

# **Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine**

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

von  
Thomas Waizenegger  
aus  
Ochsenhausen

München  
2005

Dissertation eingereicht am 12.05.2005

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
- 2. Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger
- Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Struktur, Herkunft und Funktion von Mitochondrien</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Biogenese von Mitochondrien</b>	<b>2</b>
1.2.1. Proteinimport in Mitochondrien - eine Übersicht	3
1.2.2. Mitochondriale Signalsequenzen	5
1.2.3. Die Translokase der mitochondrialen Außenmembran	7
1.2.4. Die TIM23-Translokase	10
1.2.5. Die TIM22-Translokase	12
1.2.6. Die OXA1-Translokase	13
<b>1.3. Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine</b>	<b>14</b>
1.3.1. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine	14
1.3.2. Signalsequenzen mitochondrialer Außenmembranproteine	16
1.3.3. Biogenese der $\beta$ -Barrel-Proteine Porin und Tom40	17
<b>1.4. Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>19</b>
2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
2.1.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.1.3. Enzymatische Modifikation von DNA	20
2.1.3.1. Restriktionsverdau von DNA	20
2.1.3.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	21
2.1.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	21
2.1.4. Reinigung und Analyse von DNA	21
2.1.4.1. Gelelektrophorese von DNA	21
2.1.4.2. Elution von DNA aus Agarosegelen	22
2.1.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA	22
2.1.5. Einführung von Punktmutationen mit dem <i>QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	22
2.1.6. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	23
2.1.7. Verwendete Plasmide	23
<b>2.2. Methoden der Hefegenetik</b>	<b>25</b>
2.2.1. Verwendete Hefestämme	25
2.2.2. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2.3. Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“)	28
2.2.4. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.5. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	29
<b>2.3. Methoden der Proteinbiochemie</b>	<b>29</b>
2.3.1. Präparation von Proteinen	29
2.3.1.1. Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	29
2.3.1.2. Reinigung rekombinanter Proteine mit Histidin-Anhang aus <i>E. coli</i>	31
2.3.1.3. Reinigung rekombinanter Proteine mit MBP-Anhang aus <i>E. coli</i>	31
2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.3.3. High Tris-Harnstoff SDS-PAGE	33
2.3.4. Blaue Nativgelelektrophorese (BNGE)	33
2.3.5. Coomassie-Färbung von Gelen	34
2.3.6. Silberfärbung von Gelen	34
2.3.7. Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen	35
2.3.8. Autoradiographie	35

2.3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	36
2.3.10. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	36
2.3.11. Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat .....	36
2.3.12. Gelfiltration .....	36
<b>2.4. Methoden der Zellbiologie.....</b>	<b>37</b>
2.4.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe .....	37
2.4.2. Isolierung von Rohmitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.4.3. Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.4.4. Subfraktionierung von Hefezellen.....	38
2.4.5. <i>In vitro</i> Proteinimport in isolierte Mitochondrien .....	39
2.4.6. Erzeugung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen.....	40
2.4.7. Carbonatextraktion .....	40
2.4.8. Antikörpershift .....	41
2.4.9. Fluoreszenzmikroskopie.....	41
2.4.10. Affinitätsfällung von Tob55 mit Ni-NTA-Agarose .....	41
2.4.11. Affinitätsfällung von Tob38 mit Ni-NTA-Agarose .....	42
<b>2.5. Immunologische Methoden .....</b>	<b>43</b>
2.5.1. Hergestellte Antikörper .....	43
2.5.2. Gewinnung polyklonaler Kaninchen-Antiseren .....	43
2.5.3. Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Antikörperreinigung.....	44
2.5.3.1. Kopplung von Peptiden an SulfoLink Gel.....	44
2.5.3.2. Kopplung rekombinanter Proteine an CNBr (Cyanbromid)-aktivierte Sepharose.....	44
2.5.4. Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	45
2.5.5. Reinigung von Immunglobulin G.....	46
2.5.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western Blot).....	46
2.5.7. Koimmunfällung .....	47
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von Signal-Anker-Domänen mitochondrialer Außenmembranproteine .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Signalsequenz von Tom20 .....	48
3.1.2. Charakterisierung der Signalsequenz von Tom20.....	49
3.1.3. Moderate Hydrophobizität ist entscheidend für die Funktion der Signal-Anker-Domäne von Tom20..	53
3.1.4. Die Signal-Anker-Domäne von Tom20 ist nicht ausreichend für die Assemblierung in den TOM- Komplex .....	55
3.1.5. OM45 ist ein Signal-Anker-Protein.....	56
3.1.6. Die Signal-Anker-Domänen von OM45 und Tom70 können diejenige von Tom20 funktionell ersetzen.....	58
3.1.7. Die Signal-Anker-Domäne von Tom70 .....	59
3.1.8. Die mitochondriale Signalsequenz von OM45.....	60
<b>3.2. Importmechanismus von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne .....</b>	<b>62</b>
3.2.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung des <i>in vitro</i> Imports von Tom20 .....	62
3.2.2. Der Import von Tom20 ist unabhängig von Importrezeptoren.....	64
3.2.3. Signal-Anker-Proteine werden nicht über die Pore des TOM-Komplexes importiert.....	65
3.2.4. Der TOM-Komplex ist am Import von Signal-Anker-Proteinen beteiligt.....	67
<b>3.3. Identifizierung des TOB-Komplexes .....</b>	<b>69</b>
3.3.1. Identifizierung von Tob55.....	69
3.3.2. Tob55 ist essenziell für die Biogenese von $\beta$ -Barrel-Membranproteinen .....	69
3.3.3. Tob55 ist Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes .....	72
<b>3.4. Identifizierung und Charakterisierung von Tob38, eine neue essenzielle Komponente in der Biogenese von mitochondrialen <math>\beta</math>-Barrel-Proteinen.....</b>	<b>73</b>
3.4.1. Identifizierung von Tob38.....	73
3.4.2. Tob38 ist ein peripheres Außenmembranprotein .....	74

3.4.3. Tob38 ist eine Komponente des TOB-Komplexes.....	75
3.4.4. Tob38 ist beteiligt an der Membraninsertion von $\beta$ -Barrel-Proteinen.....	78
<b>3.5. Mim1, ein Protein welches für die Assemblierung des TOM-Komplexes benötigt wird .....</b>	<b>81</b>
3.5.1. Mim1 ist ein mitochondriales Protein .....	81
3.5.2. Mim1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran .....	82
3.5.3. Die Depletion von Mim1 führt zu geringeren Mengen an Tom-Komponenten in Mitochondrien.....	83
3.5.4. Mim1 ist für die Assemblierung des TOM-Komplexes notwendig und Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes .....	84
<b>4. Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von Signal-Anker-Domänen .....	90
4.2. Import von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne .....	93
4.3. Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des TOB-Komplexes.....	96
4.4. Die Rolle von Tob38 bei der Biogenese von $\beta$ -Barrel-Proteinen der mitochondrialen Außenmembran.....	98
4.5. Die Funktion von Mim1 bei der Assemblierung des TOM-Komplexes.....	100
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>7. Abkürzungen</b>	<b>128</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Struktur, Herkunft und Funktion von Mitochondrien

Alle eukaryotischen Zellen sind in mehrere membranumschlossene subzelluläre Kompartimente, die Zellorganellen, unterteilt. Diese beherbergen jeweils einen für sie charakteristischen Satz von Proteinen. Das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Lysosomen und Peroxisomen besitzen eine Membran, wohingegen Chloroplasten, Mitochondrien und der Zellkern (Nukleus) von zwei Membranen umschlossen sind. In Mitochondrien definieren diese zwei Membranen vier Subkompartimente: die Außenmembran (AM) und die Innenmembran (IM) sowie zwei wässrige Kompartimente, den Intermembranraum (IMR) und die Matrix. Die Fläche der Innenmembran ist durch Invagination in falten- oder röhrenartige Cristae stark vergrößert (Reichert und Neupert, 2002).

Mitochondrien sind aufgrund ihrer evolutionären Abstammung, die von der Endosymbiontentheorie beschrieben wird (Gray et al., 1999), von zwei Membranen umschlossen. Mitochondriale Genome sind auf ein frei lebendes aerobes  $\alpha$ -Proteobakterium zurückzuführen, wie durch Analyse mitochondrialer Gene sowie ihrer genomischen Organisation und Verteilung gezeigt werden kann. Die heutige eukaryotische Zelle ist demnach durch Endosymbiose von aeroben Eubakterien mit einer anaeroben Proto-eukaryotischen Urzelle entstanden. Dies erklärt warum Mitochondrien noch mehrere typisch bakterielle Eigenschaften aufweisen (Gray et al., 1999). Unter anderem besitzen sie ihr eigenes, ringförmiges Chromosom sowie 70S-Ribosomen. Das mitochondriale Genom kodiert nur für ca. 1% der mitochondrialen Proteine (8 Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* und 13 in *Homo sapiens*), während der überwiegende Anteil von nukleärer DNA kodiert wird.

In diesem endosymbiontischen Prozess, welcher vor ungefähr 1,5 Milliarden Jahren stattgefunden hat, sind Mitochondrien für eukaryotische Zellen essenziell geworden. Sie erfüllen eine Vielzahl metabolischer Aufgaben. Dazu gehören die Bildung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung, der Zitronensäure-Zyklus (Krebszyklus) in der Matrix, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, der Harnstoffzyklus, die Ketonkörpersynthese, die Hämbiosynthese und der Aminosäuremetabolismus. Des Weiteren sind Mitochondrien an der Synthese vieler Coenzyme und der Assemblierung von Eisen-Schwefel-Klustern beteiligt (Lill und Kispal, 2000; Mühlhoff und Lill, 2000; Saraste, 1999). Neben diesen metabolischen Aufgaben spielen Mitochondrien auch eine Schlüsselrolle beim

programmierten Zelltod (Apoptose). Das Freisetzen des Cytochrom *c*, des Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) und mehrerer anderer Proteine aus Mitochondrien führt zur Apoptose (Jiang und Wang, 2004). Mitochondrien sind auch in der Lage bei starkem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration Calcium-Ionen aufzunehmen und später wieder abzugeben. Sie spielen folglich eine wichtige Rolle bei der Calcium-Homöostase der Zelle (Gunter et al., 2004). Darüber hinaus bedingt eine beeinträchtigte mitochondriale Funktion das Altern eines Organismus. Die Akkumulation von Mutationen in mitochondrialer DNA (mtDNA) führt zu frühzeitigem Altern von Mäusen, die eine fehleranfällige mitochondriale DNA-Polymerase exprimieren (Trifunovic et al., 2004). Die Bedeutung der Mitochondrien wird durch die zunehmende Anzahl an Krankheiten unterstrichen, die auf Fehler in der mitochondrialen Funktion zurückzuführen sind. Beispielsweise führt ein Defekt in der Eisen-Schwefel-Kluster-Biogenese zur neurodegenerativen Erkrankung Friedreichs Ataxie (Puccio und Koenig, 2000) und Mutationen im OPA1-Gen, welches für eine mitochondriale Dynamin-verwandte GTPase kodiert, führen zur autosomal dominanten Optikusatrophie (Alexander et al., 2000).

Mitochondrien sind dynamische Strukturen, die sich innerhalb der Zellen bewegen, sich ständig teilen und fusionieren. Sie sind häufigen Änderungen in ihrer Anzahl und Gestalt in Abhängigkeit der Verfügbarkeit an Metaboliten und des Entwicklungsstadiums der Zelle unterzogen (Reichert und Neupert, 2002). Diese dynamischen Prozesse reichen aus, um eine geeignete Verteilung der Mitochondrien während der Zellteilung sicherzustellen und genügend ATP in jenen cytoplasmatischen Regionen, in denen der Energieverbrauch besonders hoch ist, bereitzustellen (Yoon und McNiven, 2001).

Mitochondrien entstehen durch Teilung bereits bestehender Organellen, können also nicht *de novo* gebildet werden.

## 1.2. Biogenese von Mitochondrien

Die Unterteilung eukaryotischer Zellen in verschiedene Zellorganellen stellt ein fundamentales Problem für die richtige Lokalisation von Proteinen dar. Mitochondrien besitzen ca. 800 (*Saccharomyces cerevisiae*) bzw. 1500 (*Homo sapiens*) verschiedene Proteine, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Sickmann et al., 2003; Taylor et al., 2003; Truscott et al., 2003a; Westermann und Neupert, 2003).

Ähnlich wie Proteine anderer Organellen, wie z. B. Peroxisomen, werden mitochondriale Proteine an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und größtenteils

posttranslational zu den Mitochondrien transportiert (Holroyd und Erdmann, 2001; Jensen und Dunn, 2002; Koehler et al., 1999b; Neupert, 1997; Pfanner und Geissler, 2001; Robinson et al., 2001; Schnell und Hebert, 2003; Soll und Schleiff, 2004). Die oft sehr hydrophoben Proteine müssen durch die wässrige Umgebung des Cytosols transportiert werden. Die Vorstufenproteine werden dabei durch molekulare Chaperone in einer importkompetenten Konformation gehalten. Je nach Organismus interagieren Mitglieder der Hsp70- oder Hsp90-Familie sowie spezifische Faktoren wie der mitochondriale Import stimulierende Faktor (MSF) mit den Vorstufenproteinen (Deshaies et al., 1988; Hachiya et al., 1994; Murakami et al., 1988; Young et al., 2003). Allerdings trägt auch kotranslationaler Import, zumindest von manchen Proteinen, zur mitochondrialen Biogenese bei (Knox et al., 1998; Marc et al., 2002; Stein et al., 1994).

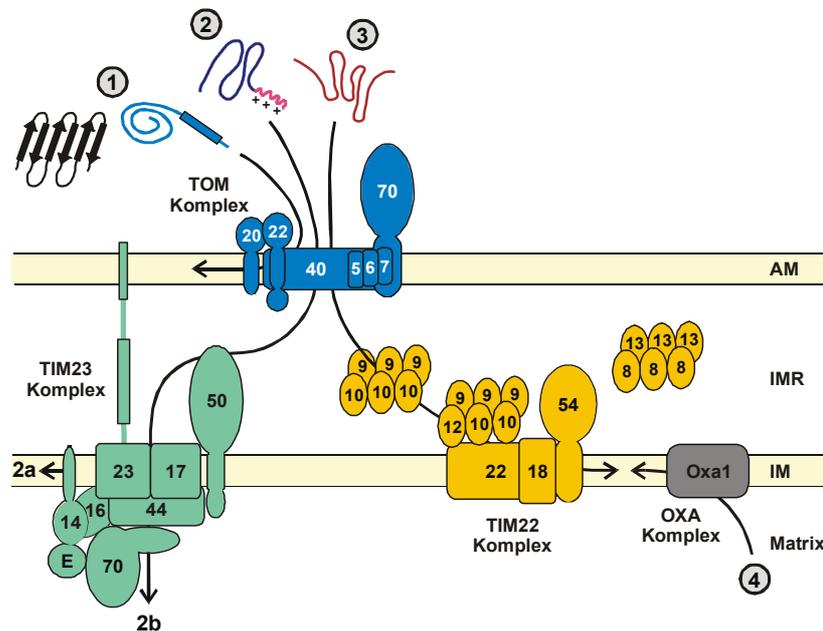
Sowohl die kernkodierte mitochondrialen Proteine als auch Vorstufenproteine anderer Organellen besitzen sogenannte Signalsequenzen, die sowohl ausreichend als auch notwendig sind, um diese Proteine zu ihren intrazellulären Zielorten zu dirigieren. Diese Signalsequenzen kommen entweder in Form von N-terminal abspaltbaren Verlängerungen oder als Teil der Sequenz des reifen Proteins vor (Blobel, 1980). Sie werden von Proteinmaschinen der Zielorganellen dekodiert, die die Proteine zu ihren Zielorten dirigieren. Solche Poren bildenden Multiproteinkomplexe, sogenannte Translokasen, kommen auch in der mitochondrialen Außen- und Innenmembran vor. Sie übernehmen die vom Cytosol kommenden Vorstufenproteine und organisieren deren weiteren Transport innerhalb der Mitochondrien (Jensen und Dunn, 2002; Koehler et al., 1999b; Neupert, 1997; Pfanner und Geissler, 2001; Schnell und Hebert, 2003).

### **1.2.1. Proteinimport in Mitochondrien - eine Übersicht**

Die mitochondrialen Vorstufenproteine werden auf der Oberfläche der Organellen von Rezeptoren, welche Bestandteile der Translokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM) sind, erkannt (Abb. 1) (Abe et al., 2000; Bolliger et al., 1995; Brix et al., 1997; Söllner et al., 1992). Die Vorstufenproteine können nicht in gefaltetem Zustand über die mitochondrialen Membranen transportiert werden. Sie müssen zumindest teilweise entfaltet vorliegen, um durch die Importkanäle zu passen (Eilers und Schatz, 1986; Wiedemann et al., 2001).

Importierte Vorstufenproteine werden, nachdem sie die Außenmembran über den von Tom40 gebildeten Kanal des TOM-Komplexes (Dekker et al., 1998; Künkele et al., 1998;

Söllner et al., 1992) überquert haben, zu einer der beiden Translokasen der mitochondrialen Innenmembran (TIM) dirigiert (Abb. 1).



**Abb. 1. Mitochondriale Translokasen und Importwege.** 1) Sowohl Außenmembranproteine mit N- oder C-terminalen Membranankern als auch  $\beta$ -Barrel-Proteine werden mit Hilfe des TOM-Komplexes in die Außenmembran eingebaut. 2) Vorstufenproteine mit Präsequenz werden durch die TIM23-Translokase in die Matrix oder in die Innenmembran importiert. 3) Der Einbau von Vorstufenproteinen mit internen Signalsequenzen in die Innenmembran, insbesondere von Mitgliedern der Familie der Metabolitransporter (*Carrier*), erfolgt mittels des TIM22-Komplexes. 4) Oxa1 vermittelt den Einbau von sowohl nukleär als auch mitochondrial kodierten Proteinen von der Matrixseite in die Innenmembran. Weitere Details siehe Text. AM, Außenmembran; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran; E, Mge1; 70, mtHsp70. Die Zahlen der Tom- und Tim-Proteine entsprechen ihrer relativen molekularen Masse.

Alle Vorstufenproteine mit Präsequenz, einschließlich der zahlreichen Matrixproteine, werden über den TIM23-Komplex importiert, der einen Kanal in der Innenmembran bildet (Bauer et al., 1996; Dekker et al., 1997; Lohret et al., 1997). Für die Funktion der TIM23-Translokase ist das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) über die Innenmembran notwendig (Martin et al., 1991). Als zusätzliche Energiequelle wird ATP benötigt, um die Translokation in die Matrix abzuschließen. Das mitochondriale Hitzeschockprotein 70 (mtHsp70) bildet die zentrale Komponente eines ATP-abhängigen Motors, welcher für den Import von Vorstufenproteinen in die Matrix verantwortlich ist (Horst et al., 1997; Kang et al., 1990; Schneider et al., 1996; Voos et al., 1996). In der Matrix wird die Präsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten (Hawlitsek et al., 1988) und das Protein faltet in seine aktive Form. Bei diesem Prozess können verschiedene Proteine wie z. B. Hsp70, das Chaperonin Hsp60 oder Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen assistieren (Kang et al., 1990; Ostermann et al., 1989; Rassow et al., 1995; Rospert et al., 1996).

Hydrophobe Innenmembranproteine ohne Präsequenz mit mehreren Transmembrandomänen, wie die Metabolitransporter, werden nach dem Überqueren der Außenmembran auf einem unterschiedlichen Weg importiert. Sie werden mit Hilfe von Komplexen der „kleinen“ Tim-Proteine des Intermembranraums zu einer zweiten TIM-Translokase, dem sogenannten TIM22-Komplex dirigiert. Dieser vermittelt ihren  $\Delta\Psi$ -abhängigen Einbau in die Innenmembran (Kerscher et al., 1997; Koehler et al., 1998; Sirrenberg et al., 1996; Sirrenberg et al., 1998).

Manche hydrophobe Innenmembranproteine, die entweder vom mitochondrialen Genom kodiert werden oder kernkodiert sein können, werden von der Matrixseite aus mit Hilfe der OXA1-Translokase in die Innenmembran eingebaut (Stuart und Neupert, 1996). Nach dem Modell der „konservativen Sortierung“ (Hartl und Neupert, 1990) werden diese kernkodierten Innenmembranproteine zuerst vollständig in die Matrix transportiert und anschließend in einem zweiten Sortierungsprozeß in die Innenmembran exportiert. Dieser Prozeß ist von den prokaryotischen Vorläufern der Mitochondrien erhalten geblieben und ähnelt somit dem bakteriellen Export von Proteinen aus dem Cytoplasma in die Plasmamembran.

### 1.2.2. Mitochondriale Signalsequenzen

Die klassische mitochondriale Signalsequenz ist eine aminoterminal abspaltbare Präsequenz, die als Matrix-Zielsignal fungiert. Präsequenzen bestehen aus 10-80 Aminosäureresten, von denen die überwiegende Anzahl positiv geladen, hydrophob oder hydroxyliert ist (von Heijne et al., 1989). Wenn mitochondriale Präsequenzen an „Passenger“-Proteine fusioniert werden, führt dies zum spezifischen Import des Fusionsproteins in Mitochondrien (Horwich et al., 1985; Hurt et al., 1984). Präsequenzen bilden in Membranen oder in einer Membran-ähnlichen Umgebung amphipathische  $\alpha$ -Helices mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite (Abe et al., 2000; Epanand et al., 1986; Roise et al., 1986; Roise et al., 1988). Lange wurde angenommen, die positiven Ladungen der Präsequenzen seien entscheidend für die Erkennung durch Importrezeptoren und die amphipathische Eigenschaft begünstige den Einbau in die Außenmembran. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die verschiedenen Oberflächen einer Präsequenz von unterschiedlichen Rezeptorproteinen des TOM-Komplexes erkannt werden könnten: die hydrophobe Seite von Tom20 und die positiv geladene Seite von Tom22 (Brix et al., 1997). Die erste hochauflösende Struktur eines Vorstufenprotein-Rezeptors zusammen mit einer Signalsequenz zeigte tatsächlich, dass die hydrophoben Reste entscheidend für die Interaktion

mit der Bindestelle von Tom20 sind (Abe et al., 2000). Während die Präsequenzen der meisten Matrixproteine nach dem Import durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase abgespalten werden, gibt es auch eine Anzahl von Matrixproteinen, wie z. B. Rhodanese, 3-Oxo-Acyl-CoA-Thiolase und Chaperonin 10 (Hsp10), mit nicht abspaltbaren N-terminalen Signalsequenzen. Diese besitzen sehr ähnliche Charakteristika wie die abspaltbaren Signale (Hammen et al., 1996; Jarvis et al., 1995; Waltner und Weiner, 1995). Bisher wurde ein Matrixprotein, die DNA-Helikase Hmi1, mit einer C-terminalen präsequenzartigen Signalsequenz charakterisiert (Lee et al., 1999).

Signale, die einen Abschnitt mit positiv geladenen Aminosäureresten enthalten, sind auch in Vorstufenproteinen der Außenmembran, des Intermembranraums und der Innenmembran zu finden. In diesen Fällen werden die positiv geladenen Sequenzen durch hydrophobe Sortiersignale ergänzt, die zum spezifischen Arrest der Vorstufenproteine in der Außen- oder Innenmembran führen (Gärtner et al., 1995a; Glick et al., 1992; Hahne et al., 1994).

Manche Innenmembranproteine enthalten eine interne Signalsequenz, die aus einer Transmembrandomäne und einem darauf folgenden positiv geladenen Segment besteht. Ein Beispiel hierfür ist das mitochondriale Innenmembranprotein BCS1, welches allerdings noch eine zusätzliche dritte Domäne als Teil seiner Signalsequenz besitzt. Hauptsächlich diese Region wird auf der mitochondrialen Oberfläche durch die Importrezeptoren erkannt. Das BCS1-Vorstufenprotein wird in einer Schleifenstruktur durch den TOM-Komplex transportiert. Nachdem es diesen passiert hat sind alle drei Elemente der Signalsequenz für das intramitochondriale Sortieren in die Innenmembran notwendig (Fölsch et al., 1996; Stan et al., 2003).

Metabolittransporter der Innenmembran besitzen keine abspaltbaren Präsequenzen, sondern enthalten drei bis sechs interne Signalsequenzen, die über die gesamte Länge des Vorstufenproteins verteilt sind (Brix et al., 1999; Endres et al., 1999; Wiedemann et al., 2001). Andere Membranproteine, wie die Komponenten der Innenmembrantranslokasen (Tim17, Tim23 und Tim22), enthalten auch mehrere Ziel- und Sortiersignale einschließlich hydrophober Segmente und positiv geladener Schleifen (Davis et al., 1998; Davis et al., 2000; Kaldi et al., 1998; Paschen et al., 2000).

