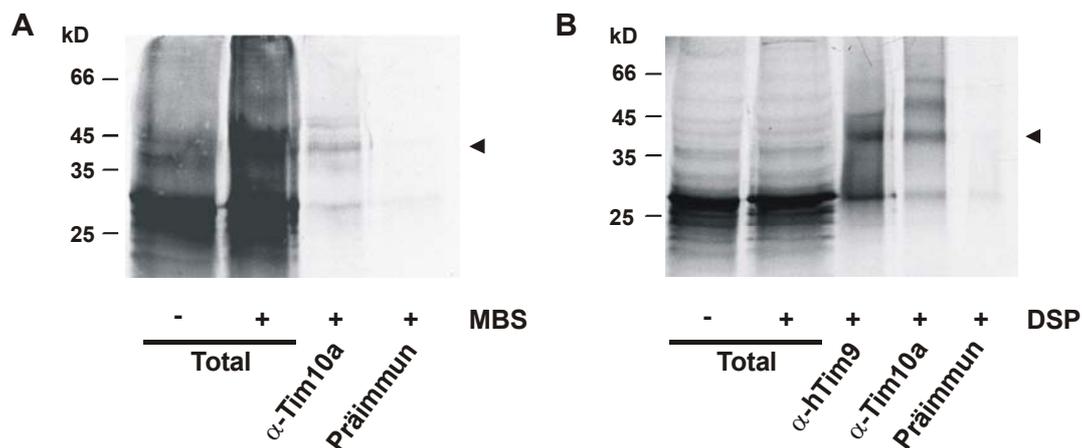


Abb. 23 Interaktion von Tim9 und Tim10a mit Translokationsintermediaten des ANT3. (A) ANT3 wurde in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber importiert. Dabei wurde durch Zugabe von Valinomycin/ K^+ und CCCP das Membranpotential abgebaut. Die Mitochondrien wurden mit dem *in vitro* synthetisierten ^{35}S -markierten Vorstufenprotein 15 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Import wurde eine chemische Quervernetzung mit m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) durchgeführt. Die Mitochondrien wurden lysiert und aus dem löslichen Extrakt wurde mit Antikörper gegen Tim10a oder mit Präimmenserum immunpräzipitiert. (B) Der Import wurde wie unter A durchgeführt. Die chemische Quervernetzung erfolgte mit Dithio-bis-succinimidylpropionat (DSP). Die Mitochondrien wurden lysiert und aus dem löslichen Extrakt wurde mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a oder mit Präimmenserum immunpräzipitiert. Die Mitochondrien wurden sedimentiert durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie analysiert.

In der Hefe ist die Interaktion von Tim10 und Tim12 mit AAC Vorstufenproteinen während des Imports von der Anwesenheit zweiwertiger Metall-Ionen abhängig (Sirrenberg et al., 1998). Es wurde getestet, ob die Anwesenheit von Metall-Ionen auch für den Import der humanen Carrier-Proteine erforderlich ist. Dazu wurden Mitochondrien aus Mausleber in Abwesenheit eines Membranpotentials mit EDTA und o-Phenanthrolin (o-phe) vorinkubiert oder unbehandelt gelassen. Radioaktiv markierter ANT3 wurde importiert. Nach dem Import wurde eine chemische Quervernetzung mit DSP durchgeführt. Nach Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen Tim9 fand sich das spezifische Quervernetzungsaddukt von etwa 40 kDa nur dann, wenn während des Imports zweiwertige Metall-Ionen anwesend waren. In dem mit Chelatoren behandelten Ansatz konnte das Quervernetzungsprodukt von ANT3 und Tim9 nicht erhalten werden. Ebenso trat dieses Produkt nicht auf, wenn der Import in Abwesenheit eines Membranpotentials durchgeführt wurde (Abb. 24).

Hiermit wurde gezeigt, dass Tim9 und Tim10a eine Rolle beim Import von ANT3 spielen. Für die Interaktion der humanen Tim9-10a- und Tim9-10a-10b-Komplexe mit ANT3 auf Stufe III ist sowohl ein Membranpotential als auch die Anwesenheit von zweiwertigen Metall-Ionen erforderlich.

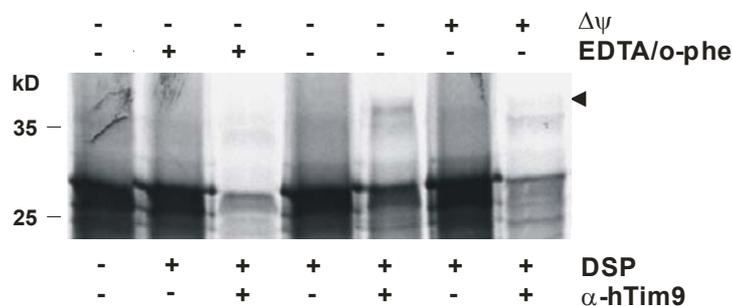


Abb. 24 Interaktion von kleinen Tim-Proteinen mit Translokationsintermediaten des ANT3 ist abhängig von Metallionen. ANT3 wurde in frisch isolierte Mitochondrien aus Mausleber importiert. Dabei wurden die Mitochondrien vor dem Import mit 10 mM EDTA und 2 mM o-Phenanthrolin eine Stunde auf Eis vorbehandelt oder unbehandelt gelassen und dann wurde durch Zugabe von Valinomycin/K⁺ und CCCP das Membranpotential abgebaut oder durch Zugabe von NADH ein Membranpotential generiert. Die Mitochondrien wurden mit dem *in vitro* synthetisierten ³⁵S-markierten Vorstufenprotein 15 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Import wurde eine chemische Quervernetzung mit Dithio-bis-succinimidylpropionat (DSP) durchgeführt. Die Mitochondrien wurden lysiert und aus dem löslichen Extrakt wurde mit Antikörper gegen Tim9 oder mit Präimmunsereum immunpräzipitiert. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie analysiert.

3.6 Identifizierung des humanen Cmi1

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Laboren Proteomanalysen der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt, bei denen noch uncharakterisierte essentielle mitochondriale Proteine identifiziert wurden. Diese Studien beschrieben unter anderem ein neues mitochondriales Protein, YKL195w, mit einer möglichen Funktion im Proteinimport (Hazbun et al., 2003; Sickmann et al., 2003). YKL195w besitzt eine N-terminale Signalsequenz und enthält sechs konservierte Cysteinreste. Damit stellt es ein putatives mitochondriales Metalloprotein dar. Die Herunterregulation der Expression des YKL195w Proteins in der Hefe führt zu einer deutlichen Erniedrigung der Proteinmengen von Zink- oder Kupfer-bindenden Proteinen des Intermembranraumes, wie den kleinen Tim Proteinen - oder Cox17 (Dr. Kai Hell, persönliche Mitteilung). Das Protein könnte demnach eine Rolle bei der Biogenese dieser Intermembranraumkomponenten spielen, möglicherweise als Metall-Transfer-Protein.

Homologe des YKL195w werden in allen einfachen und höheren Eukaryonten gefunden. Allen gemeinsam ist ein Motiv bestehend aus sechs Cysteinen, die in der charakteristischen Abfolge CPC-CX₉C-CX₉C (Cys₆-Motiv) angeordnet sind (Abb. 25). Dieses Motiv weist Ähnlichkeit zu einem bereits klassifizierten Motiv, dem sogenannten CHCH-Motiv (coiled coil - helix - coiled coil - helix) auf, in dem jede der zwei Helices zwei Cysteine in einer CX₉C-Abfolge enthält. Das CHCH-Motiv tritt in einer nicht näher charakterisierten Proteinfamilie auf, zu der unter anderem die mitochondrialen Proteine Cox17, Cox19, Mrp10 und die 19 kDa Untereinheit der NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase (NDUFA8) gehören.

Die identifizierten YKL195w-Homologe sind nur im Bereich um die konservierten Cysteine ähnlich. Vor allem die N-terminalen Domänen der jeweiligen Proteine unterscheiden sich beträchtlich. So enthält YKL195w mit Abstand den längsten N-Terminus und besitzt als einziges unter den Homologen eine putative Transmembrandomäne. Eine absplaltbare Präsequenz wird sowohl für YKL195w als auch für die homologen Proteine aus *S. pombe*, *N. crassa* und *C. albicans* vorhergesagt, nicht aber für alle anderen YKL195w-Homologe (Abb. 25).

Ergebnisse

Hs	-----		
Mm	-----		
Rn	-----		
Dm	-----		
Nc	-----		
Sp	-----		
Sc	MLKLWNTNYQLVVGSIQRVYIIISKMLRNLVVRNACRNRPSIQVARGLCRHQTRRLMASSPQ ^u GRNSNQEKTAGFIMGILSMAGALYFIAPNRKPLFASRK	100	
Ce1	-----		
Ce2	-----		
Ce3	-----		
Ce4	-----		

Hs	-----		
Mm	-----		
Rn	-----		
Dm	-----		
Nc	-----MYRTALRPSQSALRAIRSTTSPSALVSSG-ARRFASTTSA ^u PKKSTWKGAAVRWGLAVAAVYYNTSP ^u IFSD ^u DEL ^u PETA	77	
Sp	-----MFAKNLLFRFPKCI ^u RINGYNNMRRSLLQRNGFQAGIC ^u RKFGTATKT ^u DVWKG ^u RF ^u LPIVSG ^u VAAASLTAGYLLGKNTSNASSSQDN	84	
Sc	VESDKTAAEELSSGGEGSPENEDDNNKSDE-NGDDNDSKND ^u TEAGPQLG-GDKIGASKVAEDGELV ^u VLAEDNK ^u SS ^u EDK ^u DTDESKV ^u TKDDEQSNEDN	198	
Ce1	-----		
Ce2	-----		
Ce3	-----		
Ce4	-----		

Hs	-----	MSYCRQEGKDR ^u IFVTKEDHET ^u PSAELVADD	32
Mm	-----	MSYCRQEGKDR ^u IFVTKEDHET ^u PSAELVADD	32
Rn	-----	MSYCRQEGKDR ^u IFVTKEDHET ^u PSAELVADD	32
Dm	-----	MSFSYCKEYCKDKV ^u IFVTKEDHAT ^u PS ^u TI ^u ELPP	32
Nc	GTAPSQLTD-ADLPTVDAIVEEKRRQAAEHAAARKAAQAAKAAATPATPSESVEEQITKAEAEAEAVPEGDSKPRSESTEGV ^u PEAGASPEA	169	
Sp	D--HPVVGEHVHTETQSYNEPYMQRHRIEDAIEK ^u KMTSETQ ^u PS ^u TDEKGRK ^u VSATENSAPK ^u TKD ^u KEKSSGETAGN ^u ILREQ ^u IATG ^u KDDDEYAR ^u KFEE	177	
Sc	ATANNQKDENISSENSEENTSDKTLDN ^u NAGSSEK ^u KDPE ^u HS ^u DEK ^u SQ ^u GG ^u SD ^u DK ^u TT ^u ED ^u DN ^u GE ^u ESS ^u SK ^u TV ^u SD ^u SENSAK ^u Q ^u SS ^u DEE ^u KEEL ^u RQ ^u E ^u K ^u Q ^u MG ^u P	298	
Ce1	-----	MQCHVKDEVLYIGKKEFEEP ^u IKSEWVLEM ^u QNT ^u EK ^u Y ^u K ^u TI	38
Ce2	-----	MTESINSKNSNDKQYVMGKEEFWD ^u DK ^u SYF ^u Q ^u LANT ^u PN ^u DVY	43
Ce3	-----	MASTKDEVVRMSVDEY ^u WEDI ^u KDDY ^u L ^u QLANT ^u DPNEVY	37
Ce4	-----	MSKDEILKLGREEFFKSVKMEYR ^u PYFE	27

Hs	PNDP ^u YEEHGLILFN-GDINWNC ^u CL--GGMASGFC ^u GEQFKSAFSC ^u TH-YSTEEIKGSD ^u CVDFRAMQEC ^u MOKY ^u PDLYPQ ^u DEDEEEEREK ^u PAEQAEETA	128	
Mm	PNDP ^u YEEHGLILFN-GDINWNC ^u CL--GGMASGFC ^u GEQFKSAFSC ^u TH-YSTEDIKGS ^u DCIDQFRAMQEC ^u MOKY ^u PDLYPQ ^u DEDEEEEREK ^u PAEQAEETA	125	
Rn	PNDP ^u YEEHGLILFN-GDINWNC ^u CL--GGMASGFC ^u GEQFKSAFSC ^u TH-YSTEDIKGS ^u DCIDQFRAMQEC ^u MOKY ^u PDLYPQ ^u DEDEEEEREK ^u PAEQAEETA	125	
Dm	---BEKPEGVIT ^u TKD-GKINWNC ^u CL--GGMATGFC ^u GVDFREAFSC ^u EQ-NSTADPKGSD ^u CYDAFTKMRDC ^u CFQKYPTV ^u MNKS ^u GGDDDDDLG ^u SEAL ^u DTD ^u DAGS	125	
Nc	LQEEADAQAFN ^u ETGEINWDC ^u CL--GGMAHGF ^u CGE ^u F ^u AA ^u AFSC ^u TV-YSTEEPKGM ^u CELEK ^u SH ^u MOD ^u CFRKY ^u PEVY ^u GAE ^u LAD ^u DE ^u AERASA ^u APAA	263	
Sp	VEEESSESAFN ^u PTGEINWDC ^u CL--GGMAHGF ^u CGE ^u F ^u AA ^u AFSC ^u TV-YSKSEPKGM ^u CELEK ^u QAMQ ^u CF ^u KH ^u HELY ^u QDMVGESE ^u DE ^u DAETNEK ^u PST ^u SD	274	
Sc	TEEEVQHECA ^u YN ^u PTGEINWDC ^u CL--GGMAHGF ^u CGE ^u F ^u AA ^u AFSC ^u TV-YSEAE ^u PKG ^u IT ^u CV ^u EKE ^u QHM ^u OD ^u CFRKY ^u PEH ^u MAEQ ^u LKETS ^u D-DEEPQDKV ^u KV ^u NI	394	
Ce1	-----CPTFPD-GTINWNC ^u CL--GGMASGFC ^u SLVAHRC ^u GNF ^u FRELYIC ^u MK-SDDTRDPSEK ^u CPN ^u QV ^u NWAA ^u CMQ ^u NMS ^u DERRE ^u QMRK ^u AMT ^u V ^u DEELK ^u INPK	125	
Ce2	---EDNPPPENPD-GTVNFC ^u HC ^u V--GHLVASE ^u CSYEFREAIT ^u CO ^u KTS ^u DEEMENGAC ^u GEQLMAFME ^u CAMRTQCFK ^u TNDS ^u ND ^u EKSAEK	126	
Ce3	---ESNPPPTTAD-GQINFEC ^u HC ^u V--GHLVGS ^u CGFEFREA ^u IT ^u CO ^u KTNSDGEIE ^u QGA ^u CGKELMS ^u FME ^u CVTRTQCFGT ^u GDND ^u DKK	115	
Ce4	---PYETPESVY ^u PD-GSINID ^u CH ^u CL--HSALAHRC ^u CYLIRD ^u ALV ^u CHN-ASKTT ^u FR ^u EL ^u CEKEFVAHAIC ^u TTEEANNKS	97	