Die Signalsequenzen von Außenmembranproteinen werden als Thema dieser Arbeit im Kapitel über die Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine detailliert diskutiert (siehe 1.3.2.).

### **1.2.3. Die Translokase der mitochondrialen Außenmembran**

Der Großteil der gegenwärtigen Erkenntnisse über die Translokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM-Komplex) wurde durch Studien in *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* erhalten. Die TOM-Komplexe höherer Organismen, wie z. B. Säuger und Pflanzen, enthalten homologe Komponenten zu den Untereinheiten aus Pilzen und scheinen eine ähnliche Gesamtstruktur zu besitzen (Braun und Schmitz, 1999; Mori und Terada, 1998; Suzuki et al., 2000). Der TOM-Komplex ist für die Translokation von beinahe allen kernkodierten mitochondrialen Vorstufenproteinen über bzw. ihre Insertion in die Außenmembran verantwortlich. Der TOM-Holokomplex, welcher alle Tom-Untereinheiten enthält, besteht aus sieben Membranproteinen: Tom70, Tom40, Tom22, Tom20, Tom7, Tom6 und Tom5 (Abb. 1) (Neupert, 1997; Pfanner und Geissler, 2001). Innerhalb des TOM-Komplexes fungieren Proteine mit zum Cytosol exponierten Domänen, wie Tom20, Tom22 und Tom70 als Rezeptoren (Hines et al., 1990; Hines und Schatz, 1993; Kiebler et al., 1993; Moczko et al., 1992; Söllner et al., 1989). Tom20 und Tom70 sind über Tom22 lose mit dem TOM-Kernkomplex assoziiert, welcher aus den Komponenten Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 besteht und auch als generelle Import-/Insertionspore (GIP) bezeichnet wird (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998; Künkele et al., 1998). Tom20 und Tom22 sind an der Translokation der meisten Vorstufenproteine, insbesondere jener mit N-terminalen Signalsequenzen, beteiligt (Harkness et al., 1994; Lithgow et al., 1995). Allerdings werden auch Proteine ohne Präsequenz an der mitochondrialen Oberfläche von Tom20 erkannt, wie die Außenmembranproteine Porin (Schleiff et al., 1999) und Tom40 (Rapaport und Neupert, 1999), sowie das Intermembranraumprotein Cytochrom *c* Häm-Lyase (Diekert et al., 1999).

Tom70 bildet die Bindestelle für mitochondriale Vorstufenproteine mit internen Signalsequenzen, insbesondere für die Familie der Metabolitransporter (Brix et al., 1999; Schlossmann et al., 1994). Diese *Carrier*-Vorstufenproteine überqueren die Außenmembran nicht in linearer Form, sondern bilden eine Schleife (Wiedemann et al., 2001). Die beiden Rezeptoren Tom20 und Tom70 scheinen allerdings eine gewisse redundante Funktion zu besitzen, da in Hefe nur die Deletion beider Proteine letal ist (Ramage et al., 1993). Tom70 hat die Tendenz, Dimere zu bilden. Bei dieser Dimerisierung spielt die Transmembrandomäne des Proteins eine wichtige Rolle (Millar und Shore, 1994; Söllner et al., 1992). Tom70 enthält sieben Tetratricopeptid Wiederholungen (TPR), wohingegen Tom20 nur eine solche Domäne besitzt, die vermutlich für Protein-Protein Interaktionen entscheidend ist (Hauke et al., 1996). Sowohl Tom20 als auch Tom70 interagieren mit cytosolischen Chaperonen (Yano et

al., 2003; Young et al., 2003). Diese Interaktion ist für den Transport von den mit Chaperonen assoziierten Vorstufenproteinen zu Mitochondrien essenziell. In *S. cerevisiae* interagiert Tom70 mit Hsp70. In Säugern sind Tom70-abhängige Vorstufenproteine im Cytosol sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90 in einem Multichaperonkomplex assoziiert und die Bindung von Hsp90 und/oder Hsp70 an Tom70 erfolgt über eine spezialisierte TPR-Domäne des Rezeptors (Young et al., 2003). Im Falle von humanem Tom20 interagiert das C-terminale saure Segment des Rezeptors mit TPR-Motiven des Arylhydrokarbon-Rezeptor-interagierenden Proteins (AIP), welches seinerseits spezifisch mitochondriale Vorstufenproteine bindet (Yano et al., 2003). In *S. cerevisiae* konnte eine weitere Rezeptorkomponente, Tom71, identifiziert werden, die zu 53% identisch mit Tom70 ist und eine Ähnlichkeit von 70% zu diesem Protein zeigt. Allerdings besitzen diese beiden Rezeptoren nicht dieselben Funktionen. Der Import von Tom70-abhängigen Vorstufenproteinen wird durch Deletion von Tom71 nur minimal beeinflusst, unabhängig davon ob Tom70 vorhanden ist oder nicht. Die Funktion von Tom71 ist bis heute weitestgehend unklar (Schlossmann et al., 1996).

Die beiden Rezeptoren Tom20 und Tom70 transferieren die gebundenen Vorstufenproteine zur GIP. Dabei spielt Tom22 eine entscheidende Rolle. Einerseits interagiert die cytosolische Domäne von Tom22 mit der hydrophilen Seite der Präsequenzen (Brix et al., 1997) und dient als weiterer Rezeptor. Allerdings scheinen die vielen negativ geladenen Aminosäurereste in dieser Region von Tom22 weder für das Binden noch für den Import mitochondrialer Vorstufenproteine essenziell zu sein (Nargang et al., 1998). Andererseits ist Tom22 ein integraler Bestandteil der generellen Insertionspore (van Wilpe et al., 1999). Tom22 sorgt, eventuell zusammen mit Tom5, für die Insertion der Polypeptidkette in den TOM-Kanal (Dietmeier et al., 1997).

Dieser Kanal wird hauptsächlich von Tom40, einer essenziellen Tom-Komponente, gebildet (Ahting et al., 2001; Baker et al., 1990; Hill et al., 1998). Er ist spannungsabhängig und kationenselektiv und bindet mitochondriale Präsequenzen (Pfanner und Chacinska, 2002).

Die Funktionen der „kleinen“ Tom-Proteine sind noch nicht ganz klar. Tom5 wurde eine rezeptorartige Funktion bei der Übernahme von Vorstufenproteinen vom Rezeptor Tom22 zugeschrieben. Außerdem scheint es auch für die anschließende Insertion der Polypeptidkette in die Translokationspore benötigt zu werden (Dietmeier et al., 1997). Gegen eine Rezeptorfunktion von Tom5 spricht jedoch, dass Fusionsproteine, bestehend aus der *Tail-anchor*-Domäne von Tom5 (Transmembrandomäne mit flankierenden Regionen) und

dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) bzw. der cytosolischen Domäne von Fis1, den temperatursensitiven Wachstumsphänotyp des *Atom5*-Hefestammes komplementieren konnten (Habib et al., 2003; Horie et al., 2003; Schmitt et al., 2005). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tom5 eher für die strukturelle Integrität des TOM-Komplexes benötigt wird (Schmitt et al., 2005). Tom6 und Tom7 scheinen an der Regulation der Assemblierung und Disassemblierung von Rezeptorproteinen mit der generellen Insertionspore beteiligt zu sein (Dekker et al., 1998; Honlinger et al., 1996). Tom6 und Tom7 befinden sich in der näheren Umgebung von Tom40, wobei Tom6 wahrscheinlich für die Assemblierung von Tom22 mit Tom40 notwendig ist (Dembowski et al., 2001). Tom7 scheint den TOM-Komplex zu destabilisieren bzw. die Dissoziation der Translokase zu unterstützen, so dass ein kontinuierlicher Austausch von Tom-Proteinen ermöglicht wird (Dekker et al., 1998; Honlinger et al., 1996).

Die Größe des TOM-Holokomplexes mit allen Tom-Untereinheiten wurde mittels Gelfiltration auf 490-600 kDa geschätzt (Ahting et al., 1999; Künkele et al., 1998), wohingegen der TOM-Kernkomplex ohne die Rezeptoren Tom20 und Tom70 gemäß Gelfiltration und blauer Nativgelelektrophorese (BNGE) ein geschätztes Molekulargewicht von 400-410 kDa hat (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998). Die Genauigkeit dieser Molekulargewichtsangaben ist durch die Anwesenheit unbekannter Mengen an Detergenz in diesen Präparationen und durch die Tatsache, dass lösliche Markerproteine zur Größenbestimmung von Membranproteinen verwendet wurden, begrenzt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstitutionen von gereinigten TOM-Komplexen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* zeigten eine Struktur mit zwei bis drei Poren (Ahting et al., 1999; Künkele et al., 1998; Model et al., 2002). Jede Pore entspricht wahrscheinlich einem proteinleitenden Kanal mit einem Durchmesser von etwa 2 nm und kann somit eine größtenteils ungefaltete Polypeptidkette oder bis zu zwei  $\alpha$ -Helix-Strukturen aufnehmen. Elektrophysiologische Messungen mit rekonstituierten Kanälen ergaben einen Durchmesser von ca. 2,2 nm (Hill et al., 1998) und bei Messungen mit Goldpartikeln wurde der innere Durchmesser des Importkanals mit 2,0-2,6 nm bestimmt (Schwartz und Matouschek, 1999). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Werten, die mittels 3D-Rekonstitutionen erhalten wurden, überein.

Für die Translokation von Vorstufenproteinen über die Außenmembran ist weder das Membranpotential über die Innenmembran noch ATP notwendig. Nach der „*Binding-chain*“-Hypothese binden Vorstufenproteine mit Präsequenz sequenziell an Bindestellen mit zunehmender Affinität. Zuerst erfolgt die Interaktion mit der dem Cytosol zugewandten *cis*-

Bindungsstelle des TOM-Komplexes, die höchstwahrscheinlich von den cytosolischen Domänen der Rezeptoren Tom20 und Tom22 gebildet wird. Die *trans*-Bindungsstelle auf der Innenseite der Außenmembran wird von Tom40 und der C-terminalen Domäne von Tom22 sowie von Tom7 gebildet (Bolliger et al., 1995; Endo und Kohda, 2002; Esaki et al., 2004; Meisinger et al., 2001; Moczko et al., 1997; Schatz, 1997). Die Bindung an die *trans*-Seite erfolgt mit höherer Affinität als an die *cis*-Seite (Mayer et al., 1995b; Rapaport et al., 1998; Stan et al., 2000). Dabei spielen sowohl ionische als auch hydrophobe Interaktionen eine Rolle. Der TIM23-Komplex übernimmt schließlich die an die *trans*-Bindungsstelle gebundenen Vorstufenproteine (Endo et al., 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Translokation über die Außenmembran durch sequenzielle Interaktionen der Vorstufenproteine mit verschiedenen Modulen des TOM-Komplexes, welche die Proteine mit zunehmender Affinität binden, gewährleistet wird.

### 1.2.4. Die TIM23-Translokase

Nach der Translokation über die Außenmembran durch den TOM-Komplex interagieren mitochondriale Proteine mit Präsequenzen mit dem TIM23-Komplex der Innenmembran (Abb. 1) (Bauer et al., 1996; Dekker et al., 1997). Dieser besteht aus acht essenziellen Proteinen, die als Präsequenzrezeptor, Translokationskanal bzw. Importmotor auf der Matrixseite fungieren (Rehling et al., 2004). Die erste Komponente des Komplexes, die mit den vom TOM-Komplex kommenden Vorstufenproteinen interagiert, ist Tim50. Dieses besitzt eine große Domäne im Intermembranraum, welche an Tim23 bindet und vermutlich als Präsequenzrezeptor fungiert, der die Vorstufenproteine weiter zur Tim23-Pore dirigiert (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002). Der Kern der TIM23-Translokase wird von einem 90 kDa Komplex gebildet, der aus den beiden Proteinen Tim23 und Tim17 besteht. Beide Proteine besitzen eine membranintegrierte Domäne mit vier vorhergesagten Transmembransegmenten (Emtage und Jensen, 1993; Kübrich et al., 1994). Tim23 erfüllt mindestens zwei verschiedene Funktionen. Erstens fungiert der Aminoterminus von Tim23 als Rezeptor für Präsequenzen auf der Intermembranraumseite der Innenmembran (Bauer et al., 1996; Komiya et al., 1998). Zweitens bildet Tim23 eine Pore in der Innenmembran mit ca. 1,3 nm Durchmesser, durch die ungefaltete Proteine über die Innenmembran transportiert werden können (Truscott et al., 2001). Darüber hinaus ist der Aminoterminus von Tim23 in der Außenmembran verankert, so dass Tim23 beide Membranen durchspannt (Donzeau et al., 2000). Durch diese Topologie wird vermutlich der Transfer von Vorstufenproteinen vom TOM- zum TIM23-Komplex erleichtert. Die Funktion

von Tim17 ist weitestgehend unklar, allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass zwei konservierte negative Ladungen im aminoterminalen Bereich von Tim17 für die Funktionalität des Proteins entscheidend sind (Meier et al., 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass geladene Aminosäurereste in Tim17 für das Vorstufenprotein-induzierte Öffnen der TIM23-Translokase notwendig sind.

Das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) reguliert einerseits die Tim23-Pore (Truscott et al., 2001) und fungiert andererseits als Triebkraft für den Transport der geladenen Präsequenzen durch die Pore über die Innenmembran hinweg (Martin et al., 1991). Für die komplette Translokation des Vorstufenproteins sorgt der auf der Matrixseite lokalisierte ATP-abhängige Importmotor (Neupert und Brunner, 2002). Dieser besteht aus dem Membranprotein Tim14, den beiden peripher assoziierten Komponenten Tim16 und Tim44 sowie dem löslichen Chaperon Hsp70 (mtHsp70) mit seinem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Mayer, 2004). mtHsp70 ist die zentrale Komponente des Importmotors. Es wird durch Tim44 an den Translokationskanal rekrutiert und seine ATPase-Aktivität wird durch das J-Protein Tim14 stimuliert (Mokranjac et al., 2003b; Truscott et al., 2003b). Regulierte Zyklen des Bindens von mtHsp70 an das Vorstufenprotein und dessen anschließende erneute Freigabe führen zu einer einwärtsgerichteten Kraft, die zur Bewegung des Vorstufenproteins in Richtung Matrix führt. Für den genauen Mechanismus der mtHsp70-Funktion werden zwei Modelle diskutiert. Das „*Brownian ratchet*“- oder „*Trapping*“-Modell beschreibt mtHsp70 als molekularen Sperrhaken, der die spontane Brownsche Molekularbewegung der translozierenden Polypeptidkette in einen gerichteten Transport umsetzt (Neupert und Brunner, 2002). Nach dem „*Pulling*“-Modell zieht mtHsp70 aktiv an der Polypeptidkette. Die dafür benötigte Kraft soll dabei durch eine ATP-getriebene Konformationsänderung von mtHsp70 generiert werden (Matouschek et al., 2000). In der Matrix wird die Präsequenz schließlich durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase abgespalten und dadurch das Vorstufenprotein in seine reife Form überführt.

Auch Proteine der Innenmembran, wie z. B. Oxa1 und die Untereinheit Va der Cytochrom-Oxidase (COXVa), oder Proteine des Intermembranraums mit N-terminaler Präsequenz (z. B. Cytochrom  $b_2$ ) werden unter Beteiligung der TIM23-Translokase importiert. Die Interaktion des topogenen Signals von COXVa mit Komponenten der Innenmembran während des Imports verhindert die vollständige Translokation des Proteins über die Innenmembran (Miller und Cumsky, 1993) („Stopp-Transfer-Mechanismus“). Der Import von COXVa benötigt die ATP-abhängige Aktivität von mtHsp70 in der Matrix (Cyr et al., 1993). mtHsp70 scheint für die Translokation des schließlich zur Matrix exponierten N-

terminalen Segments des Proteins über die Innenmembran verantwortlich zu sein (Cyr et al., 1993; Gärtner et al., 1995b). Diese aminoterminal Sequenz wird schließlich durch MPP auf der Matrixseite abgespalten und das Protein in die Innenmembran eingebaut.

Cytochrom *b<sub>2</sub>*, ein lösliches Protein des Intermembranraums, enthält eine abspaltbare aminoterminal Präsequenz, welche das Protein zunächst zur TIM23-Translokase in der Innenmembran dirigiert. Diese Präsequenz wird in der Matrix von MPP und das auf sie folgende Sortiersignal im Intermembranraum von der Innenmembranpeptidase 1 (Imp1) geschnitten, wodurch das reife Protein in den Intermembranraum freigesetzt wird. Ob der Import von Cytochrom *b<sub>2</sub>* gemäß des „Stopp-Transfer-Mechanismus“ oder mittels „konservativer Sortierung“ erfolgt ist bislang unklar (Stuart und Neupert, 1996).

Das Gen *MCR1* aus *S. cerevisiae* kodiert für zwei Isoformen der NADH-Cytochrom *b<sub>5</sub>* Reduktase. Das primäre Translationsprodukt besitzt ein aminoterminal Matrix-Zielsignal, auf das ein Abschnitt mit 21 ungeladenen Aminosäureresten folgt. Dieses Vorstufenprotein wird in die Außenmembran eingebaut, aber nur ca. ein Drittel der Moleküle werden fest in dieser verankert, während der Rest zur Innenmembran transportiert wird. Dort werden diese Vorstufenproteine durch Imp1 gespalten und in den Intermembranraum freigesetzt (Hahne et al., 1994).

### **1.2.5. Die TIM22-Translokase**

Innenmembranproteine mit mehreren hydrophoben Segmenten, wie die Metabolitransporter, Tim23, Tim17 und Tim22, werden durch eine zweite Translokase in der Innenmembran, den TIM22-Komplex, Membranpotential-abhängig importiert (Abb. 1) (Kerscher et al., 1997; Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996). Diese Proteine besitzen interne Importsignale, die bisher wenig charakterisiert sind. Im Intermembranraum werden die Vorstufenproteine von den löslichen Komplexen der „kleinen“ Tim-Proteine erkannt. Dabei interagiert der 70 kDa große Tim9-Tim10-Komplex mit *Carrier*-Vorstufenproteinen, wohingegen der Tim8-Tim13-Komplex, ein weiterer löslicher 70 kDa Komplex im Intermembranraum, mit der Vorstufe von Tim23 interagiert (Bauer et al., 2000). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Vorstufe von *N. crassa* Tim23 auch ein Substrat des Tim9-Tim10-Komplexes ist (Vasiljev et al., 2004). Die Komplexe der „kleinen“ Tim-Proteine im Intermembranraum verhindern sowohl ein Zurückgleiten ihrer Substrate durch den TOM-Kanal als auch deren Aggregation. Der TOM-Komplex ist zusammen mit dem Tim9-Tim10-Komplex zur Translokation der *Carrier*-Vorstufenproteine über die Außenmembran ausreichend (Vasiljev et al., 2004). Tim9, Tim10 und Tim12, welches als

Verbindung zwischen den löslichen TIM-Komplexen im Intermembranraum und dem Membran-integrierten TIM22-Komplex fungiert (Koehler et al., 1998; Leuenberger et al., 1999; Sirrenberg et al., 1998), sowie Tim8 und Tim13 bilden eine Proteinfamilie und besitzen ein konserviertes, Zinkfinger-ähnliches CX<sub>3</sub>C-Motiv (Bauer et al., 2000; Paschen und Neupert, 2001). Während Tim9, Tim10 und Tim12 in Hefe essenziell sind, ist dies für Tim8 und Tim13 nicht der Fall. Die Deletion von Tim8 ist allerdings zusammen mit einem temperatursensitiven Allel von Tim10 synthetisch letal (Koehler et al., 1999a), was auf eine überlappende Funktion schließen lässt.

Nach ihrer Interaktion mit den „kleinen“ Tim-Proteinen werden die Vorstufenproteine zum TIM22-Komplex transferiert. Der 70 kDa Tim9-Tim10-Tim12-Komplex ist mit der TIM22-Translokase auf der Intermembranraumseite der Innenmembran assoziiert (Bauer et al., 2000). Die zentrale Komponente der 300 kDa TIM22-Translokase ist das essenzielle Membranprotein Tim22 (Sirrenberg et al., 1996), welches den Insertionskanal bildet. Dieser ist vermutlich eine spannungsaktivierte, gekoppelte Doppelpore, wobei jede Pore einen Durchmesser von 1,6 nm hat (Rehling et al., 2004). Der TIM22-Komplex aus *S. cerevisiae* enthält noch zwei weitere nicht-essenzielle Membranproteine, Tim54 und Tim18 (Pfanner und Geissler, 2001). Tim54 besitzt eine große Domäne im Intermembranraum (Kerscher et al., 1997) und könnte Vorstufenproteine oder andere Translokasekomponenten binden. Tim18 könnte für die Assemblierung bzw. für die Stabilität des TIM22-Komplexes wichtig sein (Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000).

### 1.2.6. Die OXA1-Translokase

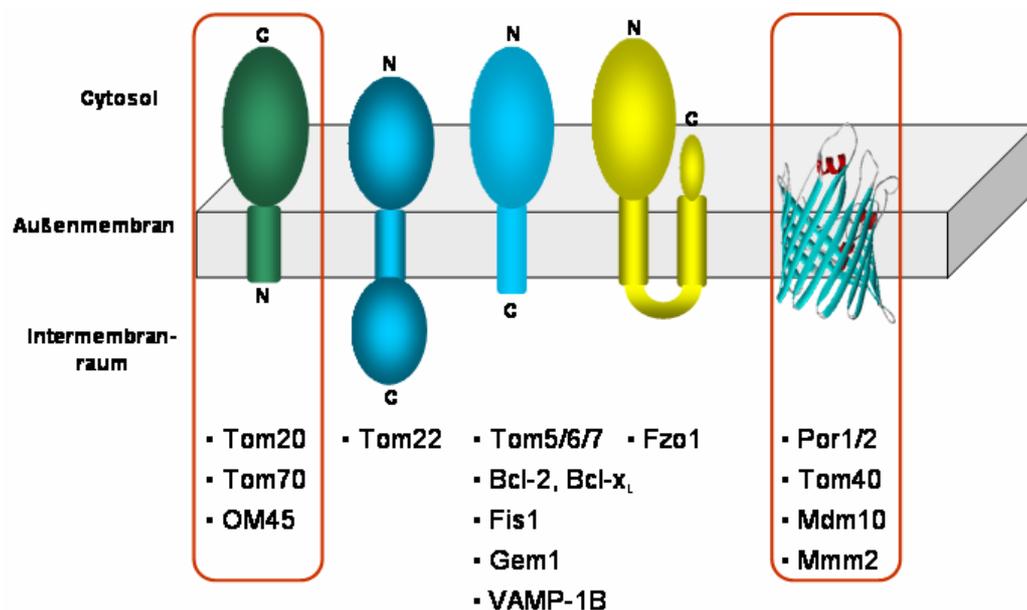
Oxa1 bildet einen homooligomeren Proteinkomplex, der für die Integration mehrerer mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran verantwortlich ist (He und Fox, 1997; Hell et al., 2001; Nargang et al., 2002). Zusätzlich ist Oxa1 an der Insertion einiger kernkodierter Proteine beteiligt, welche die Innenmembran über einen Exportschritt aus der Matrix erreichen (Hell et al., 1998). Oxa1 durchspannt die Innenmembran fünfmal und exponiert eine lange C-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne zur Matrix (Herrmann et al., 1997). Dieser Sequenzabschnitt bindet mitochondriale Ribosomen und damit wird vermutlich eine kotranslationale Membraninsertion der Proteine ermöglicht (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Die Deletion von Oxa1 führt, ebenso wie die Deletion der C-terminalen Domäne alleine, zu atmungsdefizienten Hefestämmen (Bauer et al., 1994; Szyrach et al., 2003). Oxa1 ist ein Mitglied der stark konservierten Oxa1/YidC/Alb3-Proteinfamilie, die sowohl in Prokaryoten als auch Eukaryoten zu finden ist (Kuhn et al., 2003).

YidC ist das prokaryotische Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3-Familie. Es kommt sowohl in gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien vor und ist ein integrales Membranprotein der bakteriellen Innenmembran. YidC vermittelt die Insertion von Vorstufenproteinen in diese Membran sowie deren Faltung. Albino3 (Alb3) ist ein integrales Membranprotein des Thylakoidmembransystems von Chloroplasten. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran, ist jedoch nicht an der Translokation von Proteinen in das Thylakoidlumen beteiligt (Kuhn et al., 2003).

### 1.3. Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine

#### 1.3.1. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine

Die mitochondriale Außenmembran beherbergt Porine, Proteine der Proteintranslokation, Enzyme der Lipid-Biosynthese und verschiedener anderer Prozesse, sowie Proteine, die an der Ausbildung der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. Die Außenmembranproteine können anhand ihrer Topologie verschiedenen Klassen zugeordnet werden (Abb. 2).