Hs	PIEATATKEEEGSS-----	142	16 kDa
Mm	DTKVSAAKEQGTSS-----	139	16 kDa
Rn	DTKASAAKEQGASS-----	139	16 kDa
Dm	VGGQNADPLADVGNNGGDD-ELVSPNSSSVVFKA-----	158	17 kDa
Nc	EGTPAKEEPVENKKEEALEPATHDATAANNKQKQ-----	298	32 kDa
Sp	ENNQPQSPPSDNASNPEEDVMNMEKEIVNLT ^u PMSV ^u IK ^u EI	313	35 kDa
Sc	ESAPNVSSAKENAAKAEQ-SDVKKEPLNEESKP-----	427	47 kDa
Ce1	-----		14 kDa
Ce2	-----		14 kDa
Ce3	-----		13 kDa
Ce4	-----		11 kDa

Abb. 25 Vergleich von zu YKL195w homologen Proteinsequenzen aus verschiedenen Spezies. Identische Aminosäuren sind in schwarz, ähnliche in grau eingerahmt. Die für das YKL195w vorhergesagte Transmembrandomäne ist unterstrichen. Die für die Proteine aus den Pilzen vorhergesagten Schnittstellen, an denen die Präsequenz abgespalten wird, sind fett unterstrichen. Hinter den Sequenzen sind die vorhergesagten Molekulargewichte der Proteine angegeben. Die Bezeichnungen der Spezies wurden folgendermaßen abgekürzt: Hs, *H. sapiens*; Mm, *M. musculus*; Rn, *R. norvegicus*; Dm, *D. melanogaster*; Nc, *N. crassa*; Sp, *S. pombe*; Sc, *S. cerevisiae*; Ce, *C. elegans*.

In humanen Datenbanken wurden insgesamt 100 ESTs mit Ähnlichkeit zu YKL195w identifiziert. Die genauere Analyse der ESTs zeigte, dass sie zwei verschiedenen Transkriptvarianten zugeordnet werden können (BC17082 und AK056271), die sehr wahrscheinlich durch unterschiedliches Spleißen entstehen. Sie kodieren für Proteine, die beide das Motiv aus sechs Cysteinen enthalten und sich nur in ihren äußeren N-Termini unterscheiden. Allerdings weist nur der von der cDNA BC17082 kodierte N-Terminus eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden Sequenzen aus Maus und Ratte auf. Darüber hinaus wird nur die cDNA BC17082 durch die Mehrzahl der ESTs in den Datenbanken beschrieben, während nur sehr wenige ESTs mit der cDNA AK056271, die für das in der Datenbank als FLJ31709 beschriebene Protein kodiert, übereinstimmen. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit stellt also das von der cDNA BC17082 kodierte Protein das menschliche YKL195w-Homolog dar. Aufgrund der Homologie zu YKL195w wurde das menschliche Protein von uns als Cmi1 (Chaperone for Metalloproteins of the Intermembrane space) bezeichnet (Abb. 26). Die Sequenzhomologie des menschlichen Proteins liegt zwischen 35 % Ähnlichkeit zu dem Protein aus Hefe und 85 % zu den Proteinen aus Maus und Ratte. Im Bereich um die konservierten Cysteine ist die Homologie wesentlich höher, sie liegt hier zwischen 65 % zu dem Protein aus *D. melanogaster* und 95 % zu den Proteinen aus Maus und Ratte. In *C. elegans* wurden vier Sequenzen identifiziert, die das Motiv aus sechs Cysteinen aufweisen. Die Proteine sind im Vergleich zu den Homologen aus den anderen Spezies alle etwas verkürzt und zeigen eine geringere Sequenzhomologie, auch im Bereich um die sechs Cysteine. Es ist daher unklar, ob es sich bei alle vier Proteinen um YKL195w-Homologe handelt.

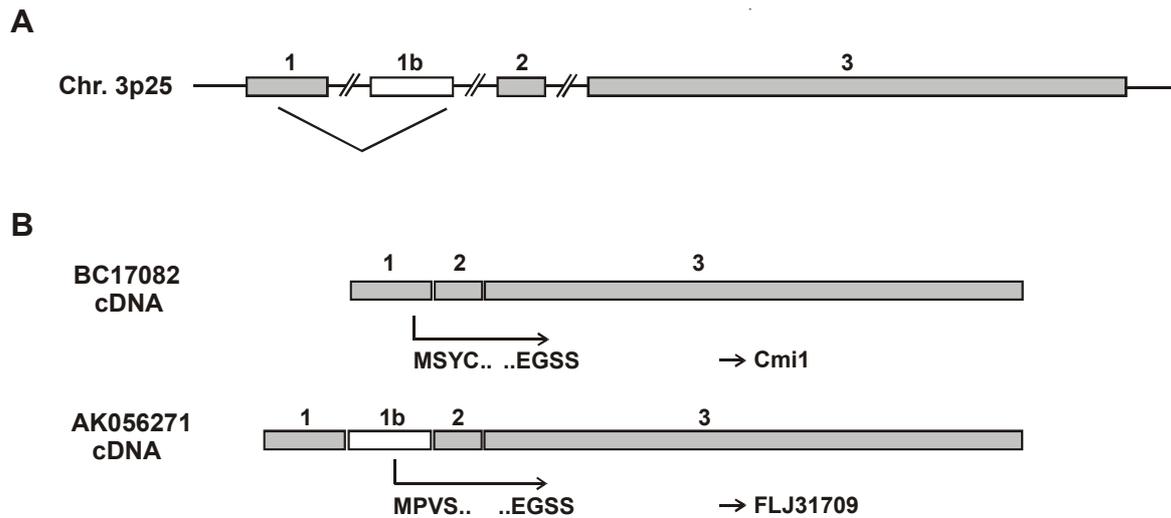


Abb. 26 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Spleißereignisse, die zur Entstehung der Proteine Cmi1 und FLJ31709 führen. (A) Das *Cmi1*-Gen liegt auf dem Chromosom 3p25 und enthält drei Exons. **(B)** Das Startcodon für Cmi1 liegt in Exon1 (*oben*). Im Falle eines fehlerhaften Spleißens innerhalb des Intron1 kommt es durch die Existenz eines weiteren Startcodons im Bereich 1b zur Expression eines zweiten Proteins (FLJ31709), das sich nur im N-Terminus von Cmi1 unterscheidet (*unten*). Beide Proteine enthalten das Cys₆-Motiv.

3.6.1 Das humane Cmi1 ist ein lösliches Protein des mitochondrialen Intermembranraumes

Das humane Cmi1 Protein hat, im Gegensatz zu seinem Homolog aus der Hefe, keine abspaltbare N-terminale Präsequenz. Es war daher unklar, ob es sich bei dem humanen Protein ebenfalls um ein mitochondriales Protein handelt. Zur Analyse der intrazellulären Verteilung des Cmi1 wurden subzelluläre Fraktionen von Mausleber-Zellen auf einem Immunoblot analysiert. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen das gesamte Cmi1 gerichtet ist, erkannte spezifisch ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa. Dieses Protein kolokalisiert mit dem mitochondrialen Markerprotein Tim23 in der mitochondrialen Fraktion; beide Proteine sind aber weder in der zytosolischen noch in der mikrosomalen Fraktion detektierbar (Abb. 27A). Zur Analyse der intramitochondrialen Lokalisation wurden die Mitochondrien mit 0,1 % Digitonin behandelt, um die äußere Membran selektiv zu öffnen, und durch Zentrifugation aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen wurde Cmi1, zusammen mit dem löslichen Intermembranraumprotein DDP1, vollständig in den Überstand freigesetzt, während Tim23 und Tim44 im Pellet nachgewiesen wurden (Abb. 27B). Humanes Cmi1 ist also ein lösliches Protein des mitochondrialen Intermembranraums.

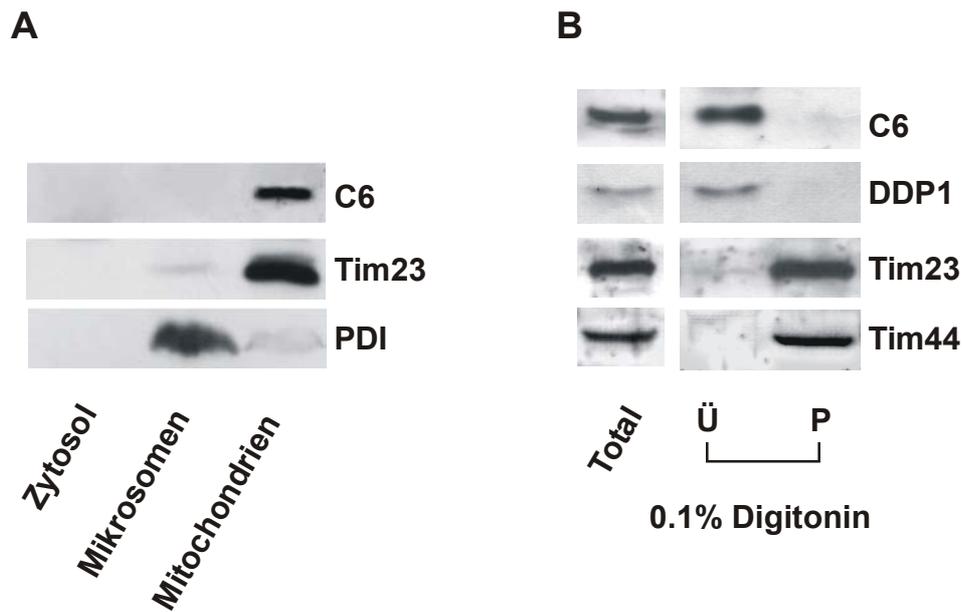


Abb. 27 Cmi1 ist ein lösliches mitochondriales Intermembranraumprotein. (A) Subzelluläre Lokalisation. Ein Zellhomogenat aus Mausleber-Zellen wurde durch Differentialzentrifugation in eine zytosolische, eine mikrosomale und eine mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Gleiche Proteinmengen dieser Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit einem Antikörper gegen Cmi1 dekoriert. Als Kontrolle für die mitochondriale und mikrosomale Fraktion wurden Antikörper gegen hTim23 und PDI verwendet. **(B)** Submitochondriale Lokalisation. Die äußere Membran von Mitochondrien aus Mausleber-Zellen (50 µg) wurde mit 0,1 % Digitonin selektiv geöffnet. Das Membranpellet wurde durch Ultrazentrifugation bei 30.000 rpm (TLA100) von den löslichen Bestandteilen abgetrennt. Proteine aus dem Überstand wurden mit TCA gefällt. Mitochondrien (total), die gefällten Überstände (Ü) und die Pellets (P) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Cmi1, DDP1, hTim23 und Tim44 analysiert.

3.6.2 Cmi1 bindet Zink und Kupfer über die konservierten Cysteine

Die letzten vier Cysteine des Cmi1 sind in zwei CX_9C -Motiven angeordnet. Damit hat das Protein Ähnlichkeit zu zwei bereits charakterisierten mitochondrialen Metallochaperonen, die ebenfalls doppelte CX_9C -Motive aufweisen, Cox17 und Cox19. Beide sind im Zytosol und im Intermembranraum lokalisiert und an der Assemblierung der Cytochrom c Oxidase (COX) beteiligt. Cox17 bindet Kupfer über konservierte Cysteine. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu metallbindenden Proteinen ist es anzunehmen, dass das humane Cmi1 auch die Fähigkeit hat, über die konservierten Cysteine Metall-Ionen zu binden. Dabei könnte es sich um verschiedene Ionen wie z. B. Zn^{2+} oder Cu^{2+} handeln.