**Abb. 2. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine mit Beispielen zu den jeweiligen Klassen.** Mitochondriale Außenmembranproteine können anhand ihrer Topologie in fünf verschiedene Klassen eingeteilt werden. Umrandet sind die beiden Klassen, die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurden. Weitere Details siehe Text.

Eine Klasse mitochondrialer Außenmembranproteine, zu der Tom20, Tom70 und OM45 gehören, besitzt ein Transmembransegment an ihrem N-Terminus. OM45 ist ausschließlich in *S. cerevisiae* zu finden, hat ein relatives Molekulargewicht von 45 kDa und

seine Funktion ist bislang unklar (Yaffe et al., 1989). Die Proteine dieser Klasse sind in der Außenmembran so orientiert, dass der Großteil des Proteins cytosolisch lokalisiert und ein N-terminales Segment in der Membran verankert ist (Abb. 2). N-terminal verankerte Proteine sind auch als Proteine mit Signal-Anker-Domäne bekannt, da ihre Transmembrandomäne (TMD) mit den flankierenden Regionen sowohl als intrazelluläres Sortiersignal als auch als Membrananker fungiert (Rapaport, 2003; Shore et al., 1995). Außerdem ist dieses Segment für die Topologie der Proteine verantwortlich. Wie Proteine mit einer Signal-Anker-Sequenz in die Membran integriert werden ist bislang weitestgehend unklar. Möglicherweise ist Tom40 an ihrem Import in Mitochondrien beteiligt (Schneider et al., 1991), der höchstwahrscheinlich unabhängig von den Rezeptorkomponenten Tom20 und Tom70 erfolgt (Schlossmann und Neupert, 1995; Schneider et al., 1991; Suzuki et al., 2002).

*Tail-anchor*-Proteine wie z. B. Tom5, Tom6, Tom7, Tom22 und Fis1 bilden eine weitere Klasse von Außenmembranproteinen. Sie besitzen eine Transmembrandomäne an ihrem Carboxyterminus und ihre große N-terminale Region ist cytosolisch lokalisiert (Abb. 2) (Wattenberg und Lithgow, 2001). Allerdings besitzt Tom22 mehr Aminosäurereste im Intermembranraum als die anderen Proteine dieser Klasse, so dass Tom22 auch als Protein mit internem Membrananker betrachtet werden kann. Ein konservierter Prolinrest innerhalb des Membransegments scheint für den Transport von Tom5, Tom6, Tom7 und Tom22 zu Mitochondrien und eventuell auch für die Interaktion dieser Proteine mit Tom40 eine entscheidende Rolle zu spielen (Allen et al., 2002). Der Import von Tom22 scheint von den Rezeptorproteinen des TOM-Komplexes, Tom20 und Tom70, abhängig zu sein (Keil und Pfanner, 1993).

Die dritte Proteingruppe durchspannt die Außenmembran vermutlich zweimal, so dass das Protein im Intermembranraum eine kleine Schleife bildet. Fzo1, welches eine Rolle bei der Fusion von Mitochondrien spielt, ist bisher das einzige bekannte Protein dieser Gruppe (Abb. 2) (Fritz et al., 2001).

Schließlich enthält die Außenmembran der Mitochondrien auch Proteine, die die Membran mit mehreren antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern durchspannen, welche eine  $\beta$ -Barrel-Struktur ausbilden (Abb. 2) (Mannella et al., 1996). Neben der mitochondrialen Außenmembran enthält nur die Außenmembran der Chloroplasten und die von gram-negativen Bakterien  $\beta$ -Barrel-Proteine (Wimley, 2003). Bisher wurden in *S. cerevisiae* fünf Proteine dieser Klasse identifiziert. Por1 und Por2 sind zu bakteriellen Porinen verwandt. Die Funktion von Por2 ist bislang unklar, während Por1, welches auch mit VDAC (*voltage-dependent anion-selective channel*) bezeichnet und im weiteren Text Porin genannt wird, für

den Transport von Ionen und kleinen Metaboliten über die Außenmembran verantwortlich ist (Bay und Court, 2002). Weitere  $\beta$ -Barrel-Proteine sind Tom40, welches den proteinleitenden Kanal des TOM-Komplexes bildet (Ahting et al., 2001; Hill et al., 1998), sowie Mdm10 und Mdm34/Mmm2, welche beide für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie notwendig sind (Sogo und Yaffe, 1994; Youngman et al., 2004).

### 1.3.2. Signalsequenzen mitochondrialer Außenmembranproteine

Von allen Außenmembranproteinen wurde die mitochondriale Signalsequenz von *S. cerevisiae* Tom70 bisher am Detailliertesten untersucht. Diese besteht aus einem kurzen Präsequenz-ähnlichen Segment (Reste 1-10), auf welches ein Sequenzabschnitt mit ungeladenen, meist unpolaren Aminosäureresten folgt, welcher als Stopp-Transfer Sequenz fungiert (Hurt et al., 1985). Import-Experimente *in vitro* haben bestätigt, dass die Signalsequenz in Hefe Tom70 in diesem Bereich liegt, der sowohl die vorhergesagte Transmembrandomäne (Reste 11-29) als auch die bereits erwähnten Aminosäurereste 1-9 beinhaltet, die ein positiv geladenes, hydrophiles Segment bilden (Abb. 3) (Shore et al., 1995). Die Transmembrandomäne wird sowohl als mitochondriale Signalsequenz als auch zur Membranintegration benötigt (eine Signal-Anker-Funktion), wohingegen die aminoternale Region mit der Transmembrandomäne kooperiert, um die Gesamtinsertionsrate zu erhöhen (McBride et al., 1992).

	IMR	Außenmembran	Cytosol
OM45 ( <i>S.c.</i> )		MSSR IIVGSAALAAAITASIMV	REQKAKGQRREGVS.....
Tom70 ( <i>S.c.</i> )	MKSFITRNKT	AILATVAATGTAIGAYYYY	NQLQQQQQRGK.....
Tom70 ( <i>N.c.</i> )	...NWSVEHK	AVVYTIAGVSVWITTAGVYYL	RKGSEQKESGPK...
Tom70 ( <i>R.n.</i> )	...GAGTLPR	WHVALAIGAPLLL GAGAMYLWS	RRRRRREAG...
Tom20 ( <i>S.c.</i> )	MSQSNPILR	GLAITTAIAALSATGYAIYF	DYQRNNSPQFR.....
Tom20 ( <i>N.c.</i> )	MPSQ	AVTYTTAAVAAVATGFLAYAVYF	DYKRRNDPEFRR...
Tom20 ( <i>H.s.</i> )	MVGR	NSAIAAGVCGALFIGYCIYF	DRKRRSDPNFK.....

**Abb. 3. Sequenzen der Transmembrandomänen und ihrer flankierenden Regionen von aminoterminal verankerten Außenmembranproteinen.** Positiv geladene Aminosäurereste sind in grün und negativ geladene Reste in rot dargestellt. *H. s.*, *Homo sapiens*; *R.n.*, *Rattus norvegicus*; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *N.c.*, *Neurospora crassa*; IMR, Intermembranraum; OM45, Außenmembranprotein mit 45 kDa, dessen Funktion unklar ist; Tom, Translokase der mitochondrialen Außenmembran.

Ein umfassenderes Bild lieferte die Analyse der strukturellen Charakteristika der Signal-Anker-Domäne von Tom20 aus Säugern. Eine moderate Hydrophobizität des

Transmembransegments und eine positive Nettoladung innerhalb von fünf Aminosäureresten in der C-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne scheinen entscheidend dafür zu sein, dass das Protein zu Mitochondrien dirigiert wird (Kanaji et al., 2000). Die Bedeutung einer positiven Nettoladung in der C-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne wird durch die Tatsache unterstrichen, dass diese auch in den Proteinen aus Pilzen vorhanden ist (Abb. 3). Allerdings besitzen die Signal-Anker-Domänen verschiedener Proteine keine Sequenzähnlichkeit (Abb. 3) und deshalb ist bislang unklar, wodurch die Zielinformation kodiert wird.

$\beta$ -Barrel-Proteine der mitochondrialen Außenmembran besitzen interne Importsignale, die über mehrere Regionen des Vorstufenproteins verteilt sind und so eher strukturelle Erkennungselemente ausbilden (Rapaport, 2003). Versionen von *N. c.* Tom40 ohne N- oder C-terminales Segment wurden weiterhin zur mitochondrialen Außenmembran dirigiert. Folglich dienen nicht nur diese Domänen als Signalsequenz (Rapaport und Neupert, 1999). Auch die Signalsequenz von Porin ist über mehrere Regionen des Proteins verteilt, einschließlich des äußersten C-terminalen Bereichs (Court et al., 1996; Hamajima et al., 1988). Trotz dieser Erkenntnisse ist der präzise molekulare Mechanismus des Transports zu und Membraneinbaus in die Mitochondrien für die verschiedenen mitochondrialen Außenmembranproteine bisher weitestgehend unklar.

### 1.3.3. Biogenese der $\beta$ -Barrel-Proteine Porin und Tom40

Bei der Biogenese von Porin sind der Importrezeptor Tom20 und Komponenten des TOM-Kernkomplexes, einschließlich Tom40, beteiligt. Die cytosolische Domäne von humanem Tom20 kann Porin-Vorstufenproteine binden und deren Einbau in Lipidvesikel vermitteln (Schleiff et al., 1999). Die anschließende Beteiligung von Komponenten des TOM-Kernkomplexes am Import von Porin wurde in verschiedenen Studien gezeigt. Zum Beispiel wurde der Import von Vorstufenproteinen der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente durch Zugabe eines Überschusses an Wasser-löslichem Porin inhibiert. Diese Inhibition erfolgt an einem Schritt des Importweges nach der Beteiligung von Protease-zugänglichen Bindestellen (Pfaller et al., 1988). Vergleichbar mit diesen Beobachtungen verhindert ein Überschuss an Vorstufenproteinen mit Matrix-Zielsignal den Import von Porin weitestgehend (Krimmer et al., 2001). Außerdem sind für den Import von Porin funktionelles Tom5, Tom22 und Tom40 notwendig, wie durch Studien mit temperatursensitiven Allelen des essenziellen Proteins Tom40 oder mit Hefestämmen ohne Tom5 oder Tom22 gezeigt werden konnte (Krimmer et al., 2001).

TOM-Komplexe werden nicht *de novo* gebildet, sondern entstehen durch Einbau von neu synthetisierten Tom-Untereinheiten in bereits vorhandene TOM-Komplexe. Für den Import dieser Tom-Vorstufenproteine wird der TOM-Komplex ebenfalls benötigt (Rapaport, 2002). Die Assemblierung des Tom40-Vorstufenproteins in funktionelle Komplexe verläuft über mehrere hochmolekulare Intermediate, die mit den voll assemblierten TOM-Komplexen im Gleichgewicht stehen und mittels blauer Nativgelelektrophorese analysiert werden können (Dekker et al., 1996; Model et al., 2001; Rapaport und Neupert, 1999; Rapaport et al., 2001). Nach Erkennung durch die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 und Translokation über die Außenmembran ist das Tom40-Vorstufenprotein in einem intermediären Komplex von ca. 250 kDa nachweisbar, dessen Stöchiometrie und Zusammensetzung bisher unklar ist (Model et al., 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Als Teil des 250 kDa-Intermediats ist die radioaktiv markierte Vorstufe von Tom40 noch nicht in die Lipiddoppelschicht integriert, zum Intermembranraum exponiert und gegen von der cytosolischen Seite der Mitochondrien zugegebene Protease resistent (Model et al., 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Anschließend assoziiert Tom40 mit Tom5 unter Bildung eines 100 kDa-Intermediates. Auf dieser Stufe ist Tom40 bereits in die Membran integriert (Model et al., 2001). Die Bildung des 100 kDa-Intermediates *in vitro* erfordert Temperaturen von mindestens 15°C, während das 250 kDa-Intermediat bereits bei 0-10°C gebildet wird (Model et al., 2001). Der letzte Schritt im Biogeneseprozess besteht in der Rekrutierung von Tom7, Tom6 und Tom22 zum 100 kDa Komplex. Demnach liegt in der Außenmembran ein dynamisches Gleichgewicht von assemblierten TOM-Komplexen und Assemblierungsintermediaten vor, wodurch neu importierte Tom-Untereinheiten integriert werden können (Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport, 2002).

### 1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine. Zwei Klassen mitochondrialer Proteine sollten hierbei näher betrachtet werden, die Proteine mit einer Signal-Anker-Domäne und die  $\beta$ -Barrel-Proteine (Abb. 2). Zum einen sollten die Signal-Anker-Domänen verschiedener Außenmembranproteine strukturell und funktionell charakterisiert und der Importmechanismus dieser Proteine beleuchtet werden. Zum anderen sollten neue Proteine, die am Import und der Assemblierung von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beteiligt sind, identifiziert und die Biogenese mitochondrialer  $\beta$ -Barrel-Proteine untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden weitgehend nach Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Birnboim *et al.* durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Bakterien aus einer 2 ml Über-Nacht-Kultur in LB<sup>Amp</sup> (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) wurden für 30 s in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl E1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/l RNaseA) resuspendiert und anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl E2-Puffer (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) 5 min bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Danach wurde die Lösung durch Zugabe von 300 µl E3-Puffer (3,1 M KOAc, 2,5 M HAc) neutralisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (16100xg, 10 min, RT) wurde der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Die ausgefällte DNA wurde abzentrifugiert (16100xg, 10 min, RT), mit 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (16100xg, 10 min, RT), 10 min bei RT getrocknet und schließlich in 30 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

DNA-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)

Große Mengen Plasmid-DNA (bis zu 0,5 mg) wurden mit Hilfe einer Anionen-Austauscher-Säule der Firma Genomed („Jetstar-Kit“) isoliert. Bakterien aus einer 50 ml Über-Nacht-Kultur in LB<sup>Amp</sup> wurden geerntet (3000xg, 10 min) und anschließend in 4 ml E1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml E2-Puffer wurden die Zellen 5 min bei RT lysiert bevor die Lösung durch Zugabe von 4,4 ml E3-Puffer neutralisiert wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (31000xg, 10 min, RT) wurde der Überstand auf eine Anionen-Austauscher-Säule gegeben, die zuvor mit 10 ml E4-Puffer (0,6 M NaCl, 100 mM NaOAc, 0,15% (v/v) Triton X-100, pH 5,0) äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 10 ml E5-Puffer (0,8 M NaCl, 100 mM NaOAc, pH 5,0) gewaschen und anschließend die DNA mit 5 ml E6-Puffer (1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Die DNA

wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (23700xg, 30 min, 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (23700xg, 10 min, 4°C), bei RT getrocknet und in 150 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.1.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden exponentiell mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) amplifiziert. Dabei wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94°C für 5 min zunächst denaturiert. Anschließend wurden dreißig Zyklen durchlaufen, die aus Denaturieren (1 min 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 5°C unter  $T_m$ ) sowie DNA-Synthese (1 min pro Kilobase (kb) bei 72°C) bestanden. Die DNA-Synthese wurde durch eine 10 min Inkubation bei 72°C vervollständigt. Die Anlagerungstemperatur  $T_m$  der Primer wurde nach der „4+2“-Regel abgeschätzt ( $T_m = 4^\circ\text{C pro G/C} + 2^\circ\text{C pro A/T}$ ).

Es wurde der *GLtaq*-Kit der Firma GL BioTech verwendet. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt 7,5 U *GLtaq* DNA-Polymerase, 1,5 U *Pfu* DNA-Polymerase, 200 µM der Desoxynucleosid-5'-triphosphate sowie 100 pmol der Primer in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Als Matrize wurden 100 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomische DNA von *S. cerevisiae* verwendet. Amplifizierte DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.4.1.) gereinigt.

### 2.1.3. Enzymatische Modifikation von DNA

#### 2.1.3.1. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsverdaue wurden zu unterschiedlichen Zwecken durchgeführt. Einerseits wurden damit die durch Mini-Präparationen isolierten Plasmide mit Hilfe einer Restriktionsfragmentlängen-Analyse überprüft. Andererseits wurden mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente geschnitten, um sie anschließend in entsprechende Vektoren zu ligieren (siehe 2.1.3.3.). Die Restriktionsverdaue wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dabei wurden 3 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Verdaue wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern bei der für die Enzyme optimalen Temperatur für 2-4 h inkubiert.

Anschließend wurde die DNA über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.1.4.1.) gereinigt.

### 2.1.3.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Mit der Alkalischen Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) wurden gleiche Enden der Vektor-DNA vor Ligationsreaktionen dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne DNA-Fragment zu verhindern. Es wurden 10 µg DNA in 50 µl CIP-Puffer (vom jeweiligen Hersteller) mit 1 U Enzym für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 17 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), 2,5 µl 10% (w/v) SDS, 5 µl 1 M NaCl und 0,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Inaktivierung durch Inkubation für 20 min bei 75°C wurden die dephosphorylierten Vektoren nach Herstellerangaben mit Qiaquick®-Säulen von Qiagen isoliert. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit dem fünffachen Volumen des Puffers PB versetzt, die Lösung auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben und zentrifugiert (16100xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl Wasser eluiert.

### 2.1.3.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wurden DNA-Fragmente (nach Restriktionsverdau) in linearisierte Vektoren (nach Verdau mit den gleichen oder kompatiblen Enzymen) ligiert. In einem Gesamtvolumen von 15 µl wurden 50-200 ng linearisierter Vektor mit einem 2-5 fachen molaren Überschuss an DNA-Fragment in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% (w/v) PEG 8000, pH 8,5) gemischt. Nach Zugabe von 1 U T4 Ligase wurde das Gemisch über Nacht (üN) bei 14°C oder 2 h bei RT inkubiert. Von diesem Ligationsansatz wurde 1 µl zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen eingesetzt (siehe 2.1.6.).

## 2.1.4. Reinigung und Analyse von DNA

### 2.1.4.1. Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen (0.8-3% (w/v)) elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt. Die Proben wurden mit 10x Auftragspuffer (60% (v/v) Glycerol, 0,5% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) Xylencyanol) zum Laden der Gele gemischt und die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) bei einer von der Gelgröße abhängigen Spannung von 50-160 V durchgeführt. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde den

Agarosegelen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenmarker wurden die 1 kb bzw. die 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter von NEB (Beverly, USA) verwendet.

### 2.1.4.2. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus dem Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Dazu wurde das Gelfragment gewogen, mit dem dreifachen Volumen des Puffers QC versetzt und für 10 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert, bis die Agarose geschmolzen war. Die Lösung wurde auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben und zentrifugiert (16100xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl Wasser eluiert.

### 2.1.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der DNA-Lösungen bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide.

### 2.1.5. Einführung von Punktmutationen mit dem *QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit*

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

nach Auftauen eines 50 µl Aliquots auf Eis die Zellen mit 1 µl DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach für 45 s auf 42°C erhitzt und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 0,5 ml LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension 1 h bei 37°C und 160 Upm inkubiert, bevor die Zellen auf eine LB<sup>Amp</sup>-Kulturplatte (LB mit 2% (w/v) Agar und 100 mg/l Ampicillin) ausgestrichen wurden. Die Kulturplatte wurde bei 37°C üN inkubiert.

### **2.1.6. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation**

*E. coli* Stämme wurden durch Elektroporation transformiert (Dower et al., 1988). Die verwendeten Stämme waren MH1 und XL1 Blue. Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die Kultur wurde 30 min auf Eis gestellt, anschließend die Zellen geerntet (4400xg, 5 min, 4°C) und nacheinander mit 500 ml, 250 ml und 50 ml 10% (v/v) Glycerol gewaschen. Die kompetenten Zellen wurden schließlich in 500 µl 10% (v/v) Glycerol resuspendiert und in 40 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Die Elektroporation wurde mit dem „Gene Pulser“ von BioRad (München) durchgeführt. Elektrokompente *E. coli* Zellen (40 µl) wurden mit 1 µl des Ligationsansatzes 30 s auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch in eine 0,2 cm breite eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die DNA wurde durch einen Strompuls (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms) in die Zellen transformiert. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und 30-60 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert, 850 µl des Überstandes verworfen, die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer LB<sup>Amp</sup>-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde üN bei 37°C inkubiert.

### **2.1.7. Verwendete Plasmide**

**Tab. 1. Plasmide**

Plasmid	Referenz
pFA6a-His3MX6	(Wach et al., 1997)
pGEM4- <i>N.c.</i> F <sub>1</sub> β	(Rassow et al., 1990)
pGEM4-Mdm10	(Paschen et al., 2003)
pGEM4-OM45	(Waizenegger et al., 2003)
pGEM4-OM45(Δ1-20)	(Waizenegger et al., 2003)

Plasmid	Referenz
pGEM4-Porin	(Mayer et al., 1993)
pGEM4-Su9(1-69)-DHFR	(Pfanter et al., 1987)
pGEM4-Su9(1-112)-DHFR	(Ungermann et al., 1994)
pGEM4-Tob38	(Waizenegger et al., 2004)
pGEM4-Tom20	(Ahting et al., 2005)
pGEM4- <i>N.c.</i> Tom20	(Mayer et al., 1993)
pGEM4- <i>N.c.</i> Tom20(1-27)-DHFR	(Waizenegger et al., 2003)
pGEM4-Tom40	(Paschen et al., 2003)
pGEM4- <i>N.c.</i> Tom40	(Keil et al., 1993)
pGEM4- <i>N.c.</i> Tom70(1-38)Met- <i>N.c.</i> Tom70(39-Ende)	(Ahting et al., 2005)
pQE30-Tob38	(Waizenegger et al., 2004)
pRS315-promTom70-Tom70	(Young et al., 2003)
pTL26; pTL32	(Lafontaine und Tollervey, 1996)
pYM2; pYM3; pYM6; pYM9; pYM10	(Knop et al., 1999)
pYX232-OM45(1-32)-GFP	(Waizenegger et al., 2003)
pGEM4- <i>N.c.</i> Tom70(1-38)39Met-Tom20	diese Arbeit; (Ahting et al., 2005)
pMalcRI-Mim1	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2005)
pRS426-Cue1(1-33)-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-32)-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-32)R4S-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-32)R4E-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-26)-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-26)K26Q-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-26)K26E-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-26)R4S, K26E-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-OM45(1-26)R4E, K26E-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20( $\Delta$ 1-6)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(D30Q, R33Q, R34Q)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R9E)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20( $\Delta$ 1-6) R9D	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R33E)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R33Q, R34Q)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R9Q, D30Q, R33Q, R34Q)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R9E, D30Q, R33Q, R34Q)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R9E, R33E)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R33E, R34E)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(R9E, R33Q, R34Q)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)

Plasmid	Referenz
pRS426-Tom20(R9E, R33E, R34E)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(1-9)-Cue1(6-19)-Tom20(25-183)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(1-9)-Cue1(6-19)-Tom20(30-183)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20(1-24)-LIILI-Tom20(30-183)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20-Scr1	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom20-Scr2	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426-Tom70(1-41)-Tom20( $\Delta$ 1-36)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS426- <i>N.c.</i> Tom70(1-38)39Met-Tom20	diese Arbeit; (Ahting et al., 2005)
pRS416-promTom20-Tom20	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pRS416-promTom20-Tom20R9E	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pYX142-OM45(1-32)-Tom70( $\Delta$ 1-35)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pYX142-OM45(1-32)R4E-Tom70( $\Delta$ 1-35)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pYX142-Tom20(1-36)-Tom70( $\Delta$ 1-35)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)
pYX142-Tom20(1-36)R9E, R33E, R34E-Tom70( $\Delta$ 1-35)	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2003)

## 2.2. Methoden der Hefegenetik

### 2.2.1. Verwendete Hefestämme

**Tab. 2. Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
D273-10B	<i>Wildtyp</i>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
YPH499	<i>MATa ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 lys2-801</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
YTJB4	<i>MATa ura3 leu2 his4 lys2</i>	(Haucke et al., 1995)
YTJB64	YTJB4, <i>tom20::LEU2</i>	(Lithgow et al., 1994)
BY4743	<i>MATa/<math>\alpha</math> his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 met15/MET15 lys2/LYS2</i>	(Brachmann et al., 1998)
$\Delta$ tom70	BY4743, <i>tom70::kanMX4/tom70::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
JY009	YPH499, <i>tom70::HIS3 tom20::TRP1 (p416ADH-TOM20 [URA3])</i>	(Young et al., 2003)
$\Delta$ mas37	YPH499, <i>mas37::HIS3</i>	(Habib et al., 2005)
KKY3	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 ade2-101 suc2-<math>\Delta</math>9 trp1-<math>\Delta</math>901 ura3-52 tom40::HIS3 (pRS316-TOM40)</i>	(Kassenbrock et al., 1993)

Stamm	Genotyp	Referenz
KKY3.3	KKY3 ( <i>pRS314-tom40-3</i> )	(Kassenbrock et al., 1993)
GAL-His <sub>8</sub> -Tob55	YPH499, <i>tob55::HIS3-pGAL-His<sub>8</sub>-TOB55</i>	(Paschen et al., 2003)
GAL-Tob38	YPH499, <i>tob38::HIS3-pGAL-TOB38</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
GAL-His <sub>8</sub> -Tob38	YPH499, <i>tob38::HIS3-pGAL-His<sub>8</sub>-TOB38</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
Tob38-His <sub>7</sub>	YPH499, <i>tob38::TOB38-His<sub>7</sub>-HIS3</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
Tob38-6HA	YPH499, <i>tob38::TOB38-6HA-HIS3</i>	diese Arbeit; (Habib et al., 2005)
Tob38-9Myc	YPH499, <i>tob38::TOB38-9Myc-HIS3</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
$\Delta$ mas37, Tob38-His <sub>7</sub>	YPH499, <i>mas37::HIS3</i> , <i>tob38::TOB38-His<sub>7</sub>-HIS3</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
GAL-Mim1	YPH499, <i>mim1::HIS3-pGAL-MIM1</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2005)
GAL-His <sub>8</sub> -Mim1	YPH499, <i>mim1::HIS3-pGAL-His<sub>8</sub>-MIM1</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2004)
Mim1-3HA	YPH499, <i>mim1::MIM1-3HA-HIS3</i>	diese Arbeit; (Waizenegger et al., 2005)
$\Delta$ mim1	YPH499, <i>mim1::HIS3</i>	diese Arbeit
Mas37-6HA	YPH499, <i>mas37::MAS37-6HA-HIS3</i>	diese Arbeit

a) Deletion des *MIMI*-Gens zur Erzeugung von  $\Delta$ mim1

Das *MIMI*-Gen wurde mittels homologer Rekombination mit einem PCR-Fragment in dem haploiden Hefestamm YPH499 deletiert. Das PCR-Fragment enthielt die Auxotrophie-Marker-Kassette *HIS3* und kurze flankierende Regionen des genomischen Ziel-Lokus. Es wurde unter Verwendung der Primer YOL026C-delta-forw und YOL026C-delta-rev und der Plasmid-Matrize pFA6a-His3MX6 (Wach et al., 1997) synthetisiert und in den Hefestamm transformiert (siehe 2.2.4.). Über die homologen, flankierenden Regionen kann das PCR-Fragment an Stelle des genomischen Ziel-Lokus stabil integriert werden. Um positive Klone zu isolieren, wurde auf Selektivmedium ohne Histidin inkubiert. Isolierte Klone wurden mittels PCR analysiert.

YOL026C-delta-forw: AGA AAC ATC ACC CCC CTT CTT ACG AAA CTG CCA  
CAA GAC AGA AAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC  
YOL026C-delta-rev: GTG TGT GTA TTT ATT TAT GTA GGT TGC TAA TGC  
TTT GGT GAT CGT ATC GAT GAA TTC GAG CTC G

b) Erzeugung des Mas37-6HA-Stammes

Mas37 wurde chromosomal in dem haploiden Hefestamm YPH499 mit sechs Hämagglutinin (HA)-Anhängen mittels homologer Rekombination mit einem PCR-Fragment versehen. Das PCR-Fragment enthielt die Auxotrophie-Marker-Kassette *klTRP1* und homologe Sequenzen zu den letzten 45 bp des *MAS37* Gens und den ersten 45 bp seiner 3' UTR. Es wurde unter Verwendung der Primer YMR060C-S3 und YMR060C-S2 und der Plasmid-Matrize pYM3

(Knop et al., 1999) synthetisiert und in den Hefestamm transformiert (siehe 2.2.4.). Über die homologen Regionen kann das PCR-Fragment stabil in das Chromosom integriert werden. Um positive Klone zu isolieren, wurde auf Selektivmedium ohne Tryptophan inkubiert. Isolierte Klone wurden mittels PCR analysiert.

YMR060C-S3: GGA AAC GTT GTG ATG TCA TTA TAT AAT TTA GCC TGT  
AAA TAC ATA CGT ACG CTG CAG GTC GAC  
YMR060C-S2: AAA TGA ACT TAA AGA CAC CTT TCT GCA TTA TTT TGT  
TTA TTT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G

### 2.2.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden normalerweise auf YPD oder Laktatmedium bei 30°C und temperatursensitive Mutanten bei 24°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 140 Upm in Erlenmeyerkolben in Schüttlern inkubiert. Zum Animpfen wurde entweder eine Hefekolonie von einer Agarplatte oder Zellen direkt aus einem Glycerol-Stock (15% (v/v)), welcher bei -80°C gelagert wurde, verwendet. Zur Selektion von Hefestämmen mit bestimmten Markergenen wurde SD- bzw. SGal-Medium benutzt, das entsprechend den gewünschten Selektionsbedingungen mit Markersubstanzen versetzt war. Atmungsdefiziente Hefestämme, die nicht auf Laktatmedium wuchsen, wurden in YPGal oder YPD kultiviert. Die Selektion gegen das Wildtyp (WT)-*URA3*-Allel erfolgte auf 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) Medium (SD-Medium mit 0,1% (w/v) 5-Fluor-Orotsäure und 50 mg/l Uracil) (Boeke et al., 1987).

Für die Präparation von Mitochondrien wurden die entsprechenden Hefestämme ca. drei Tage in steigenden Volumina kultiviert, wobei darauf geachtet wurde, dass die OD<sub>600</sub> 1,2 nicht überschritt. Zur Depletion essenzieller Proteine wurde der Hefestamm, welcher das essenzielle Gen unter Kontrolle des *GALI10* Promotors enthielt, zunächst ca. 2 Tage in Galaktose-haltigem Medium angezogen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, mit sterilem Wasser gewaschen und in Glukose-haltigem Medium resuspendiert, in welchem sie für eine definierte Zeit weiter wuchsen.

Laktat-Medium	3 g Hefeextrakt,	1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	1 g NH <sub>4</sub> Cl,
	0,5 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O,	0,5 g NaCl,	
	1,1 g MgSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O,	0,3 ml 1% FeCl <sub>3</sub> ,	
	22 ml 90% Milchsäure, H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen; in der Regel mit 0,1% Glukose oder 0,1% Galaktose supplementiert		

YP-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H <sub>2</sub> O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: + 100 ml 20% Galaktose (YPGal) oder + 100 ml 20% Glukose (YPD) oder + 100 ml 30% Glycerol (YPG)
S-Medium	1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäurereste und Ammoniumsulfat, 5 g Ammoniumsulfat, H <sub>2</sub> O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% Galaktose (SGal) oder 100 ml 20% Glukose (SD) oder 100 ml 30% Glycerol (SG). Von den Stammlösungen der Markersubstanzen wurden unter Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophiemarker 2 ml Tryptophan und Histidin, bzw. 3 ml Leucin und Lysin (Stammlösungen 10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (Stammlösung 2 g/l) pro Liter Medium zugesetzt.

Zur Herstellung entsprechender Platten wurde dem Medium 2% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

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

Hefestämme wurden in Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 passagiert. Danach wurde folgende Verdünnungsreihe in H<sub>2</sub>O angesetzt: 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005; 0,00005 OD<sub>600</sub>. Pro Verdünnung wurden 5 µl auf die gewünschten Agarplatten aufgetragen. Diese wurden bei der zu untersuchenden Temperatur 2-7 Tage inkubiert.

### 2.2.4. Transformation von *S. cerevisiae*

Hefestämme wurden nach dem Protokoll von Gietz mit Lithiumacetat transformiert (Gietz et al., 1992). Die Hefen wurden üN in 50 ml YPD bzw. SD-Medium mit den entsprechenden Markersubstanzen bei 30°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in 50 ml Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 verdünnt. Nachdem die Kulturen erneut eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht hatten wurden sie durch Zentrifugation (3000xg, 5 min, RT) geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen, erneut geerntet, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden abermals pelletiert, in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und

entsprechend der Anzahl an Transformationen in 50 µl Portionen auf verschiedene Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde mit 240 µl 50% (w/v) PEG 3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl beschallter, denaturierter Lachs-Spermien-DNA (10 mg/ml) und 50 µl DNA (0,1-10 µg Plasmid-DNA oder 25 µl PCR-Produkt+25 µl ddH<sub>2</sub>O) in dieser Reihenfolge versetzt, stark gemischt, für 30 min bei 30°C inkubiert und 20-25 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500xg, 15 s, RT) pelletiert, in 800 µl YPD-Medium resuspendiert und 2-3 h bei 30°C inkubiert. Nach erneutem Ernten wurde das Pellet in 150 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf selektives Medium ausplattiert.

### 2.2.5. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Die Präparation von Hefe-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Rose (Rose et al., 1990). Hefezellen aus einer stationären 50 ml YPD-Kultur wurden durch Zentrifugation (3000xg, 5 min, RT) geerntet, in 1 ml Zymolyase-Lösung (100 µg/ml Zymolyase, 1 M Sorbitol, 100 mM EDTA) resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit 1 ml 1 M Sorbitol, 100 mM EDTA, wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer A (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 7,5) für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 5 M Kaliumacetat zugesetzt, die Probe 1 h auf Eis inkubiert und danach die Zellbruchstücke durch Zentrifugation (20000xg, 15 min, 4°C) abgetrennt, bevor die DNA aus dem Überstand durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol gefällt wurde. Die DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert.

## 2.3. Methoden der Proteinbiochemie

### 2.3.1. Präparation von Proteinen

#### 2.3.1.1. Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter mitochondrialer Vorstufenproteine wurde das entsprechende Gen in pGEM4 Vektoren (Promega) unter Kontrolle des SP6 Promotors kloniert. Die Translation wurde in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]Methionin durchgeführt.

### a) *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde in modifizierter Form nach Melton durchgeführt (Melton et al., 1984).

Ein typischer Transkriptionsansatz (100  $\mu$ l) enthielt 20  $\mu$ l 5x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin, pH 7,5), 10  $\mu$ l 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 4  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l), 20  $\mu$ l NTPs (jeweils 10 mM), 5,2  $\mu$ l m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, 3  $\mu$ l SP6 RNA-Polymerase, 27  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 10  $\mu$ l Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l 10 M LiCl und 300  $\mu$ l Ethanol dazugegeben, 30 min bei -20°C inkubiert und die RNA pelletiert (36700xg, 20 min, 4°C). Nach Waschen mit 70% (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation (36700xg, 5 min, 4°C) wurde die RNA 10 min bei RT getrocknet, in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit 1  $\mu$ l RNasin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### b) *in vitro*-Translation

Die *in vitro*-Translation wurde nach Pelham durchgeführt (Pelham und Jackson, 1976).

Ein typischer Translationsmix (148,5  $\mu$ l) enthielt 100  $\mu$ l Kaninchen-Retikulozytenlysats (Promega), 40 U RNasin, 3,5  $\mu$ l Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 1mM), 12  $\mu$ l [<sup>35</sup>S]Methionin (10 mCi/ml), 7  $\mu$ l 15 mM Magnesiumacetat und 25  $\mu$ l RNA. Der Ansatz wurde 1 h bei 30°C inkubiert und anschließend der Einbau radioaktiven Methionins durch Zugabe von 12  $\mu$ l 58 mM nicht radioaktiv markierten Methionins gestoppt. Nach Zugabe von 24  $\mu$ l 1,5 M Saccharose wurden Ribosomen und aggregierte Proteine durch Zentrifugation (125000xg, 30 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### c) TNT gekoppeltes Retikulozytenlysats-System

Als Alternative zu getrennter Transkription und Translation bietet das System von TNT die Möglichkeit, beide Schritte in einem Ansatz durchzuführen. Ein typischer TNT-Ansatz (50  $\mu$ l) enthielt 25  $\mu$ l TNT Kaninchen-Retikulozytenlysats (Promega), 2  $\mu$ l TNT Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l TNT SP6 RNA-Polymerase, 1  $\mu$ l Aminosäuremix, 2  $\mu$ l [<sup>35</sup>S]Methionin (10 mCi/ml), 1  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l DNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Der TNT Ansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Ribosomen und aggregierte Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation (125000xg, 30 min, 4°C) entfernt, der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

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

Das Hexahistidinpeptid-Fusionsprotein His<sub>6</sub>-Tob38, kodiert auf dem Plasmid pQE30 (Qiagen, Hilden), wurde gereinigt, um ein spezifisches Antiserum gegen Tob38 herzustellen. Dazu wurde das Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Chromatographie bei RT gereinigt (Hochuli, 1988).

Eine *E. coli*-Kultur, welche His<sub>6</sub>-Tob38 exprimiert, wurde üN bei 37°C in LB<sup>Amp</sup>-Medium unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden mit 10 ml dieser Kultur 500 ml LB<sup>Amp</sup> beimpft und zwei weitere Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht hatte. Dann wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 2 h induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (4400xg, 5 min, RT), in 30 ml Puffer A (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 6 M Guanidinium-HCl, pH 8,0) resuspendiert und 40 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (27200xg, 15 min, RT) entfernt und der klare Überstand auf eine 1 ml Ni-NTA-Agarose-Säule geladen, die zuvor mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Puffer A äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, pH 8,0) und 20 ml Puffer B (pH 6,3) gewaschen bevor das gebundene Protein mit 15 ml Puffer B (pH 4,5) eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt wurde. Die Reinigung wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (siehe 2.3.2.) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 2.3.5.) überprüft. Sollte das gereinigte Protein an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt werden (siehe 2.5.3.2.) enthielten alle Puffer 6 M Guanidinium-HCl anstatt 8 M Harnstoff.

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

Das Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsprotein MBP-Mim1, kodiert auf dem Plasmid pMal-cRI (New England Biolabs), wurde gereinigt, um ein spezifisches Antiserum gegen Mim1 herzustellen. Mit 10 ml einer *E. coli* Über-Nacht-Kultur, welche das Fusionsprotein exprimiert, wurden 250 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium beimpft und diese Kultur 2 h bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Dann wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 3 h induziert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4400xg, 10 min, RT) und in 20 ml Puffer C (20 mM HEPES-NaOH, 200 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), pH 7,4) resuspendiert. Um die Zellwand abzdauen wurde 1 mg/ml Lysozym zugesetzt und die Lösung 45 min bei 4°C inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung wurden die Zellen komplett aufgebrochen (10 x 12s, Branson Sonifier, setting 4, 80% duty cycle). Danach wurden die

Zellbruchstücke abzentrifugiert (27200xg, 15 min, 4°C) und der klare Überstand auf eine 6 ml Amylose-Säule, die zuvor mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Puffer C äquilibriert worden war, geladen. Die Säule wurde mit 60 ml Puffer C gewaschen und das gebundene Protein mit 10 mM Maltose in Puffer C eluiert. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.2.) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 2.3.5.) überprüft.

### **2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteine wurden gemäß ihrer Größe durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden zwei Elektrophoresesysteme unterschiedlicher Größe benutzt. Große Gele setzten sich aus Bodengel (1 x 15 x 0,1 cm), Trenngel (9 x 15 x 0,1 cm) und Sammelgel (2 x 15 x 0,1 cm) zusammen. Das zweite Elektrophoresesystem für kleinere Gele stammte von der Firma Bio-Rad (Mini-PROTEAN II) und hatte die Abmessungen 1,5 x 7,2 x 0,1 cm für das Sammelgel und 5,5 x 7,2 x 0,1 cm für das Trenngel. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel richtete sich nach der Größe der zu trennenden Proteine.

<u>Bodengel:</u>	20% (w/v) Acrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS), 0,25% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	0,4% (w/v) Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS,
<u>Trenngel:</u>	8-16% (w/v) Acrylamid, 380 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,05% (w/v) APS,	0,16-0,33% (w/v) Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED
<u>Sammelgel:</u>	5% (w/v) Acrylamid, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,05% (w/v) APS,	0,1% (w/v) Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,1% (w/v) SDS	384 mM Glycin,

Die Proben wurden in 1 x Laemmli-Puffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol) gelöst und 3 min auf 95°C erhitzt. Große Gele liefen konstant bei 30 mA für ca. 2 h, kleine Gele bei 25 mA für ca. 50 min. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie (siehe 2.3.5.) oder Silber gefärbt (siehe 2.3.6.) oder auf Nitrozellulose-Membran transferiert

(siehe 2.3.7.). Zur Überprüfung des Transfers und um die Markerproteine sichtbar zu machen wurden Nitrozellulose-Membranen reversibel mit einer Ponceau S Lösung (2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)) angefärbt.

### **2.3.3. High Tris-Harnstoff SDS-PAGE**

High Tris-Harnstoff SDS-PAGE wurde zur Analyse kleiner Proteine unter 15 Kilodalton (kDa) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 35 mA für 2 h 40 min durchgeführt.

<u>Trenngel:</u>	20% (w/v) Acrylamid,	0,25% (w/v) Bisacrylamid,
	6 M Harnstoff,	0,1% (w/v) SDS,
	0,75 M Tris-HCl, pH 8,8,	0,05% (w/v) APS,
	0,25% (v/v) TEMED	
<u>Sammelgel:</u>	5% (w/v) Acrylamid,	0,07% (w/v) Bisacrylamid,
	6 M Harnstoff,	125 mM Tris-HCl, pH 6,8,
	0,1% (w/v) SDS,	0,05% (w/v) APS,
	0,25% (v/v) TEMED	
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0,	200 mM Glycin,
	0,1% (w/v) SDS	

### **2.3.4. Blaue Nativgelelektrophorese (BNGE)**

Proteinkomplexe wurden unter nativen Bedingungen mittels BNGE analysiert (Schägger et al., 1994). Mitochondrien (50-150 µg) wurden in 30-45 µl Puffer N (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF) entweder mit 0,2-1% (w/v) Digitonin oder 0,5% (v/v) Triton X-100 oder 0,2% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) 15 min bei 4°C solubilisiert. Aggregiertes und nicht solubilisiertes Material wurde abzentrifugiert (36700xg, 20 min, 4°C), der Überstand mit 5 µl Probenpuffer (5% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250, 100 mM BisTris-HCl, 500 mM 6-Aminocaprinsäure, pH 7,0) versetzt und auf ein lineares Gradientengel geladen. In der Regel wurden 6-13% Gele verwendet, es kamen aber auch 5-12% oder 5-10% Gele zum Einsatz, je nachdem in welchem Molekulargewichtsbereich eine optimale Auflösung gewünscht war. Die Elektrophorese wurde zunächst bei konstanten 100 V bei 4°C durchgeführt. Nach ungefähr einer Stunde, nachdem die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 500 V (bei maximal 15 mA) erhöht. Nach etwa

der Hälfte des Gellaufs wurde der Kathodenpuffer gegen einen Puffer gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Coomassie, ausgetauscht. Nachdem die Lauffront das Bodengel erreicht hatte wurde die Elektrophorese gestoppt und die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (siehe 2.3.7.). Als Größenstandards dienten Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa) und Rinderserumalbumin (BSA) (Monomer 66 kDa, Dimer 132 kDa).

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

Trenngel: in der Regel linearer Gradient aus 6-13% (w/v) Acrylamid,  
0,15-0,3% (w/v) Bisacrylamid, 5% (v/v) Glycerol,  
0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM BisTris-HCl, pH 7,0,  
0,04% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED

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

Kathodenpuffer: 50 mM Tricine, 15 mM BisTris, pH 7,0,  
mit oder ohne 0,02% (w/v) Serva Blau G

Anodenpuffer: 50 mM BisTris-HCl, pH 7,0

### 2.3.5. Coomassie-Färbung von Gelen

Nach der SDS-PAGE wurden das Boden- und Sammelgel entfernt und das Trenngel zur Anfärbung der Proteine für 30 min in einem Färbebad (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) H<sub>2</sub>O) inkubiert. Das Gel wurde anschließend im Entfärbebad (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 60% (v/v) H<sub>2</sub>O) so lange entfärbt bis die Proteinbanden auf einem klaren Hintergrund sichtbar waren.

### 2.3.6. Silberfärbung von Gelen

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde gemäß Bloom durchgeführt (Bloom et al., 1987). Das Trenngel wurde zunächst 30-60 min in einer Fixierlösung aus 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure und 50  $\mu$ l 37% Formaldehyd pro 100 ml inkubiert. Danach wurde es zweimal 10 min in 50% (v/v) Ethanol, einmal 1 min in 0,02% (w/v)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  und dreimal 20 s in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wurde das Gel 15 min in 0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$  mit 75  $\mu\text{l}$  37% Formaldehyd pro 100 ml und zweimal 20 s in  $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert. Schließlich wurde es mit einer 6% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, der 2 ml 0,02% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  und 50  $\mu\text{l}$  37% Formaldehyd pro 100 ml zugesetzt worden waren, je nach gewünschter Intensität der Färbung 1-15 min entwickelt. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen in Wasser und schließlich durch Zugabe einer wässrigen Lösung von 50 mM EDTA, pH 8,0, gestoppt.

### **2.3.7. Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen**

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Kyshe-Anderson, 1984; Towbin et al., 1979), wohingegen Proteine nach Auftrennung mittels BNGE auf PVDF-Membranen transferiert wurden.

PVDF-Membranen wurden vor dem elektrophoretischen Transfer zunächst durch eine kurze Inkubation von 15-30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurden sie 2 min in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und dann in Blotpuffer (20 mM Tris (pH nicht eingestellt), 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS) überführt. Im Gegensatz dazu wurden Nitrozellulose-Membranen direkt in Blotpuffer gegeben. Die entsprechende Membran wurde zuerst auf zwei mit Blotpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere, die zuvor auf der Graphitelektrode (Anode) platziert worden waren, gelegt. Dann wurde die Membran mit dem Trenngel und zwei weiteren mit Blotpuffer getränkten Whatman 3MM Filterpapieren überschichtet, bevor die zweite Graphitelektrode (Kathode) darauf platziert wurde. Der Transfer wurde mit  $1,5\text{mA}/\text{cm}^2$  für 1,5 h durchgeführt, was bei unseren Gelen mit einer Größe von ca. 15 cm x 9 cm 200 mA entsprach. Der Elektrotransfer auf PVDF-Membranen wurde bei 220 mA 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### **2.3.8. Autoradiographie**

Radioaktiv markierte Proteine, die nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert worden waren, wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen (BioMax MR, Kodak) sichtbar gemacht. Dazu wurde der Film auf die Blotmembran aufgelegt und nach entsprechender Inkubationsdauer entwickelt (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert). Alternativ wurden Phosphorimaging-Platten auf die Membranen mit den radioaktiv markierten Proteinen gelegt und nach gewünschter Expositionszeit die Intensität

der Banden mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji Bas3000, Aida Image Analyzer 3.4.3 software) quantifiziert.

### 2.3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Proteinlösungen (1-10  $\mu$ l) wurden mit 1 ml des 1:5 verdünnten BioRad Bradford Reagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer Eichkurve, die mit definierten Mengen des Proteins IgG erstellt worden war, bestimmt.

### 2.3.10. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 12% (w/v) ausgefällt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (36700xg, 20 min, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, 5 min bei RT getrocknet und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

### 2.3.11. Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Wässrige Proteinlösungen wurden bei 4°C mit 2 Volumina an gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (36700xg, 10 min, 4°C), die Überstände verworfen und die Pellets im gewünschten Puffer resuspendiert.

Zur Herstellung der gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurden 76,7 g Ammoniumsulfat in 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, gelöst und anschließend die Lösung auf 4°C abgekühlt, damit sich Ammoniumsulfatkristalle bilden konnten.

### 2.3.12. Gelfiltration

Die Gelfiltration dient der Trennung von Proteinkomplexen und Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes. Verwendet wurde ein ÄKTA-Chromatographiesystem (Pharmacia) mit einer Superose6-Gelfiltrationssäule (Pharmacia).

Mitochondrien (900  $\mu$ g) wurden in einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml in Lysepuffer B (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 1% (w/v) Digitonin, pH 8,0) resuspendiert und 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden unlösliche Aggregate abzentrifugiert (125000xg, 20 min, 4°C) und der Überstand auf

die mit zwei Säulenvolumina Lysepuffer B mit 0,05% (w/v) Digitonin voräquilibrierte Superose6-Säule geladen (600 µl Lysat, 500 µl Probenschleife). Der Lauf wurde mit einer Flussrate von 0,25 ml/min durchgeführt und es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Proteine wurden mit TCA anschließend gefällt und mittels Immunoblot (siehe 2.5.6.) analysiert. Als Größenmarker wurden Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Alkoholdehydrogenase (50 kDa) oder Carboanhydrase (29 kDa) verwendet. Alle Markerproteinlösungen wurden zentrifugiert (125000xg, 20 min, 4°C) bevor sie auf die Gelfiltrationssäule geladen wurden.