Die Fähigkeit zur Bindung von Zink oder Kupfer wurde an rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen getestet. Dazu wurde Cmi1 als Fusionsprotein zusammen mit Maltosebindungsprotein in *E. coli* exprimiert (MBP-Cmi1). Die Expression erfolgte unter

Zugabe von 500 μM Zinkacetat, 500 μM Kupfersulfat oder beiden Salzen. Die MBP-Fusionsproteine wurden über eine Amylose-Säule affinitätsgereinigt. Die Bestimmung des Metallgehaltes der gereinigten Proteine erfolgte mittels ICP-Analyse. Die Atomabsorption wurde auf den spezifischen Wellenlängen von 213,857 nm (Zn) und 327,395 nm (Cu) gemessen. Nach Expression von MBP-Cmi1 in Anwesenheit von Zn^{2+} ergab sich ein Verhältnis von durchschnittlich 1,48 mol Zn^{2+} pro mol Protein, während nur geringe Mengen von Kupfer gebunden waren (Abb. 28A *links*). Andersherum führte die Expression von MBP-Cmi1 in Anwesenheit von Cu^{2+} zur Bindung von Cu^{2+} in etwa dem gleichen Verhältnis (1,66 mol Cu^{2+} pro mol Protein), aber in diesem Fall wurde wenig Zn^{2+} gebunden (0,37 mol pro mol Protein) (Abb. 28A *rechts*). Unter gleichen Bedingungen enthielt MBP- α nur minimale Mengen von Zn^{2+} oder Cu^{2+} . Wurde MBP-Cmi1 in Anwesenheit von einem Gemisch beider Metall-Ionen exprimiert, so wurden Zn^{2+} und Cu^{2+} zu etwa gleichen Mengen inkorporiert (Abb. 28B). Es besteht also wahrscheinlich keine Präferenz für die Bindung des einen oder anderen Metalls. Wahrscheinlich werden beide Metall-Ionen an der gleichen Bindungsstelle gebunden. Wurde MBP-Cmi1 in nicht supplementiertem Medium (ohne $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$) exprimiert, lagen die inkorporierten Mengen an Metall unter 0,5 mol pro mol Protein.

Um zu testen, ob die Bindung der Metall-Ionen über die Cysteinreste erfolgt, wurden diese vor der Affinitätsreinigung mit NEM spezifisch modifiziert. Die Bindung von Zn^{2+} an NEM-behandeltem im Vergleich zu nicht-behandeltem MBP-Cmi1 war auf Hintergrundmengen reduziert. Damit wurde gezeigt, dass die Zinkbindung spezifisch durch die Cysteinreste vermittelt wird. Die Menge von gebundenem Kupfer war nach NEM-Behandlung ebenfalls vermindert (auf 0,54 im Vergleich zu 1,66 mol pro mol Protein), aber es wurden noch restliche Mengen nachgewiesen (Abb. 28A). Dies legt nahe, dass Cu^{2+} -Ionen von Cmi1 in geringem Umfang auch unspezifisch gebunden werden können, oder dass möglicherweise die Kupfer-Bindung über andere Aminosäuren als Cystein vermittelt wird.

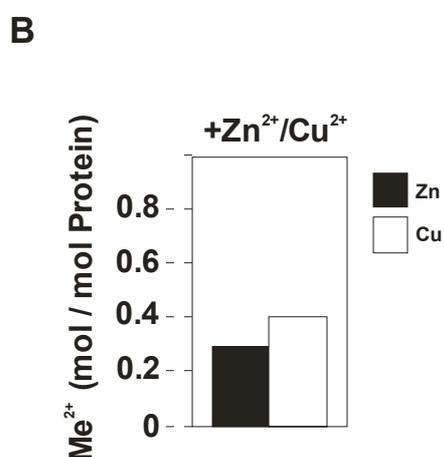
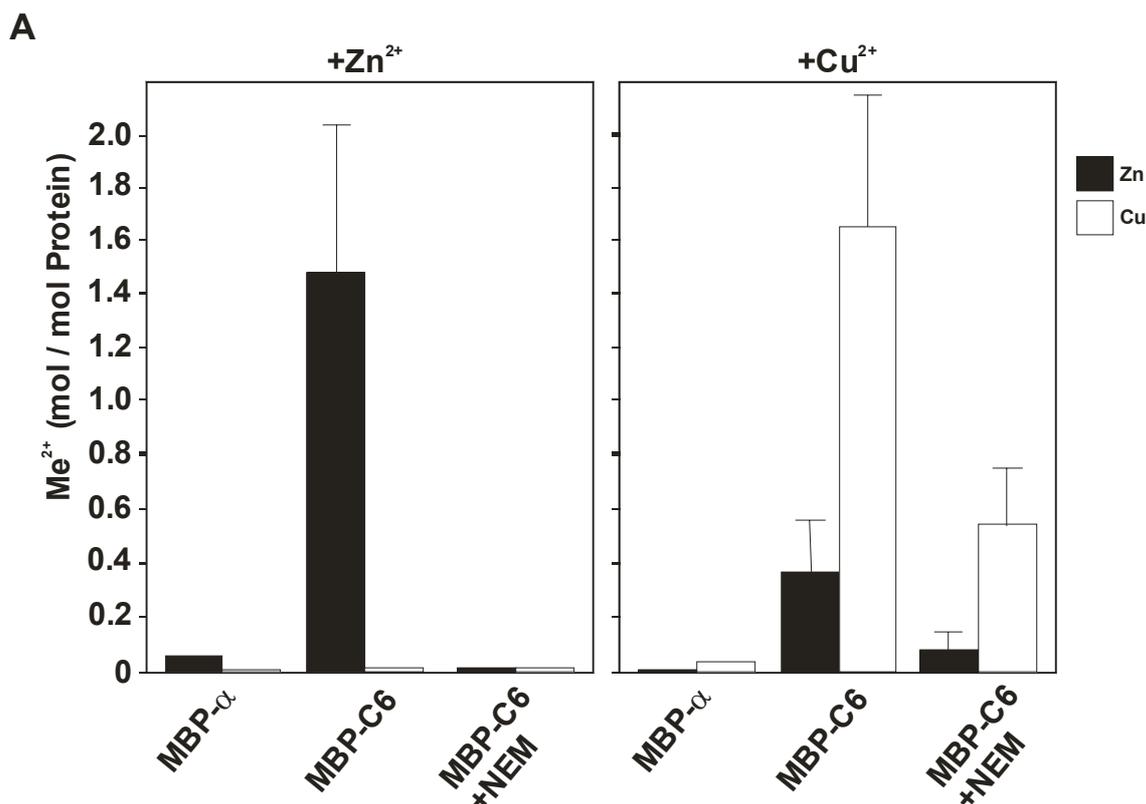


Abb. 28 Menge an gebundenen Zink- und Kupfer-Ionen in MBP-Cmi1. ICP-Analyse von MBP- α und MBP-Cmi1. (A) Die berechneten molaren Verhältnisse von Zn^{2+} zu MBP- α bzw. MBP-Cmi1 sind mit schwarzen Balken, von Cu^{2+} zu MBP- α bzw. MBP-Cmi1 mit weißen Balken dargestellt. Die Analysen erfolgten nach Expression der Proteine in Gegenwart von Zn^{2+} (links) oder Cu^{2+} (rechts). In Kontrollexperimenten mit modifizierten Cysteinresten wurde MBP-Cmi1 vor der Reinigung mit NEM behandelt. Die Werte für die Metallgehalte von MBP-Cmi1 nach Expression mit Zn^{2+} oder Cu^{2+} repräsentieren Durchschnittswerte von vier bzw. drei Einzelbestimmungen. Die Werte für die Metallgehalte von MBP-Cmi1 + NEM nach Expression mit Cu^{2+} repräsentieren den Durchschnittswert von zwei Einzelbestimmungen. (B) Die Analysen erfolgten nach Expression der Proteine in Gegenwart eines Gemisches von Zn^{2+} und Cu^{2+} .

Als nächstes sollte untersucht werden, welche der Cysteine an der Bindung von Metall-Ionen beteiligt sind. Dazu wurde jeweils ein Cysteinrest innerhalb des CPC und des doppelten CX₉C-Motivs durch einen Serinrest ersetzt (Cmi1^{C53S} und Cmi1^{C74S}). Nach Expression der mutierten Proteine in Anwesenheit von Zn^{2+} wurden bei beiden reduzierte, aber signifikante Mengen von gebundenen Zn^{2+} -Ionen nachgewiesen. Beide Proteine behielten also weiterhin

die Fähigkeit, geringe Mengen Ionen zu binden (Abb. 29). Die beiden hier untersuchten Cysteine C53 und C74 spielen also beide eine Rolle bei der Bindung von Metall-Ionen.

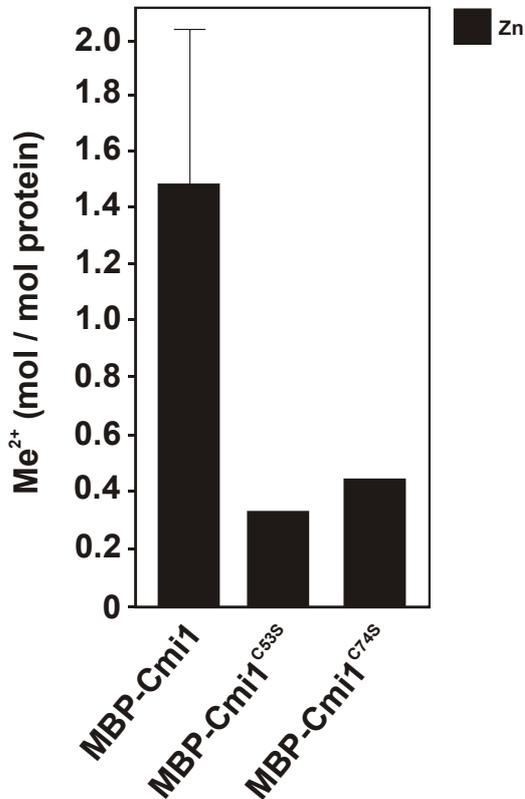


Abb. 29 ICP-Analyse von MBP-Cmi1 nach Austausch von zwei Cysteinresten. Jeweils das erste oder vierte Cystein (C53 bzw. C74) im Cmi1 wurde mit sequenzspezifischer Mutagenese durch Serin ersetzt. Die ICP-Analysen erfolgten nach Expression der MBP-Fusionsproteine in Gegenwart von Zn²⁺. Die berechneten molaren Verhältnisse von Zn²⁺ zu MBP-Cmi1 sind mit schwarzen Balken dargestellt. Der Austausch des ersten oder vierten Cysteins im Cmi1 führt zu einer Reduktion der Zinkbindung im Vergleich zu unmutiertem Cmi1.

3.6.3 Cmi1 assembliert zu homo-oligomeren Komplexen

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass es sich bei Cmi1 um ein metallbindendes, lösliches Intermembranraumprotein handelt. Von anderen Metallochaperonen im Intermembranraum wie Cox17 oder den kleinen Tim Proteinen ist bekannt, dass sie in höhermolekularen Komplexen vorliegen (Heaton et al., 2001; Rothbauer et al., 2001). Um die strukturelle Organisation des Cmi1 Proteins im Intermembranraum zu untersuchen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Dazu wurden Mausleber-Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und auf einer Superose12-Säule aufgetrennt. Cmi1 eluierte von der Säule in Fraktionen, die einem apparenten Molekulargewicht von etwa 60-70 kDa entsprachen (Abb. 30). Diese Größe entspräche einem trimeren Komplex aus drei Cmi1-Einheiten. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass andere Proteine außer Cmi1 zu diesem Komplex beitragen. Um dies weiter zu untersuchen, wurde rekombinant exprimiertes, gereinigtes MBP-Cmi1 partiell mit Faktor Xa geschnitten

und über Gelfiltration analysiert. Die Schnittstelle für Faktor Xa liegt direkt hinter der MBP-Domäne, so dass bei erfolgter Spaltung MBP und Cmi1 entstehen. Die Elutionen der Gelfiltrationssäule wurden mit Antikörpern gegen Cmi1 und MBP analysiert. Reste an ungeschnittenem MBP-Cmi1 eluierten in Fraktionen, die einer Größe eines MBP-Cmi1-Trimers (175 kDa) entsprachen, Cmi1 konnte in Fraktionen entsprechend einem Cmi1-Trimer (48 kDa) nachgewiesen werden. Dagegen eluierte MBP nur bei der Größe des MBP-Monomers (42 kDa) (Abb. 30). Da Cmi1 als rekombinant exprimiertes, gereinigtes Protein zu einer ähnlichen Komplexgröße assembliert, wie es für das endogene Cmi1 auch in Mitochondrien nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass der funktionelle Cmi1-Komplex ein Homo-Trimer ist.