## 2.4. Methoden der Zellbiologie

### 2.4.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

Zur Gewinnung von Gesamtzellprotein wurden die Hefen alkalisch aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen (1 OD<sub>600</sub>) geerntet, in 400 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 75 µl einer Mischung aus 1,85 M NaOH, 9,2% (v/v) Ethanol und 7,7% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Die Probe wurde anschließend 10 min bei RT geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Durch Zugabe von 600 µl 50% (w/v) TCA wurde die Probe gefällt. Die Proteine wurden in 40 µl 2 x Laemmli-Puffer lysiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.4.2. Isolierung von Rohmitochondrien aus *S. cerevisiae*

Zellen (10 OD) wurden mittels Zentrifugation (3000xg, 5 min, RT) geerntet, mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, in SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2) mit 1 mM PMSF resuspendiert und mit 0,3 g Glaskügelchen (Durchmesser 0,3 mm) versetzt. Die Proben wurden jeweils viermal 30 s gevortext, wobei die Proben nach jedem Vortexschritt 30 s auf Eis gekühlt wurden. Zellbruchstücke wurden durch einen Zentrifugationsschritt (1000xg, 3 min, 4°C) sedimentiert, der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10000xg, 10 min, 4°C). Das die Mitochondrien enthaltende Pellet wurde in 30 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert, 10 min bei RT geschüttelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.4.3. Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte im Wesentlichen nach Daum (Daum et al., 1982). Hefezellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,5 kultiviert, durch einen Zentrifugationsschritt (4400xg, 5 min, RT) sedimentiert und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach

wurde das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und diese in einer Konzentration von 0,5 g/ml in DTT-Puffer (100 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, pH 9,4) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unter Schütteln 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen reisoliert, mit 200 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen und für den enzymatischen Aufschluss der Zellwände in Zymolyase-Puffer (3 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht, 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) in einer Konzentration von 0,15g/ml aufgenommen. Die Suspension wurde unter Schütteln 30-60 min bei 30°C inkubiert und die Sphäroplastenbildung durch osmotische Lyse verfolgt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 2 ml H<sub>2</sub>O oder 2 ml 1,2 M Sorbitol gemischt. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD<sub>600</sub> des Wassergemisches 10-20% der OD<sub>600</sub> des Sorbitolgemisches betrug.

Die folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C unter Verwendung gekühlter Geräte durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden mittels Zentrifugation (3000xg, 5 min, 4°C) reisoliert und in einer Konzentration von 0,15 g/ml in Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) resuspendiert. Die Sphäroplasten wurden mit einem Dounce-Homogenisator durch zehn Stöße geöffnet. Zelltrümmer und ungeöffnete Zellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (2000xg, 5 min, 4°C) abgetrennt und die Mitochondrien durch Zentrifugation (17400xg, 12 min, 4°C) sedimentiert. Diese wurden in 10 ml SEM-Puffer aufgenommen, erneut von ganzen Zellen und Zellbruchstücken gereinigt (2000xg, 5 min, 4°C) und reisoliert (17400xg, 12 min, 4°C). Schließlich wurden die Mitochondrien in einem kleinen Volumen SEM-Puffer aufgenommen, die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt, in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.4. Subfraktionierung von Hefezellen

Die Subfraktionierung von Hefezellen wurde wie von Meisinger beschrieben mit leichten Modifikationen durchgeführt (Meisinger et al., 2000). Zunächst wurde wie unter 2.4.3. beschrieben vorgegangen, allerdings enthielt der Homogenisierungspuffer nur 0,02% (w/v) BSA. Nach dem Sedimentieren der Mitochondrien wurde der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes zur Gewinnung von Mikrosomen und Cytosol verwendet. Dazu wurde der Überstand erneut zentrifugiert (100000xg, 1 h, 4°C). Das Pellet dieses Schrittes enthielt die Mikrosomen, welche in SEM-Puffer resuspendiert wurden, und der Überstand die cytosolische Fraktion. Sowohl die Mikrosomen als auch das Cytosol wurden in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Mitochondrienfraktion wurde zunächst wie unter 2.4.3. beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Mitochondrien über einen Saccharose-Stufen-Gradienten weiter gereinigt. Der Gradient war aus den Stufen 15%, 23%, 32% und 60% (w/v) Saccharose in 10 mM MOPS-KOH, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,2, gebildet worden. Die Mitochondrien wurden in einer Konzentration von 5 mg/ml in SEM-Puffer auf den Gradienten geladen und zentrifugiert (134000xg, 1 h, 2°C). Die Bande zwischen 32% und 60% Saccharose enthielt die gereinigten Mitochondrien und wurde gesammelt. Die Mitochondrien wurden mit zwei Volumina SEM-Puffer verdünnt und sedimentiert (17400xg, 12 min, 2°C). Anschließend wurden sie in einem kleinen Volumen SEM-Puffer aufgenommen, die Konzentration auf 10 mg/ml eingestellt, in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.4.5. *In vitro* Proteinimport in isolierte Mitochondrien

Die zu importierenden Vorstufenproteine wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]Methionin synthetisiert. Die Importreaktionen wurden entweder in F5-Puffer (0,03-3% (w/v) BSA, 250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 100 µg/ml Kreatinkinase, 5 mM Kreatinphosphat, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2) oder SI-Puffer (0,03-3% (w/v) BSA, 0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM MgOAc, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 100 µg/ml Kreatinkinase, 5 mM Kreatinphosphat, 50 mM HEPES-KOH, pH 7,2) durchgeführt. Importreaktionen, die anschließend auf blauen Nativgelen analysiert wurden, enthielten zusätzlich 5 mM kaltes Methionin.

Die Vorstufenproteine wurden bei verschiedenen Temperaturen für unterschiedliche Zeitpunkte importiert. In manchen Fällen wurden die Mitochondrien vor oder nach der Importreaktion mit Proteasen behandelt. Zur Entfernung cytosolischer Domänen von Importrezeptoren vor dem Import wurden die Mitochondrien 15 min mit 100 µg/ml Trypsin auf Eis inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe eines dreißigfachen Masseüberschusses an Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI) gestoppt und der anschließende Import wurde standardmäßig durchgeführt.

Die Proteasebehandlung von Mitochondrien unter isotonischen Bedingungen nach dem Import diente dem Abbau von nicht importierten Vorstufenproteinen, die nach der Importreaktion an der Außenmembran hafteten oder nur partiell importiert worden waren. Proteasebehandlungen nach dem Import wurden entweder mit Proteinase K (PK) oder Trypsin in den jeweils angegebenen Konzentrationen für 15 min auf Eis durchgeführt. Die

Proteaseverdauung wurden durch Zugabe von 1 mM PMSF im Falle von PK oder durch Zugabe von STI im Falle von Trypsin und anschließender Inkubation für 5 min auf Eis gestoppt.

Zur Blockierung des TOM-Kanals während einer Importreaktion wurden 40% (w/w) der Menge eingesetzter Mitochondrien an rekombinantes pSu9(1-69)-DHFR, ein Fusionsprotein bestehend aus der mitochondrialen Matrix-Signalsequenz der Untereinheit 9 der F<sub>0</sub>-ATPase aus *N. crassa* und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus, zugegeben.

Nach den Importreaktionen wurden die Mitochondrien sedimentiert (13200xg, 10 min, 4°C) und in 2 x Laemmli-Puffer lysiert. Importierte und gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

### 2.4.6. Erzeugung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen

Mitochondrien in SI-Puffer wurden 1:10 in 20 mM HEPES-KOH, pH 7,2, verdünnt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten wurden abzentrifugiert (13200xg, 10 min, 4°C) und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Effizienz der Mitoplastenbildung wurde durch Immunodekoration (siehe 2.5.6.) von löslichen Intermembranraumproteinen überprüft.

### 2.4.7. Carbonatextraktion

Die Carbonatextraktion trennt lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen (Fujiki et al., 1982). Mitochondrien wurden sedimentiert, in einem Puffer, bestehend aus 10 mM HEPES-KOH, 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die integralen Membranproteine sedimentiert (125000xg, 30 min, 2°C) und in 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert. Die löslichen und peripher membranassoziierten Proteine im Überstand wurden mit TCA gefällt und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

Die Kombination von alkalischer Extraktion und anschließender Flotations-Gradientenzentrifugation stellt eine Verbesserung der herkömmlichen Carbonatextraktion dar. Integrale Membranproteine sammeln sich dabei mit den Lipiden im oberen Bereich des Gradienten, wohingegen aggregierte und nicht in die Membran integrierte Proteine am Boden zu finden sind. Dazu wurden die Proben (100 µl) mit 166 µl 2,4 M Saccharose gemischt, in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit 250 µl 1,2 M Saccharose, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 100 µl SEM, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> überschichtet. Danach wurden sie zentrifugiert (485000xg, 2 h, 4°C). Anschließend wurden von oben vom Gradienten zunächst 250 µl und dann zweimal 150 µl abgenommen. Die Fraktionen wurden mit 20 mM HEPES-KOH, pH 7,4, auf 600 µl aufgefüllt, mit TCA gefällt und in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen.

### 2.4.8. Antikörpershift

Zunächst wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine *in vitro* in Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Organellen sedimentiert (13200xg, 10 min, 4°C) und in 30 µl Puffer N + 1% (w/v) Digitonin 15 min auf Eis solubilisiert. Danach wurden jeweils 5 µl der gewünschten Immunglobuline G (IgGs) oder des gewünschten gereinigten Antikörpers zu den Proben gegeben und 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Aggregiertes und nicht solubilisierendes Material wurde abzentrifugiert (36700xg, 20 min, 4°C) und die Proben mittels BN-GE analysiert.

### 2.4.9. Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Wildtyp-Hefen, die ein GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 in SG-Medium, das entsprechend den gewünschten Selektionsbedingungen mit Markersubstanzen versetzt war, kultiviert. Die Mitochondrien wurden zusätzlich mit 0,1 µM Rhodamin B-Hexylester (Molecular Probes) durch 15 min Inkubation der Hefezellen im Drehrad angefärbt. Für die Analyse im Mikroskop wurden 100 µl Zellsuspension durch Zugabe von 0,5% (w/v) Low Melting Point Agarose auf einem Objektträger fixiert. Die Aufnahmen wurden an einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss GmbH, Jena) unter Verwendung einer 100 W Quecksilber-Lampe gemacht. Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz Nr. 09 verwendet (Anregung: 450-490 nm, Emission: > 515 nm), für Rhodamin B-Hexylester Filtersatz Nr. 15 (Anregung: 534-558 nm, Emission > 590 nm) (Heim und Tsien, 1996). Die Bilder wurden mit einer SPOT-gekühlten Digitalkamera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI) aufgenommen und mit der MetaMorph Imaging Software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) prozessiert.

### 2.4.10. Affinitätsfällung von Tob55 mit Ni-NTA-Agarose

Mitochondrien aus dem Gal-His<sub>8</sub>-Tob55-Hefestamm, welcher Tob55 mit einem Oktahistidinanhang am N-Terminus exprimiert, wurden zur Kopräzipitation von potentiellen neuen Komponenten des TOB-Komplexes mit Tob55 verwendet. Mitochondrien aus dem korrespondierenden WT-Hefestamm wurden als Kontrolle analog behandelt. Die Mitochondrien (10 mg) wurden in Lysepuffer C (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1% (w/v) Digitonin, 1 mM PMSF, 10 mM Imidazol, pH 7,4) solubilisiert. Danach wurde nicht vollständig solubilisierendes Material abzentrifugiert (125000xg, 20 min, 4°C), 1% als Kontrolle

abgenommen und die darin enthaltenen Proteine mit TCA gefällt. Das restliche Lysat wurde auf eine 1 ml Ni-NTA-Agarose-Säule geladen, die zuvor mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Lysepuffer C mit 0,05% (w/v) Digitonin äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Lysepuffer C mit 0,05% (w/v) Digitonin gewaschen, bevor das gebundene Protein mit 6 ml Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 300 mM Imidazol, 0,05% (w/v) Digitonin, pH 7,4) eluiert wurde. Die im Eluat enthaltenen Proteine wurden mittels TCA gefällt und nach ihrer Autrennung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung massenspektrometrisch identifiziert.

### 2.4.11. Affinitätsfällung von Tob38 mit Ni-NTA-Agarose

Mitochondrien aus dem Tob38-His<sub>7</sub>- bzw. dem *Δmas37*/Tob38-His<sub>7</sub>-Hefestamm, welche Tob38 mit einem Heptahistidinanhang am C-Terminus exprimieren, wurden zur Kopräzipitation von importierten mitochondrialen Vorstufenproteinen bzw. von Komponenten des TOB-Komplexes mit Tob38 verwendet. Die Mitochondrien (150 µg) wurden mit Lysepuffer C solubilisiert. Danach wurde nicht vollständig solubilisiertes Material abzentrifugiert (36700xg, 20 min, 4°C), 20-50% als Kontrolle abgenommen und die darin enthaltenen Proteine entweder mit TCA gefällt oder mittels BNGE analysiert. Das restliche Lysat wurde 1 h bei 4°C mit 40 µl Ni-NTA-Agarose, welche zuvor mit Lysepuffer C äquilibriert worden war, inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose dreimal mit Lysepuffer C (0,05% (w/v) Digitonin) und einmal mit SEMK<sup>20</sup> (SEM + 20 mM KCl) gewaschen, die gebundenen Proteine mit 2 x Laemmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting (siehe 2.5.6.) bzw. Autoradiographie analysiert.

Die Affinitätsfällung wurde auch zur Depletion von Importintermediaten benutzt. Dabei wurde die Ni-NTA-Agarose nach Inkubation mit dem Lysat kurz abzentrifugiert (9200xg, 15 s, 4°C) und der Überstand mittels BNGE und Autoradiographie analysiert.

## **2.5. Immunologische Methoden**

### **2.5.1. Hergestellte Antikörper**

**Tab. 3. Antikörper**

Antikörper	Antigen	Kaninchen
$\alpha$ -Tob38 ( <i>S.c.</i> )	His <sub>6</sub> -Tob38	327, 328
$\alpha$ -Mim1 ( <i>S.c.</i> )	MBP-Mim1	350,351
$\alpha$ -Mim1 ( <i>S.c.</i> )	Peptid C-NHRNKGKGVYPESRK (Pineda, Berlin)	

### **2.5.2. Gewinnung polyklonaler Kaninchen-Antiseren**

Zur Erzeugung polyklonaler Antiseren wurden in Bakterien exprimierte rekombinante Proteine eingesetzt. Gereinigte rekombinante Proteine wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Ponceau S angefärbt. Für jede Injektion wurden 4 Banden (200  $\mu$ g Protein) ausgeschnitten und die Nitrozellulose in 300  $\mu$ l DMSO aufgelöst (Knudsen, 1985). Die Antigenlösung wurde für die Erstinjektion mit 300  $\mu$ l „TiterMax“ (CytRX) versetzt. Für die nachfolgenden Injektionen, die ab der zweiten Injektion im Abstand von ca. vier Wochen erfolgten, wurden 300  $\mu$ l Antigenlösung mit 300  $\mu$ l Freudschen Adjuvans (inkomplett) (Sigma) gemischt. Das Antigen wurde subkutan nahe der Lymphknoten in der Achselregion der Kaninchen gespritzt. Zu Beginn der Immunisierung wurde das Antigen im Abstand von zwei Wochen zweimal gespritzt bevor das Kaninchen zum ersten Mal geblutet wurde.

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

### **2.5.3. Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Antikörperreinigung**

#### **2.5.3.1. Kopplung von Peptiden an SulfoLink Gel**

Peptidantikörper gegen Mim1 wurden mit Hilfe einer Affinitätssäule, an die zuvor das entsprechende Peptid gekoppelt worden war, gereinigt. Dieses Peptid trug am Aminoterminus ein zusätzliches Cystein, welches für die Kopplung an das SulfoLink Gel (Pierce) notwendig ist.

SulfoLink Gel (1 ml) wurde in eine passende Säule gepackt und mit 6 ml Puffer D (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5) äquilibriert. Danach wurde die Säule am Boden verschlossen und ein mg Peptid in 1 ml Puffer D zugegeben. Anschließend wurde die Säule auch am oberen Ende verschlossen, 15 min bei RT vorsichtig gerollt und weitere 30 min bei RT ohne Mischen inkubiert. Dann wurde die Säule mit 3 ml Puffer D gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mittels Inkubation mit 50 mM Cystein in 1 ml Puffer D wie oben beschrieben abgesättigt. Schließlich wurde mit je 16 ml 1 M NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und die Säule unter 0,05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

#### **2.5.3.2. Kopplung rekombinanter Proteine an CNBr (Cyanbromid)-aktivierte Sepharose**

Antikörper gegen Tob38 und Mim1 wurden mit Hilfe von Affinitätssäulen gereinigt, die durch Kopplung des rekombinanten Antigens an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham) hergestellt worden waren. Proteine binden an CNBr-aktivierte Sepharose kovalent über ihre freien Aminogruppen und deshalb mussten alle anderen Substanzen mit Aminogruppen aus der Proteinlösung vor dem Kopplungsschritt entfernt werden. Dies wurde durch Umpuffern mit Hilfe einer PD-10 Säule (Amersham) erreicht. Die Säule wurde zunächst mit 30 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3 (und 6 M Guanidinium-HCl, wenn das Protein unter denaturierenden Bedingungen gekoppelt werden sollte), äquilibriert. Die Proteinlösung (ca. 5 mg Protein) wurde, falls nötig, mit Äquilibrierungspuffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt und auf die Säule geladen. Nachdem diese 2,5 ml die Säule passiert hatten wurden die folgenden 3,5 ml, die das Protein enthielten, gesammelt. Anschließend wurde die Probe gekoppelt.

Hierzu wurden zu 0,4 g CNBr-aktivierte Sepharose (ergibt 1 ml Gel) 5 ml einer 1 mM HCl-Lösung gegeben. In dieser Suspension konnte das Säulenmaterial während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur quellen. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial mit 200 ml einer 1 mM HCl-Lösung gewaschen und in eine geeignete Säule überführt. Das Endvolumen der Säule betrug 1 ml. Zur Kopplung des Antigens wurde das vorbehandelte

Säulenmaterial mit der Proteinlösung versetzt und 1 h im Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 6 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3 (an dieser Stelle ist kein Guanidinium-HCl mehr nötig, da die Proteine an das Säulenmaterial gebunden haben), wurden freie Bindungsgruppen durch 0,1 M Ethanolamin, pH 8,0, abgesättigt. Dabei wurden zunächst 6 ml dieser Lösung auf die Säule gegeben, anschließend zwei ml abgelassen und die Säule in der verbleibenden Lösung 2 h bei RT stehen gelassen. Danach erfolgte dreimaliges abwechselndes Waschen der Säule mit je 6 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0, und 6 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0. Mit diesem Schritt sollten alle unspezifisch und nicht kovalent gebundenen Proteine von der Säule entfernt werden. Abschließend wurde mit 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen und die Säule in 0,05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

### 2.5.4. Affinitätsreinigung von Antikörpern

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

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

### **2.5.5. Reinigung von Immunglobulin G**

Antiserum (4 ml) wurde zentrifugiert (20000xg, 20 min, 4°C) und der weiße Oberflächenfilm aggregierter Lipide entfernt. Anschließend wurde das Antiserum mit 10 ml Puffer E (100 mM Kaliumphosphat, pH 8,5) verdünnt, filtriert und auf eine 5 ml ProteinA-Superose-Säule (Pharmacia), die zuvor mit Puffer E äquilibriert worden war, geladen. Danach wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer E gewaschen und dann die gebundenen IgGs mit Puffer F (100 mM Zitrat-NaOH, pH 3,0) eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 2 ml 2 M Tris-HCl, pH 8,0, neutralisiert,  $\bar{u}$ N gegen 5 l H<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die IgGs wurden in 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2, in einer Konzentration von 10-50 mg/ml resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.5.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western Blot)**

Proteine, die auf Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran transferiert worden waren, wurden mittels Immunodekoration mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer 1 h in TBS (154 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Danach wurde die Blockierlösung entfernt und der Primärantikörper für 1-2 h bei RT oder  $\bar{u}$ N bei 4°C zugegeben. In Abhängigkeit vom Titer des Antikörpers wurde dieser 1:50-1:10000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS, 10 min in TBS/0,05% (v/v) Triton X-100 und erneut 10 min in TBS gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper aus der Ziege verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Diese sekundären Antikörper wurden 1:10000 in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membranen 1 h mit dieser Lösung inkubiert.

Zum Nachweis von Proteinen mit Histidin- bzw. Myc- Anhang wurden ein monoklonaler  $\alpha$ -His Antikörper (Amersham) bzw. ein monoklonaler  $\alpha$ -cMyc (9E10) (Santa Cruz) Antikörper verwendet. Diese wurden 1:1000 ( $\alpha$ -His) bzw. 1:200 ( $\alpha$ -cMyc) in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege anti-Maus Antikörper 1:10000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS eingesetzt.

Zur Detektion von Mim1 mit einem HA-Anhang wurden anti-HA Antikörper (Santa Cruz bzw. Roche) verwendet. Die unspezifischen Bindungsstellen der entsprechenden Membranen wurden mit der von Roche gelieferten Blockierlösung, die 1:10 in TBS verdünnt

wurde, 1 h bei RT gesättigt. Die anti-HA Antikörper wurden 1:200 in der 1:20 in TBS verdünnten Blockierlösung eingesetzt und als Sekundärantikörper wurde ein Ziege anti-Maus Antikörper 1:10000 in der 1:20 in TBS verdünnten Blockierlösung verwendet.

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

Lösung 1: 3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5, 300 µl Luminol (440 mg/10 ml DMSO), 133 µl p-Kumarinsäure (150 mg/10 ml DMSO), H<sub>2</sub>O ad 30 ml

Lösung 2: 3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5, 18 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), H<sub>2</sub>O ad 30 ml

Die Lösungen sind ungefähr für eine Woche bei 4°C in einem lichtgeschützten Gefäß stabil.

### 2.5.7. Koimmunfällung

Für die Immunfällung wurden zunächst Antikörper an Protein A-Sepharose CL-4B (PAS) gekoppelt. Dabei wurden 30 µl PAS zweimal mit TBS und dann mit dem gewünschten Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden 30 ml Antiserum mit der äquilibrierten PAS für mindestens 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert und dann die PAS dreimal mit dem gewünschten Lysepuffer gewaschen.

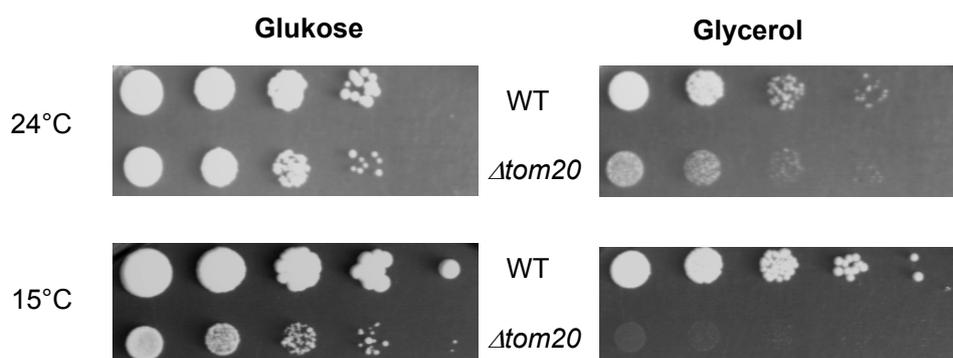
Mitochondrien mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurden in Lysepuffer B (siehe 2.3.12.) im Überkopfschüttler solubilisiert. Nach dem Abtrennen von unlöslichem Material (36700xg, 20 min, 2°C) wurde der Überstand zu den an die PAS gebundenen Antikörpern gegeben und mit diesen 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Protein A-Sepharose mit den gebundenen Immunkomplexen wurde anschließend viermal mit Lysepuffer B mit 0,05% (w/v) Digitonin gewaschen. Teilweise wurde die Solubilisierung und die folgenden Waschschrte auch in 20 mM Tris-HCl, 80 mM KCl, pH 7,4, durchgeführt. Im Anschluss an die Waschschrte wurden die Immunkomplexe in Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol und mit 0,05% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dissoziiert, für 5 min bei 56°C inkubiert und mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von Signal-Anker-Domänen mitochondrialer Außenmembranproteine

##### 3.1.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Signalsequenz von Tom20

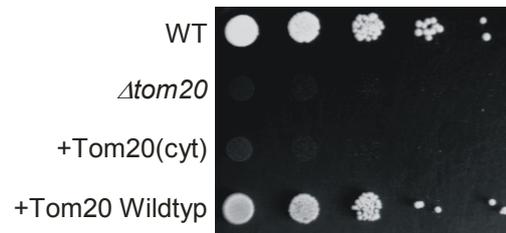
Eine Klasse mitochondrialer Außenmembranproteine sind die Signal-Anker-Proteine. Sie sind in der Außenmembran so orientiert, dass der Großteil des Proteins cytosolisch lokalisiert und das N-terminale Segment in der Membran verankert ist. Um die Signalsequenz und die Information, die für den Membraneinbau von Signal-Anker-Proteinen notwendig ist, zu charakterisieren, wurde ein *in vivo* Komplementationsansatz verwendet. Als Modellprotein wurde Tom20 gewählt. Die Deletion des Gens, welches für den Importrezeptor Tom20 kodiert, verhindert gemäß bereits veröffentlichter Daten das Wachstum von Hefezellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Iwahashi et al., 1997; Ramage et al., 1993). Der *tom20*-Null-Stamm zeigte allerdings bei Wachstum auf Glycerol selbst bei 24°C noch ein geringes Restwachstum, wohingegen bei 15°C kein Wachstum mehr beobachtet wurde (Abb. 4). Deshalb wurde die Fähigkeit verschiedener Tom20-Varianten, diesen Wachstumsphänotyp bei 15°C zu komplementieren, als Maßstab für korrekten Transport zum und für korrekte Funktion im TOM-Komplex verwendet.



**Abb. 4.** Der *tom20*-Null-Stamm wächst nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei 15°C. *Δtom20*-Zellen und ihr isogener Wildtyp wurden in 10-er Verdünnungsschritten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, bei den angegebenen Temperaturen auf YPD- bzw. YPG-Medium zu wachsen.

Durch Transformation des *tom20*-Null-Stammes mit einem Hefeexpressionsvektor, welcher das für Tom20 kodierende Gen enthält, konnte der *tom20*-Null Phänotyp gerettet werden (Abb. 5). Folglich ist bereits vorhandenes Tom 20 für den Import von neu synthetisierten Tom20-Vorstufenproteinen nicht zwingend erforderlich. In Übereinstimmung

mit diesem Ergebnis ist der *in vitro* Import von neu synthetisiertem Tom20 unabhängig von cytosolischen Domänen von Importrezeptoren (Schneider et al., 1991). Expression einer Tom20-Variante ohne Signal-Anker-Domäne (Aminosäurereste 1-36) konnte das Wachstum auf nicht-fermentierbarem Medium nicht wieder herstellen (Abb. 5, Tom20(cyt)). Demnach ist die Signal-Anker-Domäne von Tom20 essenziell für die Funktion des Proteins.



**Abb. 5. Tom20 ist für den Import von Tom20-Vorstufen nicht essenziell.**  $\Delta tom20$ -Zellen, Zellen des isogenen Wildtyps und  $\Delta tom20$ -Zellen, die mit einem für Tom20 oder für Tom20 ohne Signal-Anker-Domäne kodierenden Plasmid transformiert worden waren, wurden in 10-er Verdünnungsschritten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, bei 15°C auf YPG-Medium zu wachsen. Tom20(cyt), die cytosolische Domäne von Tom20.

### 3.1.2. Charakterisierung der Signalsequenz von Tom20

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob spezifische Aminosäurereste in der N-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne Teil der Signalsequenz sind und zur Verankerung in der mitochondrialen Außenmembran beitragen. In der die Transmembrandomäne von Tom20 N-terminal flankierenden Region sind zwei hydroxylierte Aminosäurereste, Ser-2 und Ser-4, vorhanden (Abb. 6).

**Tom20 (*S.c.*)** MSQSNPILR GLAITTAIAALSATGYAIYF **DYQRRNS**.....

**Abb. 6. Die Signal-Anker-Domäne von *S. cerevisiae* Tom20.** Die vorhergesagte Transmembrandomäne ist unterstrichen dargestellt, saure Aminosäurereste sind grün und basische rot eingezeichnet.

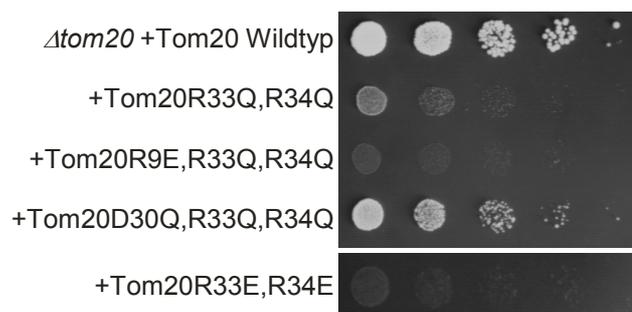
Hydroxylierte Reste werden auch in den N-terminal flankierenden Regionen anderer Signal-Anker-Proteine wie OM45 und Tom70 gefunden (siehe Abb. 3). Um die Bedeutung dieser Aminosäurereste näher zu untersuchen wurde ein Protein ohne die ersten sechs Aminosäuren (Tom20( $\Delta$ 1-6)) konstruiert. Da diese Variante auf Glycerol wuchs (Abb. 7) sind die Aminosäurereste 1-6 für den Transport zu und die Funktion in den Mitochondrien nicht essenziell. Die Bedeutung der positiven Ladung des Arg-9 wurde untersucht, indem ein negativer Glutaminsäure- bzw. Asparaginsäure-Rest an dieser Stelle eingeführt wurde und damit die Nettoladung in der N-terminal flankierenden Region von +1 zu -1 verändert wurde. Diese Mutation hatte keinen negativen Einfluss auf die Signalsequenz und die Funktion von

Tom20 sowohl im nativen Protein (Tom20-R9E) als auch in der Variante ohne die ersten sechs Aminosäuren (Tom20( $\Delta$ 1-6), R9D) (Abb. 7). Folglich sind keine speziellen Reste in der N-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne für die korrekte Lokalisation und die Funktion des Proteins notwendig.



**Abb. 7. Positive Ladungen oder hydroxylierte Aminosäurereste in der N-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne sind nicht essenziell für die korrekte Lokalisation und Funktion von Tom20.**  $\Delta tom20$ -Zellen, Zellen des isogenen Wildtyps und  $\Delta tom20$ -Zellen, die mit einem für Tom20 oder eine entsprechende Variante kodierenden Plasmid transformiert worden waren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht.

Sind positive Aminosäurereste in der die Transmembrandomäne C-terminal flankierenden Region wichtig für die korrekte intrazelluläre Lokalisation und die Funktion des Proteins? Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die beiden Argininreste, Arg-33 und Arg-34, durch Glutaminreste ersetzt, wodurch sich die Nettoladung in dieser Region von +1 auf -1 ändert. Die resultierende Tom20-Variante (Tom20-R33Q/R34Q) wuchs auf Glycerol, allerdings viel schlechter als der korrespondierende Wildtyp (Abb. 8).

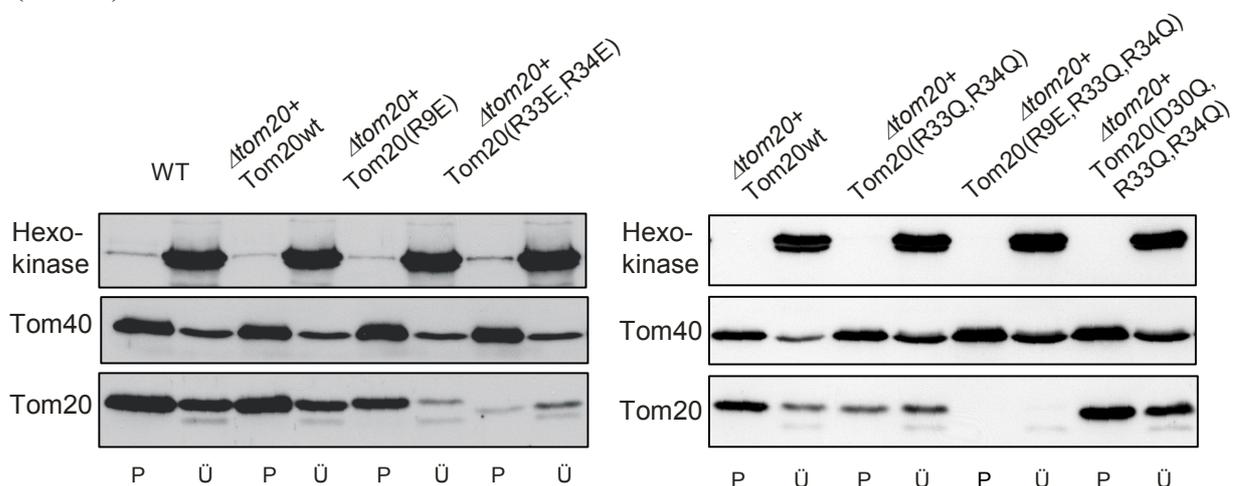


**Abb. 8. Positive Ladungen in der C-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne sind nicht essenziell für die Lokalisation und Funktion von Tom20.**  $\Delta tom20$ -Zellen, welche mit Plasmiden transformiert worden waren, die entweder für Tom20 oder die entsprechenden mutierten Proteine kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht.

Wurde jedoch zusätzlich zu Arg-33 und Arg-34 auch Asp-30 in einen Glutaminrest mutiert (Tom20-D30Q/R33Q/R34Q) und folglich die Nettoladung in der C-terminal flankierenden Region neutral, wuchs der Hefestamm wesentlich besser als wenn nur die beiden Argininreste neutralisiert wurden (Abb. 8). Im Gegensatz dazu wurde kein Wachstum beobachtet, wenn die Nettoladung in der C-terminal flankierenden Region auf -3 verändert

wurde, indem sowohl Arg-33 als auch Arg-34 in Glutaminsäurereste verändert wurden (Tom20-R33E/R34E) (Abb. 8). Ebensovienig konnte eine Tom20-Variante mit einer Nettoladung von -1 in beiden die Transmembrandomäne flankierenden Regionen (Tom20-R9E/R33Q/R34Q) den Wachstumsphänotyp des *tom20*-Null-Stammes komplementieren (Abb. 8).

Um zu überprüfen ob das Zellwachstum mit den Mengen der Tom20-Versionen in den Mitochondrien korreliert, wurden aus dem Wildtyp und den transformierten Zellen Mitochondrien mittels differenzieller Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Mengen von Tom20 durch Immunodekoration bestimmt (Abb. 9). Tom20-R9E, welches das Wachstum unterstützt, war in Wildtyp-Mengen in den isolierten Mitochondrien vorhanden (Abb. 9). Im Gegensatz dazu konnte nahezu kein Tom20-R33E/R34E in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Der Großteil des Proteins war im Überstand zu finden, wobei jedoch die Gesamtmenge an Tom20-R33E/R34E sehr niedrig war. Auch für die anderen Stämme konnte eine klare Korrelation zwischen dem Wachstumsphänotyp und der Menge an Tom20 in den Mitochondrien gezeigt werden. Die Tom20-Variante Tom20-R9E/R33Q/R34Q, die kein Wachstum zeigte, war überhaupt nicht in den Mitochondrien nachzuweisen. Andererseits wuchs z. B. die Variante Tom20-D30Q/R33Q/R34Q wesentlich besser als Tom20-R33Q/R34Q und das Protein war auch in größeren Mengen in den Mitochondrien vorhanden (Abb. 9).



**Abb. 9. Das Wachstum der verschiedenen Stämme auf Glycerol korreliert mit der Menge der entsprechenden Tom20-Versionen in den Mitochondrien.** Zellen wurden in Gegenwart von Glaskügelchen durch Vortexen aufgebrochen. „Rohmitochondrien“ wurden durch differenzielle Zentrifugation pelletiert (P) und parallel mit den Überstandfraktionen (Ü) mittels SDS-PAGE analysiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die cytosolische Domäne von Tom20, ein Kontrollmarkerprotein für das Cytosol (Hexokinase) und das mitochondriale Außenmembranprotein Tom40 immunodekoriert.

Aufgrund dieser Korrelation ist die mangelnde Aktivität verschiedener Tom20-Versionen höchstwahrscheinlich auf eine falsche intrazelluläre Lokalisation und nicht auf eine beeinträchtigte Funktion des Proteins selbst zurückzuführen.

Die Wachstumsphänotypen des *tom20*-Null-Stammes mit den verschiedenen Tom20-Varianten (einschließlich weiterer Varianten mit geänderter Nettoladung) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tab. 4. Tom20-Varianten und ihr Wachstum auf YPG**

Plasmid, welches in den $\Delta tom20$ Stamm transformiert wurde	Ladungen in der N- und C-terminal flankierenden Region <sup>a</sup>	Nettoladung der flankierenden Regionen zusammen	Wachstum auf YPG bei 15°C
kein Plasmid	NR <sup>b</sup>	NR	-
Tom20(cyt) <sup>c</sup>	NR	NR	-
Tom20 wt	+ <b>—</b> - ++	+2	+++
Tom20( $\Delta$ 1-6)	+ <b>—</b> - ++	+2	+++
Tom20(D30Q,R33Q,R34Q)	+ <b>—</b> 0 0 0	+1	++
Tom20(R9E)	- <b>—</b> - ++	0	+++
Tom20( $\Delta$ 1-6)R9D	- <b>—</b> - ++	0	+++
Tom20(R33E)	+ <b>—</b> - - +	0	+ / +++
Tom20(R33Q,R34Q)	+ <b>—</b> - 0 0	0	+
Tom20(R9Q,D30Q,R33Q,R34Q)	0 <b>—</b> 0 0 0	0	++
Tom20(R9E,D30Q,R33Q,R34Q)	- <b>—</b> 0 0 0	-1	- / +
Tom20(R9E,R33E)	- <b>—</b> - - +	-2	-
Tom20(R33E,R34E)	+ <b>—</b> - - -	-2	-
Tom20(R9E,R33Q,R34Q)	- <b>—</b> - 0 0	-2	-
Tom20(R9E,R33E,R34E)	- <b>—</b> - - -	-4	-

<sup>a</sup> Neun Aminosäurereste wurden in der N- und C-terminal flankierenden Region jeweils berücksichtigt. Der Strich repräsentiert die Transmembrandomäne.

<sup>b</sup> NR, nicht relevant.

<sup>c</sup> Tom20(cyt), die cytosolische Domäne von Tom20.

Eine positive Nettoladung in der N-terminal oder in der C-terminal flankierenden Region ist keine unabdingbare Voraussetzung für korrekte intrazelluläre Lokalisation und richtigen Membraneinbau, wie an den Mutanten zu erkennen ist. Bemerkenswerterweise führte eine Tom20-Variante ohne positiv geladenen Aminosäurerest in beiden flankierenden Regionen zu effizientem Wachstum der Hefezellen (Tom20-R9Q/D30Q/R33Q/R34Q, Tabelle 4). Ein Großteil der Tom20-Varianten mit einer neutralen oder sogar negativen Nettoladung in einer der flankierenden Regionen wurde in die Mitochondrien importiert, so lange die

andere flankierende Region positiv geladen war. Keine der Varianten mit einer negativen Nettoladung beider flankierender Regionen führte zu beträchtlichem Wachstum.

### 3.1.3. Moderate Hydrophobizität ist entscheidend für die Funktion der Signal-Anker-Domäne von Tom20

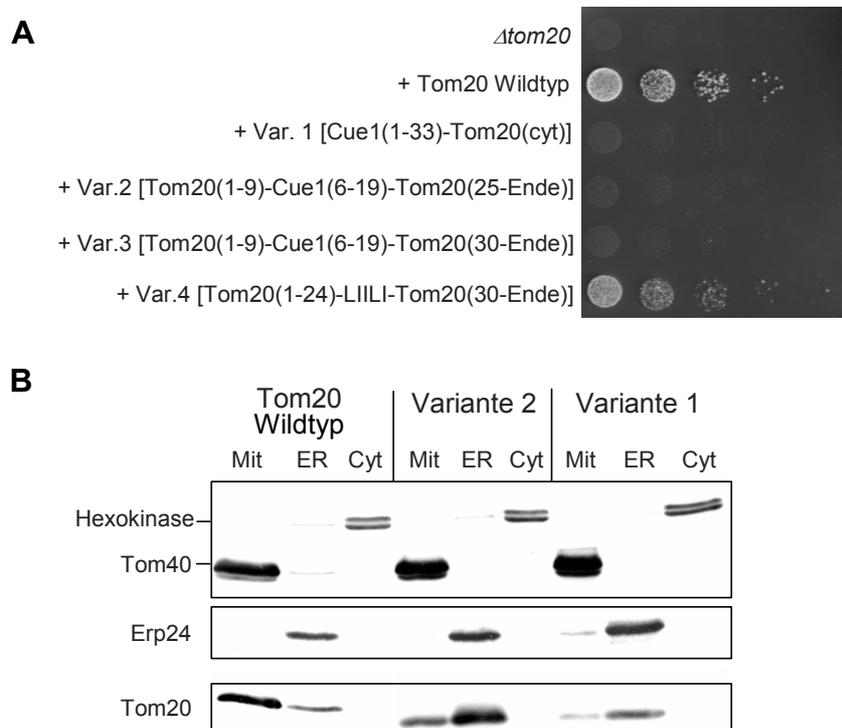
Andere strukturelle Charakteristika als Ladungen in den flankierenden Regionen der Transmembrandomäne scheinen entscheidende Elemente in mitochondrialen Signal-Anker-Domänen zu sein. Die Hydrophobizität und/oder die Länge des Transmembransegments könnten von großer Bedeutung sein. Um diese Möglichkeiten zu testen wurden Fusionsproteine aus verschiedenen Teilen der Signal-Anker-Domänen von Cue1 und Tom20 hergestellt. Cue1 ist ein Signal-Anker-Protein im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Biederer et al., 1997). Seine einzige Transmembrandomäne ist kürzer und hydrophober als diejenige von Tom20 (Abb. 10).

		Hydrophobizität
<b>Tom20</b>	MSQSNPILR <b>GLAITTAIAALSATGYAIYF</b> DYQRRNS	1.4
<b>Cue1</b>	MEDSR <b>LLITLILVFGVIFL</b> <b>KKFFQSNQHPSAQR...</b>	3.2
<b>Var.1</b>	MEDSR <b>LLITLILVFGVIFL</b> <b>KKFFQSNQHPSAQR</b> -Tom20(cyt)	3.2
<b>Var.2</b>	MSQSNPILR <b>LLITLILVFGVIFL</b> <b>YAIYF</b> DYQRRNS-Tom20(cyt)	2.7
<b>Var.3</b>	MSQSNPILR <b>LLITLILVFGVIFL</b> DYQRRNS-Tom20(cyt)	3.2
<b>Var.4</b>	MSQSNPILR <b>GLAITTAIAALSATGLIILI</b> DYQRRNS-Tom20(cyt)	2.1

**Abb. 10. Aminosäuresequenzen der Signal-Anker-Domänen von Tom20, Cue1 und von Fusionsproteinen, sowie berechnete Hydrophobizität der jeweiligen Transmembrandomäne.**

Wenn die gesamte Signal-Anker-Domäne von Cue1 (Aminosäuren 1-33) vor die cytosolische Domäne von Tom20 fusioniert wurde, war kein Wachstum zu beobachten (Abb. 11A, Variante 1). Gleichermäßen führte die Transformation des *tom20*-Null-Stammes mit einem Konstrukt, in welchem nur die Transmembrandomänen der beiden Proteine vertauscht waren und die flankierenden Regionen von Tom20 unverändert blieben, zu keinem Wachstum (Abb. 11A, Variante 3). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass dies auf die kürzere Transmembrandomäne von Cue1 zurückzuführen ist, wurden die ersten 15 Aminosäurereste des Transmembransegments von Tom20 durch diese ersetzt (Abb. 10 und Abb. 11A, Variante 2). Obwohl die resultierende Transmembrandomäne eine ähnliche Länge wie das authentische Tom20 Segment besitzt, führte das Konstrukt nach Transformation in den *tom20*-Null-Stamm zu keinem Wachstum. Folglich scheint eher eine moderate Hydrophobizität als die Länge

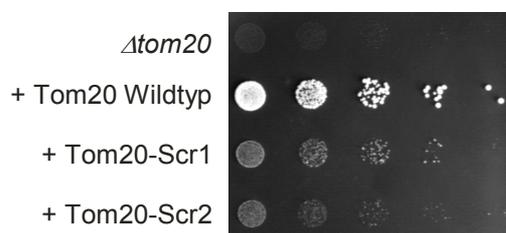
entscheidend für den korrekten Transport zu Mitochondrien zu sein. Diese Annahme wird weiter durch die Tatsache unterstützt, dass der Austausch von vier Aminosäureresten in der Transmembrandomäne von Tom20 gegen die hydrophoben Reste Ile oder Leu zu leicht verlangsamtem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp führte (Abb. 11A, Variante 4). Zusätzlich wurde die Lokalisation der verschiedenen Tom20-Versionen durch subzelluläre Fraktionierung bestimmt. Der überwiegende Teil an Wildtyp-Tom20 war in der Mitochondrienfraktion zu finden (Abb. 11B). Im Gegensatz dazu waren diejenigen Versionen, welche die Transmembrandomäne von Cue1 enthielten, überwiegend im ER lokalisiert (Abb. 11B). Obwohl man ein bisher nicht charakterisiertes spezifisches und dominantes ER Lokalisationssignal in der Transmembrandomäne von Cue1 nicht ausschließen kann, führt höchstwahrscheinlich die erhöhte Hydrophobizität des Transmembransegments des Proteins zu dessen Lokalisation im ER.



**Abb. 11. Die Hydrophobizität der Transmembrandomäne verschiedener Tom20-Versionen spielt eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Lokalisation.** **A.** *Δtom20*-Zellen und *Δtom20*-Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, welche entweder für Tom20 oder die angegebenen Tom20-Versionen kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht. **B.** Tom20-Versionen mit höherer Hydrophobizität der Transmembrandomäne sind im ER lokalisiert. Subzelluläre Fraktionierungen von *Δtom20*-Zellen, welche mit Plasmiden transformiert worden waren, die entweder für Tom20-Wildtyp oder die bezeichneten Tom20-Versionen kodieren, wurden wie in „Material und Methoden“ (siehe 2.4.4.) beschrieben durchgeführt. Die mitochondrialen (Mit), ER- und cytosolischen (Cyt) Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die cytosolische Domäne von Tom20, ein Kontrollmarkerprotein für das Cytosol (Hexokinase), ein Markerprotein für das ER (Erp24) und das mitochondriale Außenmembranprotein Tom40 immunodekoriert.

Zur Klärung ob nur die Hydrophobizität der Transmembrandomäne wichtig ist oder ob eine spezifische Aminosäuresequenz notwendig ist, wurden zwei Versionen von Tom20 kloniert, bei denen die Reihenfolge der Aminosäuren der Transmembrandomäne beliebig vertauscht wurde. Obwohl die Hydrophobizität des Transmembransegments in diesen Varianten nicht verändert wurde, konnten sie das Wachstum des *tom20*-Null-Stammes auf YPG bei 15°C nur teilweise wieder herstellen (Abb. 12). Folglich ist die spezifische Sequenz des Bereichs ebenfalls von Bedeutung. Da aber die Signal-Anker-Domänen anderer Außenmembranproteine diejenige von Tom20 funktionell ersetzen konnten (siehe Abb. 15), scheint die Reihenfolge der Aminosäuren für sequenzspezifische Interaktionen mit anderen Proteinen nicht wichtig zu sein. Vermutlich wurde eher die spezifische Sequenz während der Evolution für die Ausbildung einer helikalen Sekundärstruktur optimiert, welche für korrekten intrazellulären Transport und anschließenden Membraneinbau notwendig ist. Die veränderten Sequenzen bilden vermutlich diese Sekundärstruktur nicht mit einer zum Wildtyp vergleichbaren Effizienz aus.

<b>Tom20</b>	<i>MSQSNPILR</i> <u>GLAITTAIAALSATGYAIYE</u> <i>DYQRRNS..</i>
<b>Tom20-Scr1</b>	<i>MSQSNPILR</i> <u>YFGTASILAITATAYAGLIA</u> <i>DYQRRNS..</i>
<b>Tom20-Scr2</b>	<i>MSQSNPILR</i> <u>FTYALGYALGAAISTIIAAT</u> <i>DYQRRNS..</i>

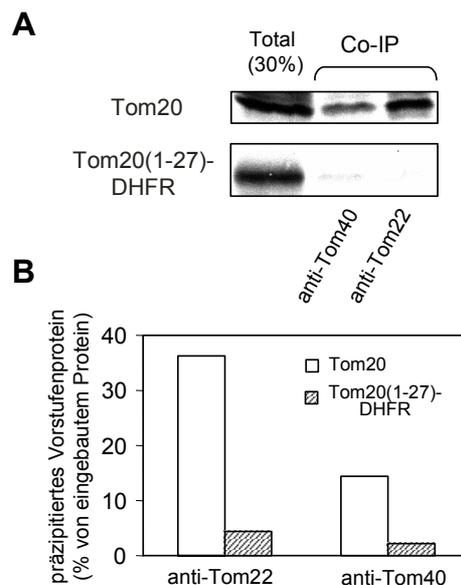


**Abb. 12. Tom20-Versionen mit veränderter Aminosäurereihenfolge der Transmembrandomäne können die Funktion von Tom20 nur teilweise übernehmen.** *Δtom20*-Zellen und *Δtom20*-Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, welche entweder für Tom20 oder die angegebenen Tom20-Versionen kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht. Die Sequenzen der nativen und der veränderten Transmembrandomänen sind als *unterstrichener Text* dargestellt.