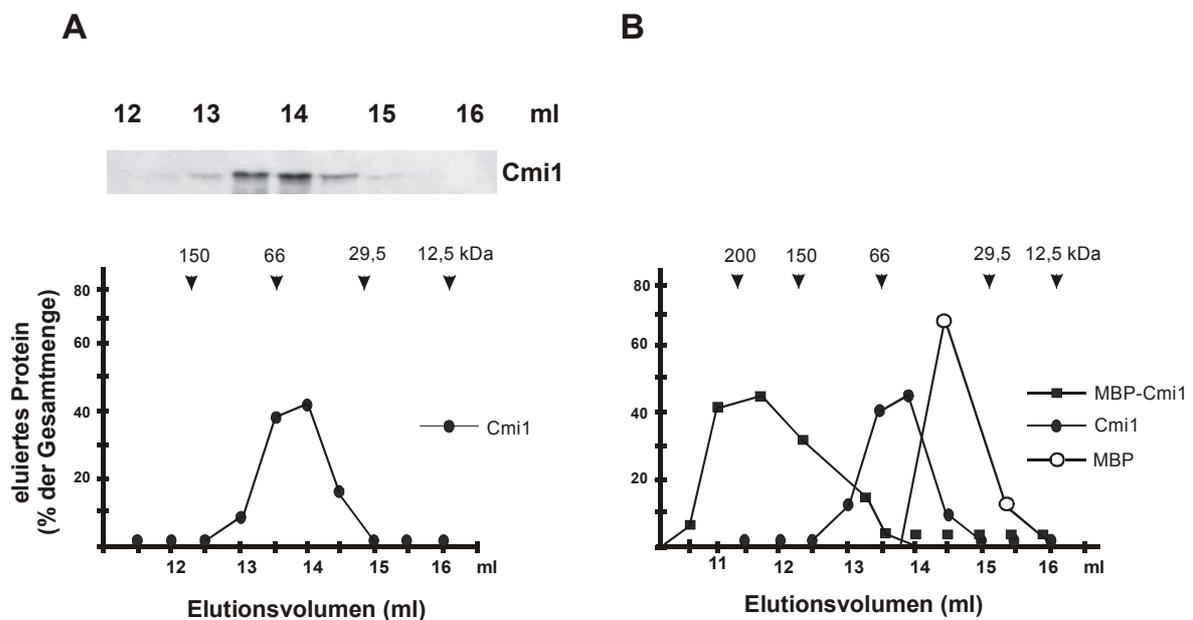


Abb. 30 Bestimmung des Molekulargewichts von Cmi1. (A) Isolierte Mitochondrien aus Mausleber wurden in 0,5 % Digitonin 30 min auf Eis solubilisiert und die löslichen Extrakte auf einer Superose12-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Proteine aus den Elutionsfraktionen wurden mit TCA gefällt, mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit einem Antikörper gegen Cmi1 analysiert (*oben*). Die Signalintensitäten wurden mit Densitometrie quantifiziert (*unten*). (B) MBP-Cmi1 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert, über eine Amylose-Säule gereinigt und mit Faktor Xa geschnitten. Die resultierenden Proteine (MBP, Cmi1 und ungeschnittenes MBP-Cmi1) wurden auf einer Superose12-Säule aufgetrennt. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen MBP und Cmi1 analysiert und die Signalintensitäten mit Densitometrie quantifiziert. Die Elutionen der als Größenstandard verwendeten Proteine (β -Amylase 200 kDa, Alkoholdehydrogenase 150 kDa, Rinderserumalbumin 66 kDa, Carboanhydrase 29,5 kDa und Cytochrom c 12,5 kDa) sind angegeben.

3.6.4 Cmi1 spielt eine Rolle bei der Biogenese der kleinen Tim-Proteine

Für die effiziente Biogenese der kleinen Tim-Proteine ist die Verfügbarkeit von Zn^{2+} -Ionen im Intermembranraum wichtig (Lutz et al., 2003). Es wird angenommen, dass ihre Faltung im Intermembranraum durch die Inkorporation von Zn^{2+} ermöglicht wird. Bisher wurde noch kein Intermembranraumprotein identifiziert, das während des Imports der kleinen Tim-Proteine eine Rolle bei der Vermittlung von Zn^{2+} -Ionen spielen könnte. Da das Cmi1 Protein ein metallbindendes Protein im Intermembranraum ist, sollte festgestellt werden, ob die Anwesenheit von Cmi1 einen Einfluss auf die Biogenese der kleinen Tim-Proteine hat. Hierzu wurden die menschlichen kleinen Tim-Proteine in der Hefe entweder einzeln oder zusammen mit Cmi1 heterolog exprimiert und die Protein-'*steady-state*'-Mengen analysiert. Die Bestimmung wurde exemplarisch für Tim9, Tim10b und DDP1 durchgeführt. Wurden diese drei Proteine einzeln in der Hefe exprimiert, so waren nur geringe Proteinmengen in den Mitochondrien der Hefe detektierbar. Bei Koexpression mit Cmi1 waren die Proteinmengen von Tim9, Tim10b und DDP1 um das 6-10fache erhöht (Abb. 31 A bis C). Die Anwesenheit von erhöhten Mengen Cmi1 im mitochondrialen Intermembranraum ermöglicht also eine stabile Expression von größeren Mengen der kleinen Tim-Proteine. Dies legt nahe, dass Cmi1 eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von kleinen Tim-Proteinen im Intermembranraum hat.

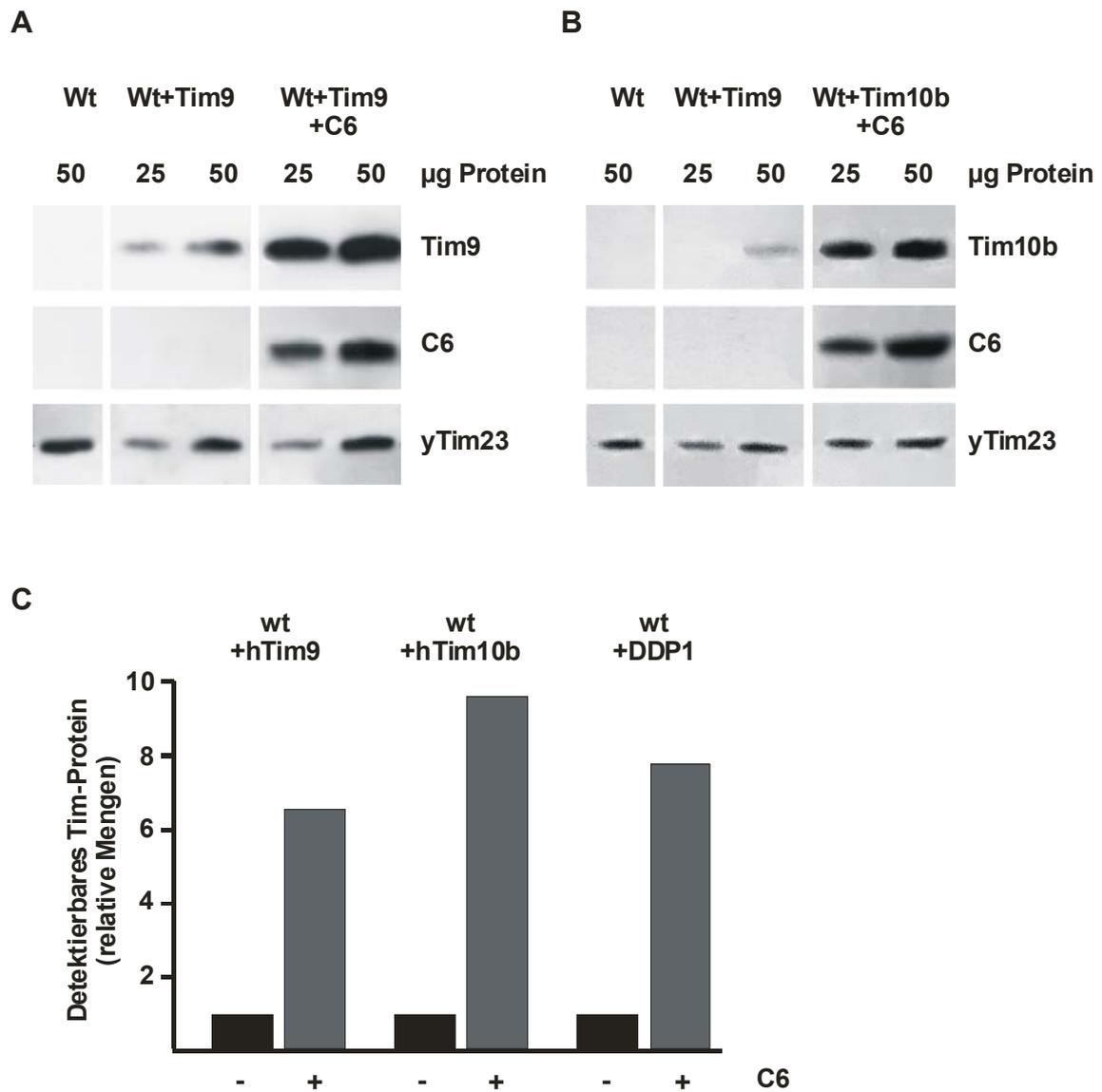


Abb. 31 Einfluss von Cmi1 auf die Biogenese der kleinen Tim-Proteine. Tim9, Tim10b und DDP1 wurden in Hefe einzeln oder zusammen mit Cmi1 exprimiert. Verschiedene Mengen Zellextrakte wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Tim9 (A) bzw. Tim10b (B), Cmi1 und zur Kontrolle der Proteinmengen mit Tim23 analysiert. (C) Die Signalintensitäten von Tim9, Tim10b und entsprechend von DDP1 wurden mit Densitometrie quantifiziert. Die Proteinmengen sind bei Koexpression mit Cmi1 um das 6-10fache erhöht.

4 Diskussion

4.1 Die Proteine der TIM22-Translokase sind evolutionär konserviert

In den letzten Jahren wurden detaillierte Erkenntnisse über die Mechanismen des Imports von kernkodierten Proteinen in Mitochondrien gewonnen. Das Wissen über die einzelnen Translokasen der verschiedenen Importwege, ihre Zusammensetzung und Funktion wurde im Wesentlichen aus Studien in einfachen eukaryontischen Organismen wie *S. cerevisiae* oder *N. crassa* abgeleitet. Für eine Reihe von Importkomponenten des TOM-Komplexes oder der TIM23-Translokase wurden Homologe auch in Säugetieren identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Komponenten der TIM22-Translokase aus Säugetieren identifiziert sowie strukturell und funktionell charakterisiert.

Entlang des TIM22-Importweges werden Proteine mit internen Signalsequenzen in die Innenmembran inseriert. Dazu gehören die mitochondrialen Metabolit-Carrier und einige Komponenten der Importkomplexe wie Tim23, Tim17 und Tim22 selbst (Kaldi et al., 1998; Sirrenberg et al., 1996). Sie alle sind hydrophobe, polytope Innenmembranproteine, die während ihres Imports den wässrigen Intermembranraum passieren müssen, ohne dort zu aggregieren. Um dies zu gewährleisten, existieren im Intermembranraum kleine Hilfsproteine, die kleinen Tim-Proteine, die entlang des TIM22-Importweges als Chaperone agieren. Sie binden und stabilisieren hydrophobe Vorstufenproteine im Intermembranraum und führen sie dem Translokationskanal Tim22 in der Innenmembran zu. In der Hefe gibt es fünf dieser strukturell verwandten kleinen Tim-Proteine: Die nicht-essentiellen Proteine Tim8 und Tim13 und die essentiellen Proteine Tim9, Tim10 und Tim12. Sie alle zeichnen sich durch ein potentiell Zinkfinger-Motiv mit vier Cysteinen (Cys₄-Motiv) aus und haben eine Größe von etwa 10 kDa.

Tim8 und Tim13 bilden einen löslichen Komplex im Intermembranraum der Hefemitochondrien. Auch ein Teil von Tim9 und Tim10 liegt als löslicher Tim9-10-Komplex vor. Der andere Teil bildet zusammen mit Tim12 einen membranassoziierten, höhermolekularen Komplex. Die kleinen Tim-Proteine unterscheiden sich in ihrer

Substratspezifität: Tim8 und Tim13 unterstützen den Import von Tim23 (Paschen et al., 2000) und sind in frühen Stadien des Imports von Außenmembranproteinen mit einer komplexen β -Faltblatt Struktur wie Tom40 oder Porin beteiligt (Hoppins and Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004). Tim9, Tim10 und Tim12 vermitteln den Import von Metabolit-Carriern wie z.B. dem ADP/ATP-Carrier (Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998).

Eine große Anzahl von weiteren Proteinen mit Homologie zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe aus tierischen Eukaryonten und Pflanzen wurde durch die Analyse von genomischen und EST-Datenbanken identifiziert. Basierend auf den Sequenzanalysen ist die Familie der kleinen Tim Proteine in allen Eukaryonten konserviert. Ihr gemeinsames Zinkfingermotiv lässt sich durch die Konsensussequenz $CX_3C-X_{14-17}-CX_3C$ beschreiben. Eine phylogenetische Analyse unterteilt die Proteinfamilie in zwei Hauptgruppen. Eine beinhaltet die in der Hefe essentiellen Tim9- und Tim10-Proteine, die andere die in der Hefe nicht-essentiellen Tim8- und Tim13-Proteine (Abb. 32). Sie unterscheiden sich in der Anzahl und der Verteilung der Ladungen der Aminosäuren zwischen den beiden konservierten Cysteinpaaren. In jedem Organismus scheint wenigstens ein Vertreter jeder Untergruppe vorzukommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Datenbankanalyse sechs menschliche Sequenzen gefunden, die für Homologe der kleinen Tim-Proteine kodieren. Davon wurden drei Proteine eindeutig der Tim9-10-12-Gruppe zugeordnet. In phylogenetischen Analysen wurde eines als Tim9-Homolog und zwei als Tim10-Homologe eingeordnet; dem entsprechend wurden die Proteine Tim9, Tim10a und Tim10b genannt. Tim9 weist mit 56 % die höchste Ähnlichkeit zu Hefe-Tim9 auf. Die Ähnlichkeit von Tim10a zu Tim10 ist ebenfalls mit etwa 56 % am höchsten. Tim10b dagegen ist nur zu 40 – 42 % ähnlich zu allen drei Hefekomponenten. Es wurde nur durch einen Vergleich, der sich auf die Sequenz um das Cys_4 -Motiv beschränkte, in die Tim10-Subgruppe eingeordnet. In der Hefe existiert darüber hinaus noch ein Tim12, zu dem keines der menschlichen kleinen Tim-Proteine eine signifikante Homologie aufweist. Eine eindeutige Tim12-Spezies wurde bisher in keinem anderen eukaryontischen Organismus außer der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert. Dies ist erstaunlich, da Tim12 in der Hefe eine Sonderfunktion zukommt. Es vermittelt den Kontakt zwischen dem löslichen Tim9-Tim10-Komplex und der Translokationspore Tim22 (Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998). Ob möglicherweise Tim10b oder ein anderes Tim9/10-Homolog diese Aufgabe übernimmt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht (s. a. Kap. 4.3).

Die anderen drei Sequenzen fielen in die Tim8-13-Gruppe. Dazu gehört neben einem Tim13 die zwei Tim8-Homologen DDP1 und DDP2 (Jin et al., 1996; Koehler et al., 1999). Alle menschlichen kleinen Tim-Proteine, mit Ausnahme von DDP2 konnten als mitochondriale Proteine nachgewiesen werden. Die Existenz eines endogenen DDP2-Proteins ist bisher nicht geklärt.