### 3.1.4. Die Signal-Anker-Domäne von Tom20 ist nicht ausreichend für die Assemblierung in den TOM-Komplex

Bei der Charakterisierung der Signal-Anker-Domäne von Tom20 stellte sich außerdem die Frage, ob diese nur als Signalsequenz und Membrananker fungiert oder auch die Assemblierung in den TOM-Komplex vermittelt. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der Signal-Anker-Domäne von Tom20 und dem Protein Dihydrofolat-Reduktase, konstruiert und untersucht, ob dieses in den TOM-Komplex assemblieren kann. Das radioaktiv markierte Hybridprotein assoziierte mit den Mitochondrien während der *in vitro* Inkubation (Abb. 13). Allerdings wurden nur vernachlässigbare Mengen

des Proteins mit Antikörpern gegen Tom40 und Tom22 gefällt, wohingegen importiertes Tom20 effizient mit dem TOM-Komplex immungefällt wurde (Abb. 13). Deshalb spielt die Signal-Anker-Domäne von Tom20 keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Assemblierung des Proteins in den TOM-Komplex. Folglich scheint die cytosolische Domäne des Proteins entscheidend an diesem Prozess beteiligt zu sein. Diese Sichtweise wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 über das TPR-Motiv in der cytosolischen Domäne von Tom20 miteinander interagieren (Haucke et al., 1996).



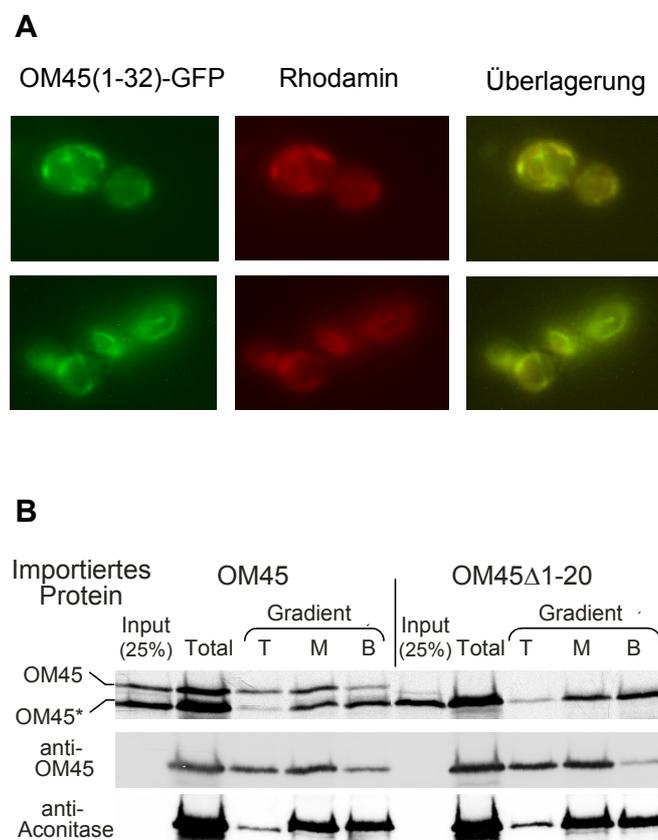
**Abb. 13. Die Signal-Anker-Domäne von Tom20 ist nicht ausreichend für die Assemblierung in den TOM-Komplex.** **A.** Radioaktiv markiertes *Neurospora crassa* Tom20 und Tom20(1-27)-DHFR wurden 20 min bei 25°C mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und die Immunfällung wurde mit Antikörpern gegen Tom22 oder Tom40 durchgeführt. Um den Membraneinbau zu überprüfen wurde ein Aliquot vor der Koimmunfällung abgenommen und einer Carbonatextraktion unterzogen. Das Pellet, welches die Membranen enthält, wurde in Laemmli-Puffer solubilisiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (*Total*). **B.** Die Banden der immungefällten Proteine von drei Experimenten wurden quantifiziert. Die Mittelwerte sind in Prozent des in die Membran eingebauten Proteins angegeben.

### 3.1.5. OM45 ist ein Signal-Anker-Protein

Tom20 und Tom70 könnten als Komponenten des TOM-Komplexes einem speziellen Importweg folgen. Deshalb sollte die Studie auf ein Außenmembranprotein, welches nicht Teil des TOM-Komplexes ist, ausgeweitet werden. OM45 wurde als Signal-Anker-Protein vorgeschlagen, aber experimentelle Beweise für diese Annahme fehlten bisher (Yaffe et al., 1989). Deshalb wurde untersucht ob die Transmembrandomäne von OM45 mit ihren flankierenden Regionen als mitochondriale Signalsequenz fungieren kann. Dazu wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus den ersten 32 Aminosäureresten von OM45 vor GFP, in Hefezellen transformiert. Das OM45(1-32)-GFP Fusionsprotein kolokalisierte mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff (Abb. 14A). Zellen, welche mit einem Fusionsprotein

bestehend aus der gesamten OM45-Sequenz vor GFP transformiert worden waren, zeigten ein ähnliches Fluoreszenzmuster (Cerveny et al., 2001). Folglich reichen die Aminosäurereste 1-32 von OM45 aus, um ein lösliches Protein zur mitochondrialen Außenmembran zu dirigieren.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Signal-Anker-Domäne wirklich für den Import in Mitochondrien notwendig ist. Dazu wurde radioaktiv markiertes OM45 *in vitro* in Mitochondrien importiert und seine Insertion in die mitochondriale Außenmembran wurde mittels Carbonatextraktion mit anschließender Analyse der Extraktionsprodukte auf Saccharosegradienten untersucht (Abb. 14B).

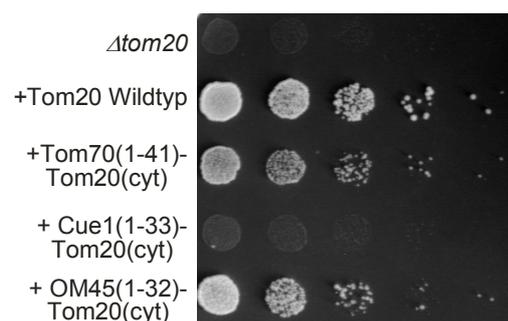


**Abb. 14. Die Aminosäurereste 1-32 von OM45 bilden die Signal-Anker-Domäne des Proteins.**  
**A.** Mitochondriale Lokalisation von OM45(1-32)-GFP. Wildtyp-Hefezellen, welche das Fusionsprotein OM45(1-32)-GFP exprimieren, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Zellen wurden vor der Untersuchung mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff Rhodamin B-Hexylester angefärbt. **B.** *In vitro* Import von OM45. Radioaktiv markiertes OM45 und OM45Δ1-20 wurden in isolierte Mitochondrien importiert. Eine Spur mit 25% (v/v) des zugegebenen radioaktiv markierten Vorstufenproteins ist für jedes Konstrukt gezeigt. Nach dem Import wurden die Proben halbiert und die Mitochondrien pelletiert. Ein Aliquot wurde direkt in Laemmli-Puffer solubilisiert (Total), wohingegen das andere in 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> resuspendiert wurde. Nach 30 min auf Eis wurden diese Proben mittels Flotations-Gradientenzentrifugation analysiert. Eine kürzere Form von OM45 (OM45\*), die sich genau wie OM45Δ1-20 verhält und deshalb vermutlich auf einen Translationsstart an Met-21 zurückzuführen ist, ist angezeigt. Die beiden unteren Boxen zeigen Immunodekorationen des endogenen OM45 und des löslichen Proteins Aconitase. T, obere Fraktion; M, mittlere Fraktion; B, untere Fraktion des Gradienten.

Radioaktiv markiertes und endogenes OM45 wurden im oberen Bereich des Gradienten gefunden, wohingegen lösliche Proteine wie Aconitase im unteren Teil anzutreffen waren. Ein Vorstufenprotein, dem der Großteil der Transmembrandomäne fehlt, da die Translation an Met-21 beginnt, war am Boden des Gradienten zu finden (Abb. 14B). Folglich kann OM45 in einem zellfreien Importsystem in einem von seiner Transmembrandomäne abhängigen Prozess zur mitochondrialen Außenmembran dirigiert und in diese eingebaut werden.

### 3.1.6. Die Signal-Anker-Domänen von OM45 und Tom70 können diejenige von Tom20 funktionell ersetzen

Spielt die Signal-Anker-Domäne von Tom20 eine spezifische Rolle für die Funktion des Proteins? Um diese Frage zu beantworten wurde untersucht, ob die Signal-Anker-Domänen anderer mitochondrialer Außenmembranproteine, wie Tom70 oder OM45, diejenige von Tom20 funktionell ersetzen können. Dafür wurden Fusionsproteine aus der Signal-Anker-Domäne von OM45 (Aminosäurereste 1-32) oder Tom70 (Aminosäurereste 1-41) und der cytosolischen Domäne von Tom20 hergestellt. Beide Proteine, OM45(1-32)-Tom20(cyt) und Tom70(1-41)-Tom20(cyt), konnten, im Gegensatz zu Cue1(1-33)-Tom20(cyt), den Wachstumsphänotyp des *tom20*-Null-Stammes komplementieren (Abb. 15). Folglich können Signal-Anker-Domänen anderer mitochondrialer Außenmembranproteine, aber nicht diejenige eines ER-Proteins, die cytosolische Domäne von Tom20 zur mitochondrialen Außenmembran dirigieren und sie in dieser verankern.



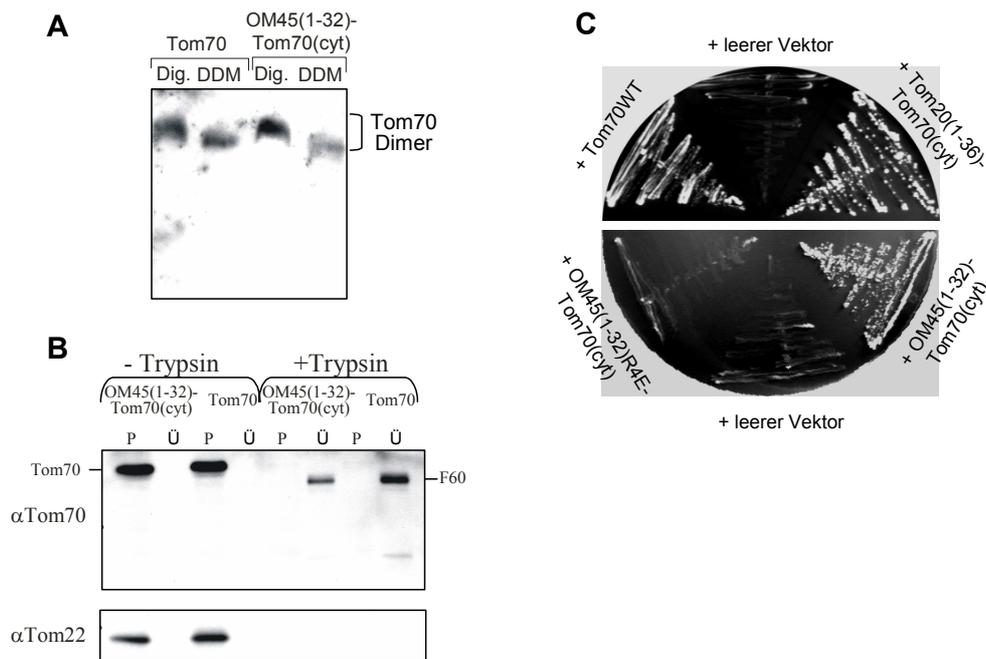
**Abb. 15. Signal-Anker-Domänen verschiedener mitochondrialer Proteine sind funktionell austauschbar.** *Δtom20*-Zellen und *Δtom20*-Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, welche entweder für Tom20 oder die angegebenen Fusionsproteine kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht.

### 3.1.7. Die Signal-Anker-Domäne von Tom70

Im Falle von Tom20 scheint die Signal-Anker-Domäne keine spezifischen Informationen für die Funktion des Proteins zu enthalten. Zur Klärung der Fragestellung, ob dies auch für die Signal-Anker-Domäne des Importrezeptors Tom70 zutrifft wurde ein *tom70*-Null-Stamm mit einem Plasmid transformiert, welches für ein Fusionsprotein, bestehend aus der Signal-Anker-Domäne von OM45 vor der cytosolischen Domäne von Tom70 (OM45 (1-32)-Tom70( $\Delta$ 1-35)), kodiert. Aus diesem und dem korrespondierenden Wildtypstamm wurden Mitochondrien isoliert und die oligomere Struktur und die Faltung von Tom70 und seiner Variante analysiert. Beide Proteine wanderten als Dimere im blauen Nativgel (Abb. 16A). Die gereinigte cytosolische Domäne von Tom70 wanderte unter diesen Bedingungen oder bei Analyse mittels Gelfiltration auch als Dimer (Young et al., 2003 und nicht gezeigt). Laut einer vorangegangenen Studie sind für die Dimerisierung von Tom70 spezifische Alaninreste in dessen Transmembrandomäne notwendig (Millar und Shore, 1994). Die beschriebenen Ergebnisse zeigen allerdings, dass für die Dimerisierung von Tom70 die cytosolische Domäne ausreichend ist.

Um zu untersuchen ob das Fusionsprotein richtig gefaltet ist wurden Mitochondrien mit geringen Konzentrationen an Trypsin behandelt, um die charakteristische 60 kDa große cytosolische Domäne von Tom70 abzuspalten (Schlossmann et al., 1994). Das 60 kDa Fragment wurde sowohl bei Proteasebehandlung von Wildtyp-Mitochondrien als auch von Mitochondrien mit dem Fusionsprotein gebildet, in letzterem Fall allerdings in etwas geringerem Ausmaß (Abb. 16B). Folglich kann die Signal-Anker-Domäne von OM45 die cytosolische Domäne von Tom70 zur mitochondrialen Außenmembran dirigieren, wo die Homodimerisierung stattfindet und das Protein in seine native Konformation faltet.

Ist das Fusionsprotein *in vivo* funktionell? Während die Deletion von Tom70 alleine keinen signifikanten Wachstumsphänotyp zeigt, ist die Deletion beider Importrezeptoren, Tom20 und Tom70, letal (Ramage et al., 1993). Diese Doppeldeletion konnte durch Expression von funktionellem Tom70 gerettet werden (Abb. 16C) (Young et al., 2003). Die Expression von OM45(1-32)-Tom70( $\Delta$ 1-35) und von Tom20(1-36)-Tom70( $\Delta$ 1-35) an Stelle von Wildtyp Tom70 stellte das Wachstum ebenfalls wieder her (Abb. 16C). Bei Fusion einer nicht funktionellen Signal-Anker-Domäne (OM45(1-32)R4E oder Tom20(1-36)R9E/R33E/R34E) vor die cytosolische Domäne von Tom70 war kein Wachstum zu beobachten (Abb. 16C und nicht dargestellt). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse die funktionelle Austauschbarkeit der Signal-Anker-Domänen von allen drei untersuchten Außenmembranproteinen (Tom20, Tom70 und OM45).

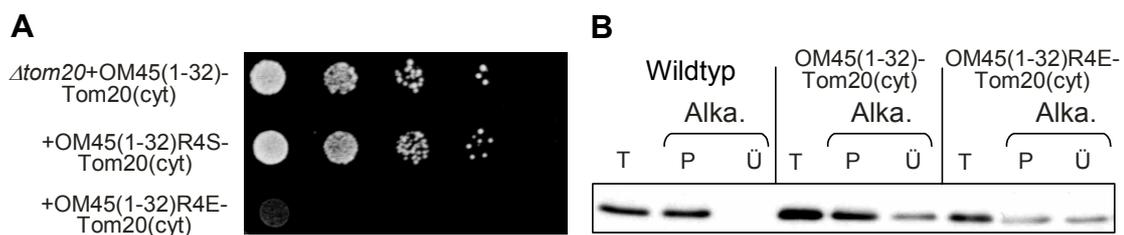


**Abb. 16. Die Signal-Anker-Domäne von Tom70 kann durch die Signal-Anker-Domänen anderer Außenmembranproteine funktionell ersetzt werden.** **A.** Ein Fusionsprotein bestehend aus der Signal-Anker-Domäne von OM45 und der cytosolischen Domäne von Tom70 bildet Dimere. Mitochondrien wurden entweder aus dem Wildtyp oder aus dem *Atom70*-Stamm, welcher mit einem für OM45(1-32)-Tom70(cyt) kodierenden Plasmid transformiert worden war, isoliert und mit dem angegebenen Detergenz solubilisiert. Proteine wurden mittels BNGE analysiert und mit Antikörpern gegen Tom70 immunodekoriert. **B.** OM45(1-32)-Tom70(cyt) ist in der Außenmembran korrekt gefaltet. Mitochondrien wurden entweder aus dem Wildtyp- oder aus dem *Atom70*-Stamm, welcher mit einem für OM45(1-32)-Tom70(cyt) kodierenden Plasmid transformiert worden war, isoliert und mit Trypsin (1  $\mu$ g/ml) behandelt oder unbehandelt gelassen. Die Mitochondrien wurden anschließend pelletiert (P) und die Proteine im Überstand mit TCA gefällt (Ü). Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen Tom70 (*oberer Teil*) oder die cytosolische Domäne von Tom22 (*unterer Teil*) immunodekoriert. Das charakteristische tryptische 60 kDa Fragment, welches die cytosolische Domäne von Tom70 repräsentiert, ist markiert (F60). **C.** Fusionsproteine mit der Signal-Anker-Domäne von Tom20 oder OM45 vor der cytosolischen Domäne von Tom70 können Tom70 funktionell ersetzen. Zellen eines Doppeldeletionsstammes *Atom20 Atom70*, welche das für Tom20 kodierende Gen auf einem Plasmid mit einem URA3-Marker enthalten, wurden benutzt. Diese Zellen wurden entweder mit einem leeren Vektor oder mit einem für Tom70 oder die angegebenen Fusionsproteine kodierenden Plasmid transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf ihr Wachstum bei 30°C auf SD-Medium mit 0,1% (w/v) 5-FOA untersucht. 5-FOA zwingt die Zellen, das für Tom20 kodierende Plasmid mit dem URA3-Marker zu verlieren.

### 3.1.8. Die mitochondriale Signalsequenz von OM45

Der OM45-Deletionsstamm zeigte unter allen getesteten Bedingungen keinen Wachstumsphänotyp (Yaffe et al., 1989 und nicht gezeigt). Jedoch machte es die Fähigkeit der Signal-Anker-Domäne von OM45, die cytosolische Domäne von Tom20 zur Außenmembran zu dirigieren möglich, die oben beschriebene Komplementationsuntersuchung zur Charakterisierung der Signal-Anker-Domäne von OM45 zu benutzen. Ladungen in der Signalsequenz von OM45 wurden mutiert und diese Varianten vor die cytosolische Domäne von Tom20 fusioniert. Wenn Arg-4 durch einen Serinrest ersetzt

wurde, hatte dies keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation und die Funktion des Proteins (Abb. 17A). Im Gegensatz dazu war beinahe kein Wachstum zu beobachten, wenn an dieser Stelle ein Glutaminsäurerest eingeführt wurde (Abb. 17A). Die Wachstumsphänotypen korrelierten mit der Menge des korrekt in die Außenmembran eingebauten Proteins (Abb. 17B). Die Variante OM45(1-32)R4E-Tom20(cyt) assoziierte mit den Mitochondrien annähernd so effizient wie das native Protein. Allerdings war nur ein kleiner Anteil von OM45(1-32)R4E-Tom20(cyt) richtig in die Außenmembran eingebaut (Abb. 17B). Dies erklärt das schlechte Wachstum des entsprechenden Hefestammes.



**Abb. 17. Eine negative Nettoladung der N-terminal flankierenden Region der Transmembrandomäne von OM45 stört den Transport zur und den Einbau in die mitochondriale Außenmembran.** **A.** *Atom20*-Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, welche für die angegebenen Fusionsproteine kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht. **B.** Membraneinbau von Fusionsproteinen. Mitochondrien (50  $\mu$ g Protein) aus dem Wildtyp oder aus Hefestämmen mit den angegebenen Fusionsproteinen wurden entweder direkt auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen (T) oder zunächst einer alkalischen Extraktion (Alka.) unterzogen und dann zentrifugiert, um zwischen Membranproteinen im Pellet (P) und löslichen Proteinen im Überstand (Ü) zu unterscheiden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen Tom20 immunodekoriert.

Die Aminosäuren 1-26 von OM45 waren ebenfalls ausreichend, um die cytosolische Domäne von Tom20 zur Außenmembran zu dirigieren (Tabelle 5). Sogar wenn das positiv geladene Lys-26 entweder durch einen Glutamin- oder Glutaminsäurerest (OM45(1-26)K26Q-Tom20(cyt) und OM45(1-26)K26E-Tom20(cyt)) ersetzt wurde, wuchs der entsprechende Hefestamm auf YPG (Tabelle 5). Ein Konstrukt, welches eine neutrale Nettoladung in beiden flankierenden Regionen (OM45(1-26)R4S/K26E-Tom20(cyt)) trug, komplementierte den *tom20*-Null-Wachstumsphänotyp, wohingegen der Austausch von Arg-4 und Lys-26 gegen einen Glutaminsäurerest das Wachstum beinahe vollständig verhinderte (Tabelle 5). Zusammenfassend ist also weder im Falle von Tom20 noch von OM45 eine positive Nettoladung in der die Transmembrandomäne N- oder C-terminal flankierenden Regionen für korrekten Transport zur und Einbau in die mitochondriale Außenmembran notwendig.

Tab. 5. OM45-Varianten und ihr Wachstum auf YPG

Plasmid, welches in den <i>Δtom20</i> Stamm transformiert wurde	Ladungen in der N- und C-terminal flankierenden Region <sup>a</sup>	Nettoladung der flankierenden Regionen zusammen	Wachstum auf YPG bei 15°C <sup>b</sup>
OM45(1-32)-Tom20(cyt) <sup>c</sup>	+ — + - + + + +	+5	++/+++
OM45(1-32)R4S-Tom20(cyt)	0 — + - + + + +	+4	++/+++
OM45(1-32)R4E-Tom20(cyt)	- — + - + + + +	+3	+
OM45(1-26)-Tom20(cyt)	+ — + - + +	+3	++/+++
OM45(1-26)K26Q-Tom20(cyt)	+ — + - 0 +	+2	++/+++
OM45(1-26)K26E-Tom20(cyt)	+ — + - - +	+1	++/+++
OM45(1-26)R4S,K26E-Tom20(cyt)	0 — + - - +	0	++
OM45(1-26)R4E, K26E-Tom20(cyt)	- — + - - +	-1	-/+

<sup>a</sup> Vier Aminosäuren wurden in der N- und zehn Aminosäuren in der C-terminal flankierenden Region berücksichtigt. Der Strich stellt die Transmembrandomäne dar.