Die im Menschen identifizierten zwei Vertreter der Tim10- und Tim8-Untergruppen, Tim10a und Tim10b bzw. DDP1 und DDP2 repräsentieren keine gewebsspezifischen Isoformen. In Expressionsanalysen wurden die kleinen Tims auf RNA-Ebene in allen untersuchten menschlichen Geweben nachgewiesen. Die höchsten Transkriptlevels lagen bei allen sechs mRNAs in Herz und Leber sowie in Skelettmuskel und Niere (Bauer et al., 1999b).

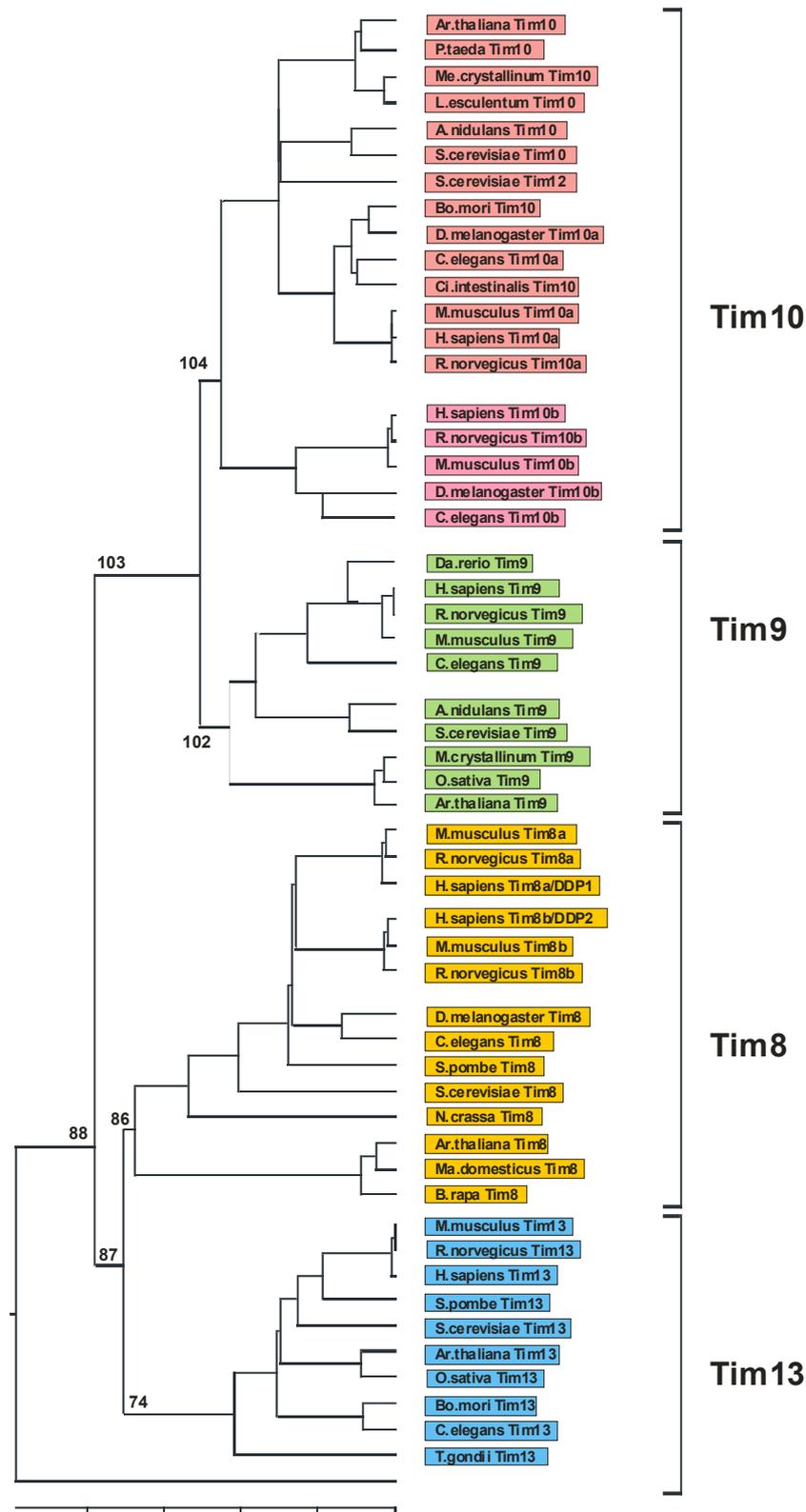


Abb. 32 Stammbaumanalyse von Mitgliedern der DDP/Tim10-Proteinfamilie. Die DDP/Tim10-Proteinfamilie besteht aus zwei Gruppen, den in der Hefe essentiellen und nicht-essentiellen Proteinen, die sich in je zwei Untergruppen aufteilen: Tim9/Tim10 und Tim8/Tim13. Die Längen der Verzweigungen sind proportional zu dem Grad der Unterschiede zwischen den Sequenzen. Der Stammbaum wurde aus einem Alignment der Gesamtsequenzen mit dem Programm MegAlign aus der Reihe DNASTAR (Clustal, Standardparameter) erstellt.

4.2 Die funktionelle Bedeutung des konservierten Cys₄-Motivs

4.2.1 Das konservierte Cys₄-Motiv der kleinen Tim-Proteine vermittelt die Bindung von Zink-Ionen

Die Anordnung der konservierten Cysteine in den kleinen Tim-Proteinen (CX₃C-X₁₄₋₁₇-CX₃C) deutete darauf hin, dass es sich vermutlich um ein bisher uncharakterisiertes Zinkfingermotiv handelt. Für Tim10 und Tim12 aus Hefe wurde bereits gezeigt, dass sie zweiwertige Metall-Ionen wie Zn²⁺ binden können (Sirrenberg et al., 1998). In dieser Arbeit wurden die von den gereinigten Proteinen gebundenen Metall-Ionen mit optischer Emissionsspektroskopie (ICP) gemessen. Es wurde nachgewiesen, dass auch die humanen Proteine DDP1 und Tim13 Zn²⁺-Ionen in einer 1:1 Stöchiometrie binden können. Die Metallbindung wird dabei spezifisch durch die Cysteine vermittelt. Dies wurde gezeigt, indem die Sulfhydrylgruppen mit N-ethylmaleimid (NEM) alkyliert wurden, so dass sie die Fähigkeit zur Bindung von Metall-Ionen verloren. In den so modifizierten Proteinen konnte kein Zink mehr nachgewiesen werden.

Zinkfinger kommen in eukaryontischen Proteinen, vor allem in DNA-bindenden Proteinen, sehr häufig vor. Cysteine dienen oft in Kombination mit Histidinen in variablen Abfolgen als Metall-koordinierende Aminosäuren. Das weit verbreitete Zinkfingermotiv aus zwei Cysteinen und zwei Histidinen (Cys₂His₂) tritt sehr oft in Transkriptionsfaktoren auf und führt zu einer charakteristischen ββ_α-Proteinfaltung (Laity et al., 2001). Vermehrt werden auch Zinkfingerstrukturen bekannt, die Protein-Protein-Wechselwirkungen oder auch Protein-Lipid-Wechselwirkungen vermitteln. Bei den kleinen Tim-Proteinen scheint der Zinkfinger für die spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Komplexpartner verantwortlich zu sein (s. Kap. 4.2.2). Möglicherweise spielt er auch eine Rolle bei der Substraterkennung und -bindung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass über die konservierten Cysteine Metall-Ionen gebunden werden. Dies schließt aus, dass sie in die Bildung von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken involviert sind. Dennoch wird dieser Punkt - Metallbindung oder Disulfidbrücken - kontrovers diskutiert. So wurde in einer Untersuchung von Curran *et al.* in rekombinant exprimiertem Tim9-Tim10 Komplex kein gebundenes Zn²⁺ nachgewiesen (Curran et al., 2002). Zudem wurden in der Intermembranraumfraktion aus Hefemitochondrien überexprimierte Tim9- und Tim10-Proteine in oxidiert Form nachgewiesen. Durch Trypsinverdau und Massenspektroskopie von Tim10 wurden

intramolekulare Disulfidbrücken identifiziert, die gegenüberliegende Cysteine verbinden und so zu einer schlaufenförmigen Proteinkonformation führen (Allen et al., 2003). Verschiedene Punkte sprechen jedoch dafür, dass die Beobachtung von Disulfidbrücken nicht die physiologische Situation widerspiegelt. Die im Rahmen dieser Arbeit für die Metallbindungsstudien benutzten rekombinanten Proteine wurden während der Reinigungsprozesse durch Zugabe von β -Mercaptoethanol in reduziertem Zustand gehalten. Dies sollte eine Oxidation der Sulfhydrylgruppen während der Lyse und Reinigung verhindern. Da in den o.g. Untersuchungen die Reinigung der Proteine bzw. die Lyse der Mitochondrien nicht unter ausreichend reduzierenden Bedingungen stattfand, ist es anzunehmen, dass die Beobachtung von Disulfidbrücken auf die Oxidation der Sulfhydrylgruppen während der Reinigung zurückzuführen ist und nicht die physiologische Situation widerspiegelt. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, dass die Sulfhydrylgruppen in Mitochondrien, die unter Ausschluss von Luftsauerstoff geöffnet wurden, in reduziertem Zustand vorlagen (Lutz et al., 2003). Weitere Hinweise auf die Bindung von Zn^{2+} durch kleine Tim-Proteine ergaben sich aus Untersuchungen des Imports von Tim13. Es wird nur dann effizient importiert, wenn es im Intermembranraum Zn^{2+} binden kann, da durch eine stabile Faltung das Zurückgleiten des Vorstufenproteins in das Cytosol verhindert wird. Diese Faltung wird durch die Zugabe von Chelatoren, aber nicht durch reduzierende Agenzien inhibiert (Lutz et al., 2003).

4.2.2 Eine Mutation im Zinkfinger-Motiv führt zum Verlust der Interaktion von DDP1 und Tim13

Die funktionelle Bedeutung des Zinkfinger-Motivs wurde exemplarisch an einem mutierten DDP1-Protein untersucht, bei dem das vierte Cystein zu einem Tryptophan ausgetauscht war (DDP1^{C66W}). Das mutierte DDP1 wurde bezüglich seiner Metallbindungskapazität und der Fähigkeit, mit dem Partnerprotein Tim13 zu interagieren, untersucht.

Die ICP-Untersuchungen zeigen, dass das DDP1^{C66W} Protein nicht mehr in der Lage ist, Zn^{2+} -Ionen zu binden. Vermutlich kann es keine Zinkfingerstruktur mehr ausbilden. Die C66W-Mutation führt damit zu einem inkorrekt gefalteten Protein. Diese Missfaltung hat eine erhöhte Sensitivität des DDP1^{C66W} gegenüber Proteasen zur Folge. Diese wurde in verschiedenen Experimenten deutlich: (1) Das rekombinante DDP1^{C66W} zeigte *in vitro* eine ähnliche Sensitivität gegenüber Proteasen wie ein Wildtyp-DDP1, das mit Chelatoren vorbehandelt wurde, um damit das Zink zu entziehen. (2) DDP1^{C66W} kann *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert werden, wird aber im Intermembranraum schneller abgebaut als

DDP1. (3) DDP1^{C66W} wird in Hefemitochondrien *in vitro* zwar importiert, aber dann im Intermembranraum nicht zu signifikanten Mengen akkumuliert (Hofmann et al., 2002).

Was ist der Grund für die Instabilität des mutierten DDP1? Möglicherweise wird durch die inkorrekte Faltung die Assemblierung mit dem Partnerprotein verhindert. DDP1 bildet im Intermembranraum von menschlichen Mitochondrien einen hetero-oligomeren Komplex mit Tim13. Dies ist durch Koimmunpräzipitation aus solubilisierten Mitochondrien gezeigt worden. (Rothbauer et al., 2001). Die Interaktion dieser beiden Proteine konnte auch *in vitro* mit rekombinant exprimierten Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Tim13-GST wurde mit einer Säule, an die His₆-DDP1 vorgebunden war, aus einem *E. coli*-Lysat selektiv gebunden. Nach einer zweiten Reinigung der Proteinkomplexe über eine Glutathion-Säule, an die Tim13-GST binden konnte, wurden äquimolare Mengen His₆-DDP1 und Tim13-GST koeluiert. DDP1 und Tim13 sind somit auch in der Lage, *in vitro* Komplexe zu bilden, die so stabil sind, dass sie über zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte erhalten bleiben.

Im Gegensatz zu dem endogenen oder heterolog exprimierten DDP1^{C66W} hat die C66W-Mutation auf die Stabilität des rekombinant exprimierten DDP1 *in vitro* in Abwesenheit von Proteasen keine Auswirkung. Es konnten ähnliche Expressionslevel wie für das Wildtyp-DDP1 erzielt werden. Der Einfluß der Mutation auf die Assemblierung konnte somit *in vitro* am rekombinanten Protein getrennt untersucht werden. Wurde das *in vitro*-Interaktionsexperiment mit dem mutierten DDP1-Protein (His₆-DDP1^{C66W}) durchgeführt, konnte keine Interaktion mit Tim13-GST festgestellt werden. Die Mutation im Zinkfinger-Motiv verhindert demnach die Bildung eines DDP1-Tim13-Komplexes. Untersuchungen mit einer entsprechenden Mutation in der Hefe (Tim8^{C68W}) bestätigten diese Ergebnisse. Auch hier wurde keine Assemblierung zu einem 70 kDa-Komplex mit Tim13 beobachtet (Roesch et al., 2002). Der Zinkfingers der kleinen Tim-Proteine spielt also eine Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen und zwar vermutlich bei der Wechselwirkung zwischen den jeweiligen Komplexpartnern.

Die C66W-Mutation im DDP1-Protein wurde hier insbesondere deswegen untersucht, da sie im Menschen eine pathogene Mutation darstellt, die mit dem neurodegenerativen Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS) assoziiert ist. MTS wird in den meisten Fällen durch 'loss-of-function'-Mutationen im DDP1-Gen wie Leserasterverschiebungen oder Stopmutationen, die zu einer Verkürzung oder einem vollständigen Verlust des DDP1-Proteins führen, verursacht (Jin et al., 1996; Koehler et al., 1999). Bei der C66W-Mutation handelt es sich um die einzige bisher bekannte Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch führt (Tranebjaerg et al., 2000). Der Verlauf der Krankheit verhält sich allerdings hierbei wie bei einer klassischen

'*loss-of-function*'-Mutation, da das mutierte DDP1 instabil ist und vermutlich schnell degradiert wird. In Fibroblasten des Patienten konnte kein DDP1 nachgewiesen werden, auch die Mengen von Tim13 waren stark reduziert (Roesch et al., 2002). Dies ist konsistent mit unserer Beobachtung, dass das mutierte Protein auch bei Expression in der Hefe instabil ist und schnell degradiert wird. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Instabilität des mutierten DDP1 vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein aufgrund der fehlenden Zinkbindung nicht mehr korrekt gefaltet wird und somit nicht mehr mit seinem Komplexpartner interagieren kann. Das Fehlen von funktionellen DDP1-Tim13-Komplexen im Intermembranraum ist demnach wahrscheinlich der molekulare Mechanismus, der bei Patienten mit der C66W-Mutation zur Erkrankung führt.

4.3 Struktur und Funktion des menschlichen TIM22-Komplexes

Die evolutionäre Konservierung der Komponenten der TIM22-Translokase lässt vermuten, dass ihre Funktionen beim Import von mitochondrialen Vorstufenproteinen prinzipiell den Funktionen entsprechen, die aus der Hefe bekannt sind. Dennoch ist anzunehmen, dass sich im Laufe der Evolution Unterschiede in ihren Zusammensetzungen, spezifischen Funktionen oder Substratspezifitäten herausgebildet haben. Um dies zu untersuchen, wurden die in unserem Labor identifizierten menschlichen Komponenten der TIM22-Translokase bezüglich ihrer Struktur und Funktion charakterisiert.

Im Intermembranraum von menschlichen Mitochondrien existieren fünf Hilfsproteine, die entlang des TIM22-Importweges agieren. DDP1 und Tim13 haben eine spezifische Funktion beim Import von Tim23 in die Innenmembran (Rothbauer et al., 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tim9, Tim10a und Tim10b vermitteln dagegen den Import von Carriern in die Innenmembran. Die Substratspezifitäten der Intermembranraum-Komponenten scheinen somit von niederen zu höheren Eukaryonten prinzipiell konserviert zu sein.

Dennoch haben sich wahrscheinlich unterschiedliche Importerfordernisse entwickelt. So kann z.B. der humane Carrier (ANT3) nicht in Mitochondrien aus Hefe importiert werden, während der AAC2 der Hefe sowohl in Mitochondrien aus Mausleber als auch in Hefemitochondrien etwa gleich gut importiert wird. Hier ist möglicherweise eine Anpassung an veränderte Substratspezifitäten entstanden.

Um einen Hinweis auf die möglicherweise unterschiedlichen funktionellen Rollen von Tim9, Tim10a und Tim10b zu erhalten, wurde die strukturelle Organisation dieser drei kleinen Tim-Proteine im Intermembranraum von Säugetiermitochondrien genauer untersucht. Es wurde gezeigt, dass Tim9, Tim10a und Tim10b im Intermembranraum in zwei hetero-oligomeren Komplexen organisiert sind. Einer dieser Komplexe setzt sich aus Tim9 und Tim10a zusammen und hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Der zweite Komplex weist ein hohes Molekulargewicht von etwa 450 kDa auf und enthält zusätzlich Tim10b. Damit ergibt sich eine ähnliche Komplex-Organisation der menschlichen Tim-Proteine wie in der Hefe. Dort bilden Tim9 und Tim10 einen hetero-oligomeren Komplex von 70 kDa, während ein zweiter Komplex aus Tim9, Tim10 und Tim12 als Teil eines hochmolekularen Komplexes von 300 kDa vorliegt (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998c). Diese Daten weisen auf eine mögliche gleiche Funktion von Tim10b und Tim12 hin. Beide existieren nur als Teil des höhermolekularen Komplexes und kommen nicht in einem 70 kDa Komplex vor. Ähnlich wie Tim12 der Hefe weist auch das menschliche Tim10b im Vergleich zu Tim10a und Tim9 eine wesentlich stärkere Affinität zur Membran auf. Im Vergleich zu seinen Komplexpartnern, die bei hoher Ionenstärke von der Membran abgelöst werden konnten, blieb Tim10b unter diesen Bedingungen quantitativ mit der Membran assoziiert. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten der kleinen Tim Proteine wird in einer Analyse ihrer Hydrophathieprofile deutlich. Tim10b zeigt im Vergleich zu Tim9 und Tim10a die stärkste Hydrophobizität. Ebenso ist auch Tim12 hydrophober als seine Komplexpartner (Abb. 33).

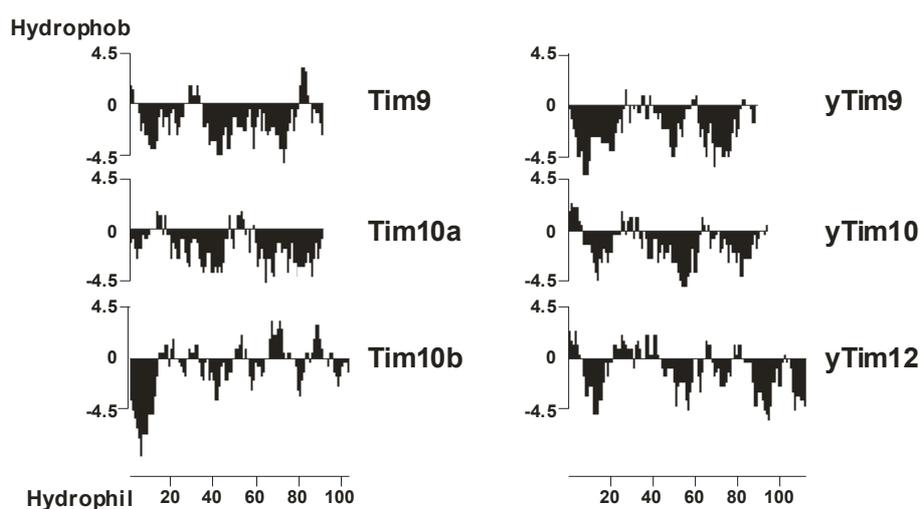


Abb. 33 Hydrophathieprofile der kleinen Tim-Proteine der Tim9 und Tim10-Gruppen aus Mensch und Hefe im Vergleich. Die Profile wurden mit dem Programm Protean aus der Reihe DNASTAR nach Kyte-Doolittle erstellt.

Diese vergleichenden Analysen sprechen dafür, dass Tim10b und Tim12 orthologe Proteine sind und ähnliche Funktionen während des Imports ausüben könnten. Allerdings führen weitere Beobachtungen, die auch die Struktur der anderen Komponenten mit einbeziehen, zu dem Schluß, dass die drei menschlichen kleinen Tim-Proteine eine im Vergleich zur Hefe unterschiedliche Funktion während des Imports ausüben.

Im Gegensatz zur Hefe liegt in menschlichen Mitochondrien kein löslicher 70 kDa-Komplex aus Tim9 und Tim10a im Intermembranraum vor. Aus der Hefe ist bekannt, dass der lösliche Tim9-Tim10-Komplex zwar an AAC-Vorstufenproteine schon während ihrer Translokation durch den TOM-Komplex bindet (Adam et al., 1999; Endres et al., 1999); für den Transport durch den Intermembranraum allerdings ist die Anwesenheit des löslichen 70 kDa Komplexes nicht zwingend erforderlich. Es wurde gezeigt, dass Mitochondrien eines Hefestammes, der den löslichen 70 kDa Komplex nicht enthält, wohl aber Tim9 und Tim10, die mit der Innenmembran assoziiert sind, unveränderte Mengen von AAC enthalten. Nur der *in vitro* Import des Carriers in diese Mitochondrien war um das zwei- bis dreifache verlangsamt (Murphy et al., 2001). Der lösliche Tim9-Tim10 Komplex hat also eine unterstützende Funktion beim Import von Carrier-Vorstufenproteinen, die in höheren Eukaryonten scheinbar nicht konserviert ist. Hier existiert kein löslicher 70 kDa-Komplex und die Funktion eines solchen ist offensichtlich auch nicht erforderlich. Damit entfällt auch das Erfordernis eines Tim12, das die Membranassoziation des löslichen Komplexes vermittelt. Das Fehlen eines Tim12-Homologs in höheren Eukaryonten spricht somit dafür, dass seine Funktion wahrscheinlich durch eine allgemein höhere Membranaffinität der anderen drei kleinen Tim-Proteinen ersetzt wurde.

Das Fehlen eines löslichen Intermembranraum-Komplexes lässt vermuten, dass sich möglicherweise andere Mechanismen entwickelt haben, die die hydrophoben Carrier-Moleküle im Intermembranraum vor Aggregation schützen. Für die Entwicklung geänderter Importmechanismen spricht auch die Beobachtung, dass die menschlichen kleinen Tim-Proteine den Wachstumsphänotyp, der durch reduzierte Expression von Tim10 oder Tim12 entsteht, nicht komplementieren können.

Neben den Unterschieden der Struktur und Funktion der Intermembranraum-Chaperone fand sich auch eine veränderte Zusammensetzung des membranintegralen Anteils der TIM22-Translokase selbst. Basierend auf der Konservierung der Aminosäuresequenzen wurden die Tim22-Proteine aus Mensch, Maus und Ratte identifiziert. Sie sind nahezu identisch (95 – 97 % identische Aminosäuren), aber die Homologie zwischen Tim22 aus *H. sapiens* und *S.*

cerevisiae liegt nur bei 26 %. Es ist zwar anzunehmen, dass Tim22 in Säugetiermitochondrien die gleiche Topologie einnimmt wie in der Hefe, bei der N- und C-Termini zum Intermembranraum hin exponiert sind, dennoch sind die hydrophilen Domänen, über die wahrscheinlich Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden, wenig konserviert. Ein Bereich im ersten Matrix-Loop ist in den Säugetierproteinen im Vergleich zum Hefe-Tim22 stark verkürzt. Der N-Terminus des Tim22 ist in Säugetieren länger als in der Hefe und wenig konserviert. Wie in einer Komplementationsstudie gezeigt wurde, ist das menschliche Tim22 nicht in der Lage, die Funktion des Hefe-Tim22 zu übernehmen. Es kann wahrscheinlich mit den anderen Komponenten der TIM22-Translokase in der Hefe nicht funktionell interagieren.

Weitere Hinweise, die diese Annahme unterstützen, ergeben sich aus der Analyse der anderen Komponenten der Translokase. Die geringe Konservierung des humanen Tim22 ist von weiteren grundlegenden Unterschieden in der Zusammensetzung des gesamten TIM22-Komplexes im Vergleich zur Hefe begleitet: Tim54- und Tim18-Homologe konnten in Datenbanken von Säugetieren, aber auch in den meisten einfacheren Eukaryonten bisher nicht identifiziert werden. Tim54 trägt vermutlich zur Stabilisierung des TIM22-Komplexes bei. Es ist unklar, ob ein anderes, bisher unbekanntes Protein die Stabilisierung des menschlichen TIM22-Komplexes übernimmt, oder ob hier Tim22 auch ohne Partnerprotein eine stabile Translokationspore bildet.

Aber nicht nur der membranintegrale Anteil der Translokase, sondern auch die Assoziation der menschlichen kleinen Tim-Proteine mit Tim22 ist im Vergleich zur Hefe stark verändert. Durch Koimmunpräzipitation wurde gezeigt, dass Tim9, Tim10a und Tim10b zwar in Kontakt zu Tim22 stehen und damit Bestandteile der menschlichen TIM22-Importmaschinerie sind. Im Gegensatz zur Hefe ist aber der größte Teil von Tim9, Tim10a und Tim10b nicht stabil mit Tim22 assoziiert. Darüber hinaus enthält der 450 kDa Komplex aus Tim9, Tim10a und Tim10b keine oder nur geringe Mengen von Tim22.

Es ist daher davon auszugehen, dass sich im Laufe der Evolution ein anderer Mechanismus der Interaktion zwischen den kleinen TIM-Komplexen und dem membranintegralen TIM22-Komplex entwickelt hat. Dies könnte eine dynamische Interaktion sein, die während der Translokation eines Vorstufenproteins auftritt und nur in dem Moment ausgebildet wird, in dem das Vorstufenprotein an Tim22 weitergeleitet wird, um in die Membran inseriert zu werden.

Im Vergleich zur Importmaschinerie der Hefe (s. a. Abb. 1) ergeben sich aus den Daten dieser Arbeit eindeutige Unterschiede in der Organisation der Tim22-Translokase in Säugetieren (Abb. 34). (1) Sowohl der Tim9-Tim10a-Komplex als auch der Tim9-Tim10a-Tim10b-Komplex sind membranassoziiert und nicht löslich im Intermembranraum. (2) Es existiert kein Tim12-Homolog, möglicherweise ist das Erfordernis der Vermittlung zwischen löslichem Komplex und Translokationskanal durch die Membranassoziation von Tim9, Tim10a und Tim10b entfallen. (3) Der membranintegrale Anteil des TIM22-Komplexes enthält weder Tim54 noch Tim18. (4) Die kleinen Tim-Proteine liegen nicht im Komplex mit Tim22 vor, sondern interagieren wahrscheinlich dynamisch mit dem Proteinkanal.

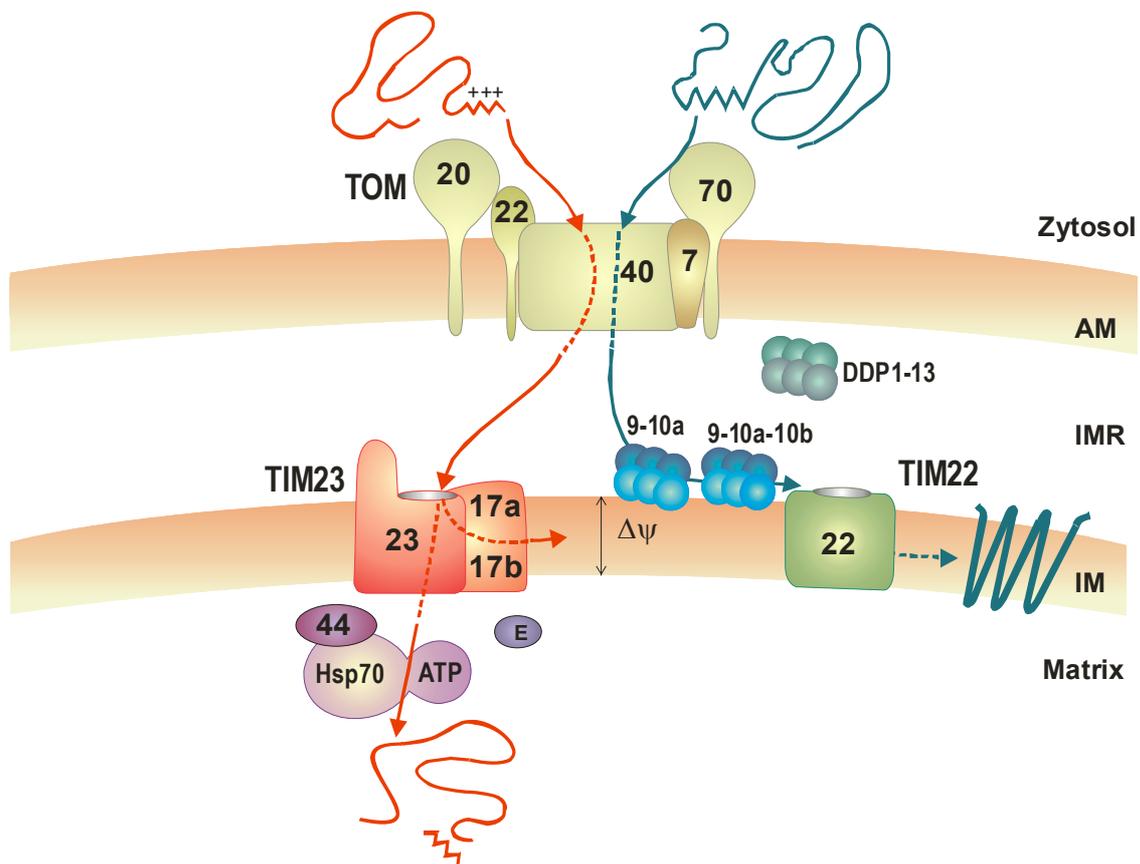


Abb. 34 Schematische Übersicht über die mitochondriale Proteinimportmaschinerie der Säugetiere. Die Abbildung repräsentiert die bisher in den Säugetieren identifizierte Komponenten der Importkomplexe in der äußeren und inneren Mitochondrienmembran. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Komponenten des Carrier-Importweges der TIM22-Translokase näher charakterisiert. Zwei Komplexe bestehend aus Tim9 und Tim10a bzw. aus Tim9, Tim10a und Tim10b sind mit der Innenmembran assoziiert und stehen in dynamischer Interaktion mit Tim22 zur Vermittlung der Insertion von Carrier-Vorstufenproteinen.

Es wäre in Zukunft von großem Interesse, mögliche weitere menschliche Komponenten des TIM22-Importweges zu identifizieren, die dazu beitragen, die spezifischen Anforderungen für den Import von Metabolit-Carriern der Säugetiere zu erfüllen.

4.4 Identifikation eines neuen mitochondrialen Metalloproteins im Intermembranraum

Der Import von kleinen Tim-Proteinen in den Intermembranraum erfordert die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen. Es wird angenommen, dass die treibende Kraft für den Import in der stabilen Faltung und damit verbunden in der Inkorporation von Zn^{2+} -Ionen im Intermembranraum liegt. Im Rahmen dieses Modells wurde die Existenz eines bisher unbekanntes Intermembranraumproteins postuliert, das Zn^{2+} -Ionen an die kleinen Tim-Proteine übergibt (Lutz et al., 2003). Auch für andere metallbindende Intermembranraumproteine ist bekannt, dass entsprechende Metall-Transfer-Proteine existieren. So wird z. B. die Insertion von Kupfer-Ionen in die Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase1 (SOD1) durch das Kupferchaperon für SOD1, CCS (*'copper chaperone for SOD1'*) vermittelt (Culotta et al., 1997). Ein Teil dieser beiden hauptsächlich cytosolisch vorkommenden Proteine kolokalisieren im mitochondrialen Intermembranraum. Die Inkorporation von Kupfer-Ionen in SOD1 erfolgt nach dem Import im Intermembranraum. Es wurde vermutet, dass die SOD1 dort durch die Interaktion mit CCS an dem Zurückgleiten in das Zytosol gehindert wird (Field et al., 2003). Auch für Apocytochrom c ist bekannt, dass es reversibel die Außenmembran passieren kann. Es wird durch die Interaktion mit seinem Metallochaperon Cytochrom c-Häm-Lyase (CCHL) im Intermembranraum zurückgehalten (Mayer et al., 1995b).

In dieser Arbeit wurde ein neues humanes Protein identifiziert, das möglicherweise auch an dem Transfer von Metall-Ionen im Intermembranraum beteiligt ist. Die Identifikation des humanen Cmi1 Proteins basierte auf der Homologie zu dem Hefeprotein YKL195w, das in Datenbanken als essentielles mitochondriales Protein beschrieben wurde. Aus den Datenbankinformationen ging weiterhin hervor, dass es eine Rolle im Proteinimport haben könnte, da es mit Tom40 gereinigt wurde (Hazbun et al., 2003). Die Existenz von sechs Cysteinresten ließ vermuten, dass es sich hierbei um ein metallbindendes Protein handeln könnte. Wie sich im Vergleich mit homologen Sequenzen aus anderen Eukaryonten herausstellte, sind diese Cysteinreste konserviert. Da die Herunterregulation der Expression des YKL195w Proteins in der Hefe die Proteinmengen von metallbindenden Proteinen im

Intermembranraum beeinflusst (Dr. Kai Hell, persönliche Mitteilung), wurde vermutet, dass es eine Rolle bei deren Biogenese haben könnte.

Bei der Charakterisierung des Cmi1 Proteins ergaben sich mehrere Beobachtungen, die diese These für das humane Protein unterstützen: (1) Das Cmi1 Protein ist ein mitochondriales Protein und es ist wie die kleinen Tim-Proteine im Intermembranraum lokalisiert. (2) Die Konsensusabfolge der konservierten Cysteine ist dem sogenannten CHCH-Motiv (coiled coil - helix - coiled coil - helix) ähnlich, das unter anderem in mitochondrialen Proteinen wie Cox17 und Cox19 auftritt. Cox17 ist an der Übertragung von Cu^{2+} -Ionen an die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase beteiligt, eine ähnliche Funktion wurde auch für Cox19 vermutet. (Heaton et al., 2000; Nobrega et al., 2002; Punter and Glerum, 2003). Wie Cox17 könnte auch Cmi1 in der Lage sein, Metall-Ionen reversibel zu binden. (3) Es konnte gezeigt werden, dass Cmi1 Metall-Ionen binden kann, und zwar sowohl Zn^{2+} als auch Cu^{2+} -Ionen. Die Messungen ergaben eine Stöchiometrie von etwa ein bis zwei Me^{2+} -Ionen pro Cmi1-Molekül. Die hohen Schwankungen in den Einzelbestimmungen sind dabei vermutlich auf Abweichungen bei der Proteinbestimmung zurückzuführen. Es könnte auch sein, dass eine flexible Stöchiometrie von gebundenen Ionen möglich ist. (4) Überexpression von Cmi1 im heterologen Hefesystem führt zu einer 6 bis 10-fachen Erhöhung der Proteinmengen von humanen kleinen Tim-Proteinen im Intermembranraum. Diese geht deutlich über den Stabilisierungseffekt hinaus, der beobachtet wird, wenn die Proteine zusammen mit ihrem Partnerprotein exprimiert werden. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass Cmi1 die Importrate von kleinen Tim-Proteinen erhöht bzw. in der Lage ist, importiertes DDP1 im Intermembranraum zu stabilisieren.

5 Zusammenfassung

Die TIM22-Translokase in der mitochondrialen Innenmembran vermittelt die Insertion von polytopen Innenmembranproteinen mit internen Signalsequenzen wie der mitochondrialen Metabolit-Carrier. Dabei unterstützt eine Gruppe von strukturell verwandten Proteinen mit charakteristischem Metallbindungsmotiv (Cys₄-Motiv) die Passage der hydrophoben Vorstufenproteine über den Intermembranraum. Dies sind in der Hefe Tim9, Tim10 und Tim12 sowie Tim8 und Tim13. Die Familie dieser kleinen Tim-Proteine ist evolutionär konserviert. Im Menschen wurden sechs Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert: Tim9, Tim10a und Tim10b sowie DDP1, DDP2 und Tim13.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Komponenten der TIM22-Translokase der Säugetiere strukturell und funktionell charakterisiert. Bei ihnen handelt es sich ebenfalls um mitochondriale Intermembranraumproteine. Sie sind in der Lage, mittels der vier konservierten Cysteinreste ein Zn²⁺-Ion zu binden und damit vermutlich eine Zinkfinger-Struktur auszubilden.

Mutationen, die zu einem Verlust des DDP1 Proteins führen, sind die Ursache für das Mohr-Tranebjaerg Syndrom, einer neurodegenerativen Erkrankung, die sich im Wesentlichen durch Taubheit und Dystonie auszeichnet. Eine Punktmutation im DDP1-Gen, die zu einem Austausch eines der konservierten Cysteine führt (DDP1^{C66W}), verursacht den Verlust der Zinkbindungskapazität und resultiert in einem fehlgefalteten, instabilen Protein. Es wurde gezeigt, dass das mutierte DDP1 nicht mehr in der Lage ist, mit seinem Partnerprotein Tim13 zu interagieren und keinen funktionellen DDP1-Tim13 Komplex ausbilden kann.

Die menschlichen Proteine der Tim9 und Tim10-Gruppen, Tim9, Tim10a und Tim10b sind wie ihre homologen Hefeproteine in zwei hetero-oligomeren Komplexen organisiert, einem 70 kDa-Komplex bestehend aus Tim9 und Tim10a sowie einem 450 kDa Tim9-10a-10b-Komplex. Beide Komplexe sind fest mit der Innenmembran assoziiert. Tim10b zeigt eine geringere Sequenzhomologie zu Hefe-Tim10 als Tim10a. Es liegt genauso wie Tim12 nur in dem hochmolekularen Komplex vor und weist die stärkste Membranassoziation auf. Es zeigt damit strukturelle Ähnlichkeit zu Tim12. Aufgrund der Membranassoziation der kleinen TIM-Komplexe entfällt aber wahrscheinlich die Funktion des Tim12 als Vermittler zwischen dem löslichen Komplex und der Membran. Tim9, Tim10a und Tim10b sind wie die Hefe-Proteine am Import von mitochondrialen Carriern beteiligt. Die Bindung an

Translokationsintermediate von Carrier-Vorstufenproteinen erfolgt in Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen wie Zn^{2+} .

Die Struktur des TIM22-Komplexes weist signifikante Unterschiede zu der aus der Hefe bekannten Organisation auf. Humanes Tim22 ist im Vergleich zu Hefe-Tim22 wenig konserviert. Es liegt kein stabiler Komplex vor, der Tim22 und die kleinen Tim-Proteine enthält. Sie befinden sich vermutlich in dynamischer Interaktion mit Tim22, die wahrscheinlich nur während der Translokation eines Vorstufenproteins auftritt. Bisher ist kein Komplexpartner des humanen Tim22 bekannt. Homologe zu Tim54 und Tim18, den membranintegralen Komplexpartnern des Tim22, wurden in menschlichen Datenbanken nicht identifiziert. Aufgrund der veränderten strukturellen Organisation ist das menschliche Tim22 nicht in der Lage, mit den Proteinen aus der Hefe funktionell zu kooperieren. Es hat vermutlich eine Anpassung an veränderte Substratspezifitäten stattgefunden, die auch die Beteiligung weiterer bisher unidentifizierter Komponenten der TIM22-Translokase einschließen könnte.

Ein neues Intermembranraumprotein menschlicher Mitochondrien, Cmi1, ist an der Biogenese der kleinen Tim-Proteine beteiligt. Eine Überexpression im Hefesystem führt zur signifikanten Erhöhung der Proteinmengen von kleinen Tim-Proteinen im mitochondrialen Intermembranraum. Cmi1 unterstützt vermutlich die rasche stabile Faltung der neu importierten kleinen Tim-Proteine. Da Cmi1 in der Lage ist, Metall-Ionen zu binden vermittelt es möglicherweise den Transfer von Zink-Ionen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdul, K.M., Terada, K., Yano, M., Ryan, M.T., Streimann, I., Hoogenraad, N.J. and Mori, M. (2000) Functional analysis of human metaxin in mitochondrial protein import in cultured cells and its relationship with the Tom complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 1028-1034.
- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1995) The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 6196-6205.
- Allen, S., Lu, H., Thornton, D. and Tokatlidis, K. (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem*, **278**, 38505-38513.
- Armstrong, L.C., Komiya, T., Bergman, B.E., Mihara, K. and Bornstein, P. (1997) Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J Biol Chem*, **272**, 6510-6518.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. and Schatz, G. (1990) A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature*, **348**, 605-609.
- Bauer, M.F., Gempel, K., Reichert, A.S., Rappold, G.A., Lichtner, P., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999a) Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase. *J Mol Biol*, **289**, 69-82.
- Bauer, M.F., Hofmann, S. and Neupert, W. (2002) Import of mitochondrial proteins. *Int Rev Neurobiol*, **53**, 57-90.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol*, **10**, 25-31.
- Bauer, M.F., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999b) The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-47.
- Bauer, M.F., Rothbauer, U., N, M., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999c) The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-47.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, **87**, 33-41.
- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. and Brunner, M. (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81**, 1085-1093.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S. and et al. (1992) The gene for a novel human

- lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol*, **12**, 3499-3506.
- Bomer, U., Rassow, J., Zufall, N., Pfanner, N., Meijer, M. and Maarse, A.C. (1996) The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17. *J Mol Biol*, **262**, 389-395.
- Chen, A., Wayne, S., Bell, A., Ramesh, A., Srisailapathy, C.R., Scott, D.A., Sheffield, V.C., Van Hauwe, P., Zbar, R.I., Ashley, J., Lovett, M., Van Camp, G. and Smith, R.J. (1997) New gene for autosomal recessive non-syndromic hearing loss maps to either chromosome 3q or 19p. *Am J Med Genet*, **71**, 467-471.
- Chewawiwat, N., Yano, M., Terada, K., Hoogenraad, N.J. and Mori, M. (1999) Characterization of the novel mitochondrial protein import component, Tom34, in mammalian cells. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 721-727.
- Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B. and Gitlin, J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **272**, 23469-23472.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Dekker, P.J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett*, **330**, 66-70.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 6515-6524.
- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. and Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*, **388**, 195-200.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- Edmonson, A.M., Mayfield, D.K., Vervoort, V., DuPont, B.R. and Argyropoulos, G. (2002) Characterization of a human import component of the mitochondrial outer membrane, TOMM70A. *Cell Commun Adhes*, **9**, 15-27.
- Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol*, **122**, 1003-1012.
- Endo, T. and Kohda, D. (2002) Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 3-14.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *Embo J*, **18**, 3214-3221.
- Field, L.S., Furukawa, Y., O'Halloran, T.V. and Culotta, V.C. (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem*, **278**, 28052-28059.
- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Bilanchone, V., Cumsky, M.G., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 226-233.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.

- Goping, I.S., Millar, D.G. and Shore, G.C. (1995) Identification of the human mitochondrial protein import receptor, huMas20p. Complementation of delta mas20 in yeast. *FEBS Lett*, **373**, 45-50.
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K. and Omura, T. (1993) A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J*, **12**, 1579-1586.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995) Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, **376**, 705-709.
- Hanson, B., Nuttal, S. and Hoogenraad, N. (1996) A receptor for the import of proteins into human mitochondria. *Eur J Biochem*, **235**, 750-753.
- Hazbun, T.R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B.J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B.A., Aranda, J.D., McDonald, W.H., Chiu, C.H., Snynsman, B.E., Bradley, P., Muller, E.G., Fields, S., Baker, D., Yates, J.R., 3rd and Davis, T.N. (2003) Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol Cell*, **12**, 1353-1365.
- Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C. and Winge, D.R. (2000) Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J Biol Chem*, **275**, 37582-37587.
- Heaton, D.N., George, G.N., Garrison, G. and Winge, D.R. (2001) The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. *Biochemistry*, **40**, 743-751.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J*, **20**, 1281-1288.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J*, **16**, 2217-2226.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K.D., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2002) The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **277**, 23287-23293.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J*, **15**, 2125-2137.
- Hoogenraad, N.J., Ward, L.A. and Ryan, M.T. (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 97-105.
- Hoppins, S.C. and Nargang, F.E. (2004) The Tim8-Tim13 complex in neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem*.
- Horst, M., Jenö, P., Kronidou, N.G., Bolliger, L., Oppliger, W., Scherer, P., Manning-Krieg, U., Jascur, T. and Schatz, G. (1993) Protein import into yeast mitochondria: the inner membrane import site protein ISP45 is the MPI1 gene product. *Embo J*, **12**, 3035-3041.
- Ishihara, N. and Mihara, K. (1998) Identification of the protein import components of the rat mitochondrial inner membrane, rTIM17, rTIM23, and rTIM44. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 722-732.
- Jensen, R.E. and Dunn, C.D. (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 25-34.
- Jin, H., Kendall, E., Freeman, T.C., Roberts, R.G. and Vetrie, D.L. (1999) The human family of Deafness/Dystonia peptide (DDP) related mitochondrial import proteins. *Genomics*, **61**, 259-267.

- Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S.H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S., Stevenson, R., Schwartz, C. and Vetrie, D. (1996) A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet*, **14**, 177-180.
- Johnston, A.J., Hoogenraad, J., Dougan, D.A., Truscott, K.N., Yano, M., Mori, M., Hoogenraad, N.J. and Ryan, M.T. (2002) Insertion and assembly of human tom7 into the preprotein translocase complex of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **277**, 42197-42204.
- Kaldi, K., Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *Embo J*, **17**, 1569-1576.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, **139**, 1663-1675.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B. and Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, **11**, 103-116.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. and Schatz, G. (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-2146.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J*, **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998c) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J*, **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000) Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 1187-1193.
- Komiya, T., Rospert, S., Schatz, G. and Mihara, K. (1997) Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *Embo J*, **16**, 4267-4275.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Muller, H., Jensen, R.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, **9**, 363-373.
- Kozany, C., Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2004) The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 234-241.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **278**, 48520-48523.
- Kronidou, N.G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. and Horst, M. (1994) Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12818-12822.

- Kubrich, M., Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. and Honlinger, A. (1998) The import route of ADP/ATP carrier into mitochondria separates from the general import pathway of cleavable preproteins at the trans side of the outer membrane. *J Biol Chem*, **273**, 16374-16381.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R. and Dalbey, R.E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, **13**, 510-516.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (1999) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell*, **10**, 2461-2474.
- Laity, J.H., Lee, B.M. and Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 39-46.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G. and Koehler, C.M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo J*, **18**, 4816-4822.
- Lutz, T., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, **22**, 4400-4408.
- Maarse, A.C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. and Meijer, M. (1994) Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS Lett*, **349**, 215-221.
- Matouschek, A., Pfanner, N. and Voos, W. (2000) Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep*, **1**, 404-410.
- Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995a) Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*, **80**, 127-137.
- Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995b) Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **270**, 12390-12397.
- Meisinger, C., Brix, J., Model, K., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (1999) The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: receptors and a general import pore. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 817-824.
- Mohr, J. and Mageroy, K. (1960) Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet Stat Med*, **10**, 54-62.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W. and Hell, K. (2003a) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 816-825.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2003b) Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 4945-4956.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J*, **18**, 3667-3675.
- Mukhopadhyay, A., Avramova, L.V. and Weiner, H. (2002) Tom34 unlike Tom20 does not interact with the leader sequences of mitochondrial precursor proteins. *Arch Biochem Biophys*, **400**, 97-104.
- Murphy, M.P., Leuenberger, D., Curran, S.P., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2001) The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not

- depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex. *Mol Cell Biol*, **21**, 6132-6138.
- Nelson, D.R., Felix, C.M. and Swanson, J.M. (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J Mol Biol*, **277**, 285-308.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 555-565.
- Nobrega, M.P., Bandeira, S.C., Beers, J. and Tzagoloff, A. (2002) Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, **277**, 40206-40211.
- Nuttall, S.D., Hanson, B.J., Mori, M. and Hoogenraad, N.J. (1997) hTom34: a novel translocase for the import of proteins into human mitochondria. *DNA Cell Biol*, **16**, 1067-1074.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J*, **21**, 3659-3671.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J*, **19**, 6392-6400.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. and Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, **426**, 862-866.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 339-349.
- Punter, F.A. and Glerum, D.M. (2003) Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, **278**, 30875-30880.
- Rapaport, D. (2002) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci*, **27**, 191-197.
- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, **127**, 1547-1556.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. and Pfanner, N. (2003a) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, **299**, 1747-1751.
- Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003b) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane-a guided tour. *J Mol Biol*, **326**, 639-657.
- Roesch, K., Curran, S.P., Tranebjaerg, L. and Koehler, C.M. (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*, **11**, 477-486.
- Rothbauer, U., Hofmann, S., Muhlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2001) Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 37327-37334.
- Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S. and Jensen, R.E. (1994) SMS1, a high-copy suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell*, **5**, 529-538.
- Ryan, M.T., Muller, H. and Pfanner, N. (1999) Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **274**, 20619-20627.

- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.
- Sollner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. and Neupert, W. (1989) MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell*, **59**, 1061-1070.
- Sollner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A. and Wallace, D.C. (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, **267**, 14592-14597.
- Stuart, R. (2002) Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 79-87.
- Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A. and Mihara, K. (2000) Characterization of rat TOM40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **275**, 37930-37936.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *Embo J*, **22**, 6448-6457.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Tranebjaerg, L., Hamel, B.C., Gabreels, F.J., Renier, W.O. and Van Ghelue, M. (2000) A de novo missense mutation in a critical domain of the X-linked DDP gene causes the typical deafness-dystonia-optic atrophy syndrome. *Eur J Hum Genet*, **8**, 464-467.
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R.E., May, M., Arena, F. and Barker, D. (1995) A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet*, **32**, 257-263.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, **8**, 1074-1082.
- Truscott, K.N., Wiedemann, N., Rehling, P., Muller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. and Guiard, B. (2002) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 7780-7789.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. and Pfanner, N.

- (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F.E., Go, N.E., Habib, S.J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. and Rapaport, D. (2003) Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol Biol Cell*.
- Vestweber, D., Brunner, J., Baker, A. and Schatz, G. (1989) A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site. *Nature*, **341**, 205-209.
- Wada, J. and Kanwar, Y.S. (1998) Characterization of mammalian translocase of inner mitochondrial membrane (Tim44) isolated from diabetic newborn mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 144-149.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, **424**, 565-571.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo J*, **20**, 951-960.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2004) Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: Intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J Biol Chem*.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**, 519-528.
- Yano, M., Hoogenraad, N., Terada, K. and Mori, M. (2000) Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria. *Mol Cell Biol*, **20**, 7205-7213.
- Yano, M., Kanazawa, M., Terada, K., Namchai, C., Yamaizumi, M., Hanson, B., Hoogenraad, N. and Mori, M. (1997) Visualization of mitochondrial protein import in cultured mammalian cells with green fluorescent protein and effects of overexpression of the human import receptor Tom20. *J Biol Chem*, **272**, 8459-8465.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Mühlenbein, N., Hofmann, S., Rothbauer, U., Bauer, M. F. (2004) Organization and function of the small TIM complexes acting along the import pathway of metabolite carriers into mammalian mitochondria *J Biol Chem* **279**, 13540-6.

Hofmann, S., Rothbauer, U., Mühlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K.D., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2002) The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **277**, 23287-23293.

Rothbauer, U., Hofmann, S., Mühlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2001) Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 37327-37334.

Bauer, M.F., Rothbauer, U., Mühlenbein, N., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999b) The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-47.

Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seinem Institut durchzuführen, und für sein Interesse und seine Ratschläge, mit denen er meine Projekte begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen, und meine Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Sehr herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Matthias Bauer, in dessen Labor diese Arbeit entstand, für die interessante Themenstellung und die hervorragende fachliche Betreuung bedanken. Seine Ideen und Anregungen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Sabine Hofmann für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre freundliche, wertvolle Hilfe bei der Planung vieler Experimente, mit der sie meine Arbeit entscheidend geprägt hat. Auch bei den anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe in Schwabing, Uli Rothbauer und Bettina Treske, bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Herrn Helmuth Hartl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Klüfers danke ich für die Messung der ICP-Spektren.

Darüber hinaus danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neupert für ihre Hilfsbereitschaft und viele interessante Diskussionen, darunter besonders Christian Kozany, Maxi Endres, Uwe Ahting, Nadja Terziyska, Stefan Paschen, Carsten Bornhövd, Marc Preuss, Tom Lutz, Mark Herlan und Florian Fuchs sowie allen Gruppenleitern. Den Mitarbeiterinnen des Sekretariats danke ich für ihre Unterstützung in allen Verwaltungsangelegenheiten. Auch an das Team vom Hasenstall richtet sich mein Dank für die fürsorgliche Pflege der Hasen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums bedanken.

Lebenslauf

Nicole Mühlenbein

geboren am 20.09.1974 in Niedermarsberg

Schulausbildung

1980-1984	Grundschule in Essen-Kettwig
1984-1993	Theodor-Heuss-Gymnasium in Essen-Kettwig
Juni 1993	Abitur

Studium

Okt. 1993 - März 1999	Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg
Sept. 1996 - März 1997	Auslandssemester an der Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, Frankreich
Feb 1998	Diplomprüfungen in Chemie
März 1998 - März 1999	Diplomarbeit am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg im Labor von Prof. Dr. B. Kadenbach Titel: 'Isolierung und Sequenzierung der Untereinheiten Vb und VIb, VIIb und VIIc der Cytochrom c-Oxidase aus Fischen und Vogel und evolutionäre Betrachtungen'
Okt. 1999	Beginn der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. W. Neupert im Labor von PD Dr. Matthias Bauer am Institut für Diabetesforschung in München