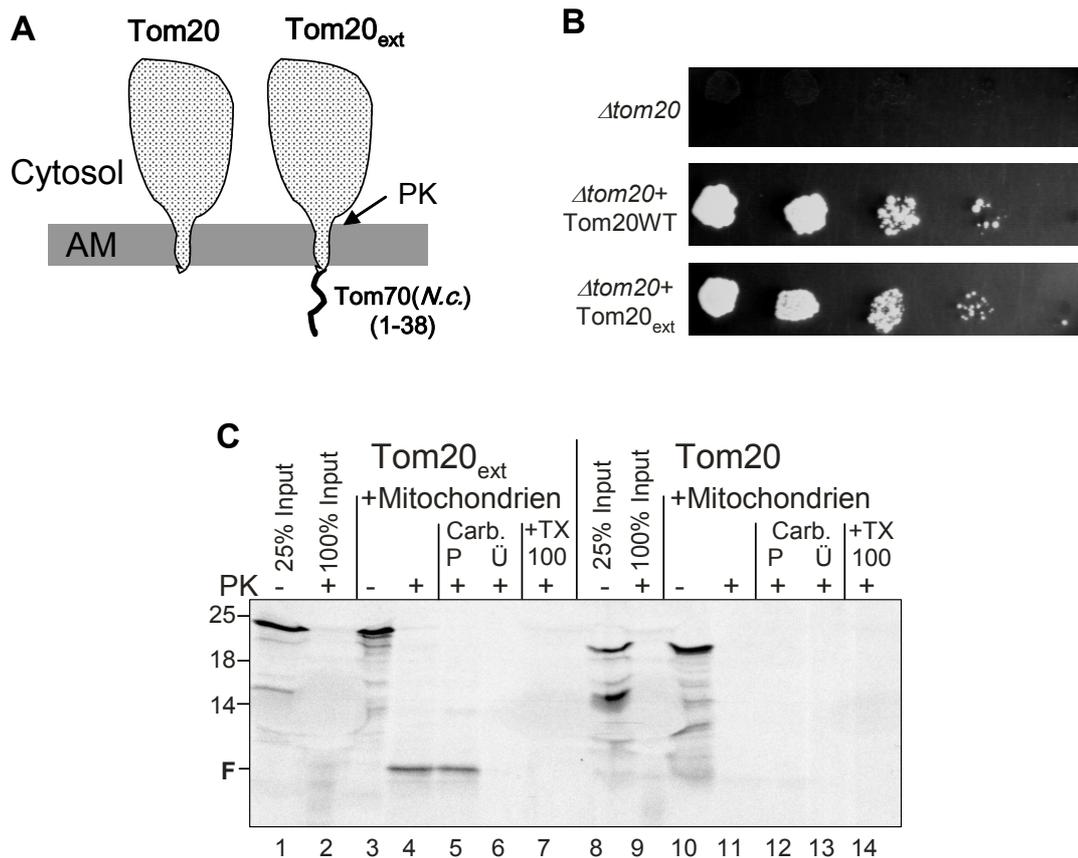
<sup>b</sup> +++ entspricht dem Wachstum von Tom20WT.

<sup>c</sup> Tom20(cyt), die cytosolische Domäne von Tom20.

## 3.2. Importmechanismus von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne

### 3.2.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung des *in vitro* Imports von Tom20

Nach Charakterisierung der Signalsequenz von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne stellte sich die Frage nach deren Importmechanismus. Ein großes Problem dabei war bisher das Fehlen einer zuverlässigen Methode, mit welcher der korrekte Einbau dieser Proteine in die Membran kontrolliert werden kann. Die bekannten N-terminal verankerten Proteine in Hefemitochondrien besitzen nur ein paar Aminosäurereste im Intermembranraum. Deshalb führt der proteolytische Verdau von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne in intakten Mitochondrien zur Bildung von Fragmenten in der Größenordnung von 2-3 kDa, die für die Detektion mittels SDS-PAGE zu klein sind. Um dieses Problem zu umgehen wurde ein Fusionsprotein konstruiert, bei dem die ersten 38 Aminosäurereste von *N. crassa* Tom70 vor *S. cerevisiae* Tom20 kloniert wurden (Abb. 18A, Tom20<sub>ext</sub>). Der proteolytische Verdau dieses Konstrukts mit von außen zugegebener Protease sollte, nach dessen Einbau in die Außenmembran, zur Bildung eines 7-8 kDa Fragments führen. Um die korrekte intrazelluläre Lokalisation dieser Tom20-Variante *in vivo* zu überprüfen wurde der oben beschriebene Komplementationsversuch verwendet. Tom20<sub>ext</sub> konnte das Wachstum des *tom20*-Nullstammes auf YPG-Medium wieder herstellen. Deshalb ist diese Variante in der mitochondrialen Außenmembran funktionell (Abb. 18B).



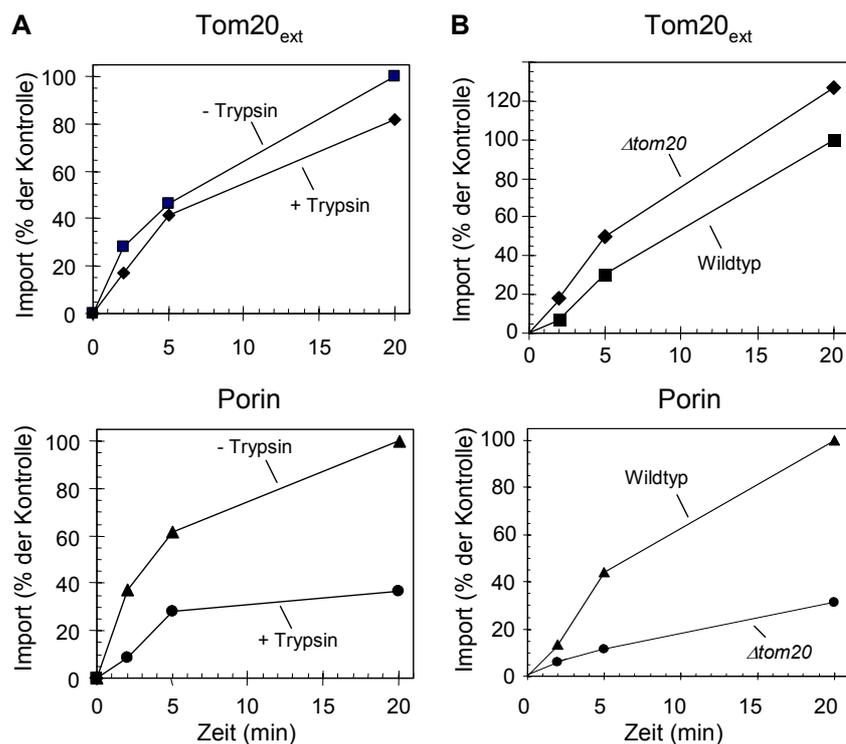
**Abb. 18. Eine neue Methode zur Untersuchung des *in vitro* Imports von Tom20.** **A.** Schematische Darstellung von Tom20 und seiner N-terminal verlängerten Variante (Tom20<sub>ext</sub>). Die vermutete Proteinase K (PK) Schnittstelle, die zur Bildung des 7 kDa Fragments führt, ist dargestellt. **B.** Tom20<sub>ext</sub> ist funktionell.  $\Delta tom20$ -Zellen und  $\Delta tom20$ -Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, welche entweder für Tom20 oder die verlängerte Tom20-Variante (Tom20<sub>ext</sub>) kodieren, wurden in einem Tüpfeltest wie in Abb. 5 untersucht. **C.** Ein proteolytisches Fragment von 7 kDa wird nach korrektem Einbau von Tom20<sub>ext</sub> in die Außenmembran gebildet. Radioaktiv markiertes Tom20 und Tom20<sub>ext</sub> wurden mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben in mehrere Aliquots geteilt. In zwei Aliquots wurden die Mitochondrien pelletiert und direkt in Laemmli-Puffer solubilisiert (*Spuren 3 und 10*). Die anderen Aliquots wurden mit PK in Abwesenheit (*Spuren 4-6 und 11-13*) oder Anwesenheit von Triton X-100 (*Spuren 7 und 14*) behandelt. Die Proteine in den beiden Proben mit Triton X-100 wurden mit TCA gefällt. Mitochondrien in den anderen Proben wurden pelletiert. Ein Aliquot wurde direkt in Laemmli-Puffer solubilisiert (*Spuren 4 und 11*), wohingegen das andere zur Carbonatextraktion (Carb.) resuspendiert wurde. Letztere Probe wurde nach 30 min auf Eis zentrifugiert und das Pellet (P) und der Überstand (Ü) wurden analysiert. Spuren 1 und 8 enthalten 25% (v/v) des in der jeweiligen Importreaktion eingesetzten Lysats. Als Kontrolle wurden 100% (v/v) des für jede Importreaktion eingesetzten Lysats mit PK behandelt (*Spuren 2 und 9*). Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. *F*, das spezifische 7 kDa Fragment.

Um zu überprüfen ob das vorhergesagte Fragment wirklich nachweisbar ist, wurde radioaktiv markiertes Tom20<sub>ext</sub> in isolierte Mitochondrien importiert und diese anschließend mit Proteinase K (PK) behandelt. Ein Fragment mit der erwarteten Größe von 7 kDa war nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE nachweisbar. Dieses Fragment wurde nach Solubilisierung der Mitochondrien mit dem Detergenz Triton X-100 komplett abgebaut und war in der Membranfraktion nach alkalischer Behandlung der Organellen zu finden (Abb.

18C). Das 7 kDa Fragment war nicht zu sehen, wenn entweder Retikulozytenlysat, welches radioaktiv markiertes Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein in Abwesenheit von Mitochondrien enthielt, oder in die Membran eingebautes natives Tom20 mit PK behandelt wurden. Somit ist die 7 kDa Bande ein spezifisches Fragment des in die Außenmembran eingebauten Tom20<sub>ext</sub>. Folglich kann diese proteolytische Methode zur Untersuchung des Insertionsmechanismus von Tom20 in die mitochondriale Außenmembran verwendet werden.

### 3.2.2. Der Import von Tom20 ist unabhängig von Importrezeptoren

Die beschriebene neu etablierte Methode wurde nun zur Untersuchung des Imports von Tom20 eingesetzt. Zunächst sollte geklärt werden ob Importrezeptoren dabei eine Rolle spielen. Die Vorbehandlung von Mitochondrien mit Trypsin zur Entfernung der cytosolisch exponierten Teile der Importrezeptoren hatte keinen Einfluss auf die Importeffizienz von Tom20<sub>ext</sub>. Im Gegensatz dazu führte diese Vorbehandlung zu einer starken Verringerung der Importeffizienz des  $\beta$ -Barrel-Membranproteins Porin (Abb. 19A).



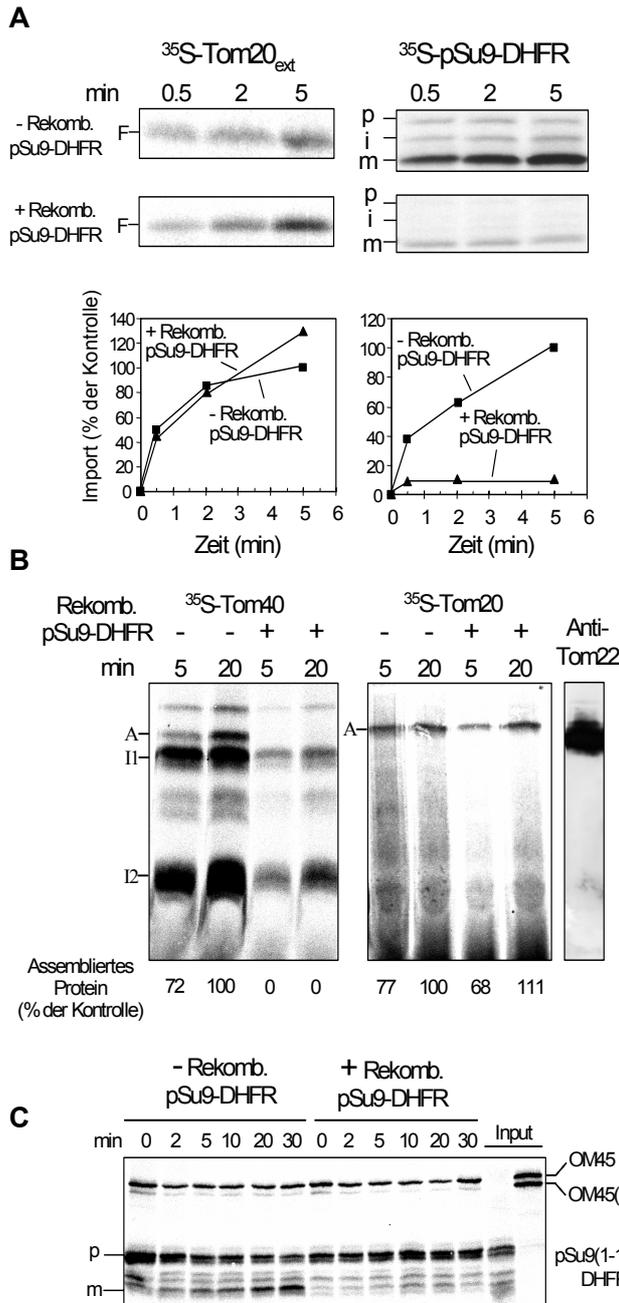
**Abb. 19. Der Membraneinbau von Tom20 ist unabhängig von Importrezeptoren.** A. Radioaktiv markiertes Tom20<sub>ext</sub> und Porin wurden bei 25°C entweder mit intakten isolierten Mitochondrien oder mit Mitochondrien, die mit Trypsin vorbehandelt worden waren, inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben mit PK behandelt. Die importierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Insertion von Tom20<sub>ext</sub> wurde durch Analyse des 7 kDa Fragments quantifiziert, wohingegen bei Porin die Protease-resistenten Moleküle quantifiziert wurden. Die Menge an importiertem Protein in Wildtyp-Mitochondrien für den längsten Zeitpunkt wurde als 100% definiert. B. Radioaktiv markierte Proteine wurden wie unter A beschrieben entweder mit Mitochondrien aus dem Wildtyp- oder dem *tom20*-Null-Stamm ( $\Delta tom20$ ) inkubiert. Danach wurde wie unter A beschrieben weiter verfahren.

Tom20 ist der Hauptimportrezeptor des TOM-Komplexes. Mitochondrien aus Wildtyp- und *Δtom20*-Hefezellen wurden mit radioaktiv markiertem Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein inkubiert und die Menge des in die Membran eingebauten Proteins analysiert. Der Import erfolgte in beide Mitochondrien mit vergleichbarer Effizienz. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Verringerung des Einbaus von Porin in die Mitochondrien aus dem *Δtom20*-Hefestamm im Vergleich zum Wildtyp beobachtet, da Porin, wie bereits schon vorher gezeigt worden war (Krimmer et al., 2001; Schleiff et al., 1999), Tom20 für seinen Import benötigt (Abb. 19B). Folglich spielen die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 keine oder nur eine untergeordnete Rolle beim Import von Tom20<sub>ext</sub>.

### 3.2.3. Signal-Anker-Proteine werden nicht über die Pore des TOM-Komplexes importiert

Als nächstes wurde untersucht ob für den Import von Tom20<sub>ext</sub> die vom TOM-Kernkomplex gebildete Importpore notwendig ist. Zu diesem Zweck wurde ein molarer Überschuss an rekombinantem Vorstufenprotein pSu9(1-69)-DHFR, welches bekanntermaßen über die Importpore in die Mitochondrien gelangt, zur Importreaktion mit radioaktiv markiertem Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein gegeben. pSu9(1-69)-DHFR ist ein Fusionsprotein aus der Matrix-Signalsequenz der Untereinheit 9 der F<sub>O</sub>-ATPase aus *N. crassa* (pSu9(1-69)) und der Dihydrofolat-Reduktase der Maus. Sowohl der Import radioaktiv markierter Matrixproteine als auch der von  $\beta$ -Barrel-Proteinen der Außenmembran kann durch Zugabe von rekombinantem pSu9(1-69)-DHFR weitestgehend blockiert werden (Krimmer et al., 2001; Paschen et al., 2003; Rapaport und Neupert, 1999). Im Gegensatz dazu wurde die Effizienz der Insertion von radioaktiv markiertem Tom20<sub>ext</sub> durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem rekombinantem pSu9(1-69)-DHFR nicht verringert, sondern eher leicht gesteigert (Abb. 20A). Wie erwartet wurde der Import von radioaktiv markiertem pSu9(1-69)-DHFR (Abb. 20A) und von Porin unter den gleichen Bedingungen stark inhibiert (Krimmer et al., 2001 und nicht gezeigt).

Weiterhin wurde untersucht ob die Assemblierung von Tom20 in den TOM-Komplex durch Blockieren der Importpore inhibiert werden kann. Radioaktiv markiertes *N. crassa* Tom20 wurde in isolierte Mitochondrien importiert und die Importreaktionen durch blaue Nativgelelektrophorese analysiert. Obwohl die Assemblierung von Tom20 durch den Überschuss an rekombinantem Protein nicht behindert wurde, war keine Assemblierung des  $\beta$ -Barrel-Proteins Tom40 in den TOM-Komplex mehr zu beobachten (Abb. 20B) (Rapaport und Neupert, 1999).



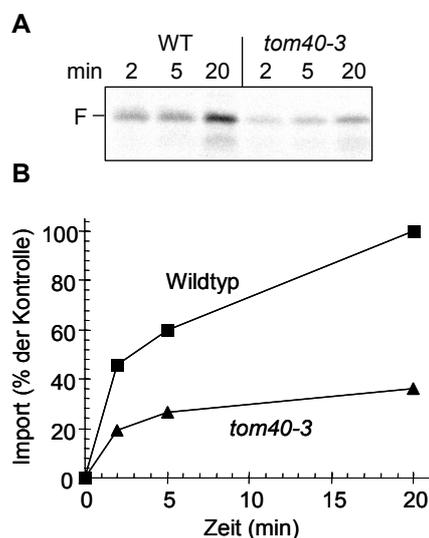
**Abb. 20. Membraneinbau und Assemblierung von Signal-Anker-Proteinen werden durch Blockade der Translokationspore mit Importintermediaten nicht inhibiert.** **A.** Isolierte Hefemitochondrien wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von rekombinantem (Rekomb.) pSu9(1-69)-DHFR inkubiert. Danach wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine zugegeben und die Ansätze für die angegebenen Zeiten bei 25°C inkubiert. Am Ende der Importreaktionen wurde Proteinase K zugegeben, die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert und die importierten Proteine quantifiziert. Die Insertion von Tom20<sub>ext</sub> wurde durch Analyse der Bildung des 7 kDa Fragments quantifiziert, wohingegen im Falle von pSu9(1-69)-DHFR die Protease-resistente Form (m) ausgewertet wurde. Das Vorstufenprotein, die intermediäre und prozessierte Form von pSu9 (1-69)-DHFR sind als p, i und m angegeben. Die Menge des in Kontrollmitochondrien für den längsten Zeitpunkt importierten Vorstufenproteins wurde als 100% definiert. **B.** Isolierte *N. crassa* Mitochondrien wurden wie in A inkubiert. Danach wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine zugegeben und die Ansätze bei 15°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Am Ende der Importreaktionen wurden die Mitochondrien reisoliert, in Puffer mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert und mittels BN-PAGE analysiert. Die drei Hauptschritte des Tom40 Imports sind angezeigt: I1, erstes Intermediat; I2, zweites Intermediat; A, assembliertes Material (Rapaport et al., 2001). Für die Detektion des endogenen TOM-Komplexes wurden Antikörper gegen Tom22 benutzt. Die Menge des in Kontrollmitochondrien für den längsten Zeitpunkt importierten Vorstufenproteins wurde als 100% definiert. **C.** Isolierte Hefemitochondrien wurden wie in A inkubiert. Danach wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine zugegeben und die Ansätze bei 15°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Am Ende der Importreaktionen wurden die Mitochondrien reisoliert und einer Carbonatextraktion unterzogen. Die Pellets der Extraktion wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. p und m, Vorstufen- und prozessierte Form von pSu9(1-112)-DHFR. Eine kürzere Form des OM45 Vorstufenproteins (OM45Δ20), welche vom Translationsstart an Met-21 herrührt, ist eingezeichnet.

Als nächstes wurde der Einfluss des Überschusses an Vorstufenprotein mit einer Präsequenz auf den Import eines anderen Signal-Anker-Proteins, OM45, untersucht. In diesem Fall wurde die Carbonatextraktion als Maßstab für korrekten Einbau in die Membran benutzt, da bei diesem Protein die Bildung eines proteolytischen Fragments oder die Assemblierung in oligomere Komplexe nicht als Kriterium verwendet werden konnten. Die Insertion von radioaktiv markiertem OM45-Vorstufenprotein wurde, wie die von Tom20<sub>ext</sub>,

unter diesen Bedingungen nicht behindert. Im Gegensatz dazu war der Einbau von pSu9(1-112)-DHFR über die TOM- und TIM23-Kanäle in die Innenmembran stark reduziert (Abb. 20C). Folglich benutzen Signal-Anker-Proteine nicht die vom TOM-Kernkomplex gebildete Importpore oder tun dies im Vergleich zu anderen mitochondrialen Proteinen auf eine völlig unterschiedliche Art und Weise.

### 3.2.4. Der TOM-Komplex ist am Import von Signal-Anker-Proteinen beteiligt

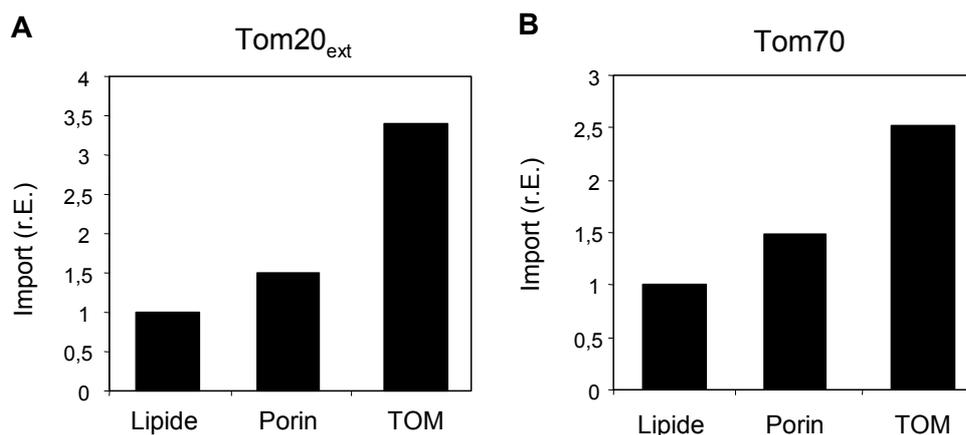
Da die Signal-Anker-Proteine anscheinend nicht über die Pore des TOM-Komplexes importiert werden stellte sich die Frage, ob dieser an deren Import überhaupt beteiligt ist. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Ahting der Membraneinbau von Tom20<sub>ext</sub> in Mitochondrien, welche aus einem Stamm mit einem temperatursensitiven *TOM40* Allel isoliert worden waren (Kassenbrock et al., 1993), untersucht. Dieser Hefestamm (*tom40-3*) wurde schon zuvor zur Untersuchung der Insertion von Porin in die Außenmembran benutzt. Dabei wurde im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der Importeffizienz oder der Assemblierung von Porin beobachtet, obwohl dieses über die Importpore des TOM-Komplexes in die Organellen gelangt (Krimmer et al., 2001; Schleiff et al., 1999). Im Gegensatz dazu war die Insertion von Tom20<sub>ext</sub> in die Tom40-3 Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien stark reduziert (Abb. 21).



**Abb. 21. Tom20 wird in *tom40-3* Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Organellen weniger effizient importiert.** **A.** Mitochondrien aus dem Hefestamm *tom40-3* und dem korrespondierenden Wildtyp (WT) wurden 10 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde radioaktiv markiertes Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein zugegeben und die Ansätze bei 25°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben mit Proteinase K behandelt und die Mitochondrien anschließend sedimentiert. Die importierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **B.** Die Banden des 7 kDa Fragments (F) von Tom20<sub>ext</sub> aus drei Experimenten wie unter A beschrieben wurden quantifiziert und die Mittelwerte graphisch dargestellt. Die Menge an in Kontrollmitochondrien importiertem Vorstufenprotein nach einer Inkubation von 20 min wurde als 100% definiert.

Folglich spielt Tom40 doch eine Rolle im Import von Signal-Anker-Proteinen. Es scheint, dass dieselben Mutationen in Tom40 einen unterschiedlichen Effekt auf die Insertion von Signal-Anker- und  $\beta$ -Barrel-Proteinen haben.

Schließlich sollte geklärt werden ob der TOM-Komplex alleine für den Import von Signal-Anker-Proteinen ausreicht. Der TOM-Kernkomplex wurde aus *N. crassa* Mitochondrien isoliert und zur Herstellung von Proteoliposomen verwendet (Ahting et al., 1999; Vasiljev et al., 2004). Diese wurden von Dr. Uwe Ahting zur Verfügung gestellt und die Experimente in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt. Der Erfolg der Rekonstitution wurde durch Silberfärbung der Proteine nach Analyse der Vesikel mittels SDS-PAGE kontrolliert (nicht gezeigt). Radioaktiv markiertes Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein wurde mit Liposomen oder mit Proteoliposomen, die entweder den TOM-Kernkomplex oder Porin enthielten, inkubiert. Die Insertion von Tom20<sub>ext</sub> wurde anhand der Bildung des 7 kDa Fragments verfolgt. Eine gewisse „Spontaninsertion“ wurde auch beobachtet, wenn reine Lipidvesikel verwendet wurden (Abb. 22A). Allerdings war die Menge an proteolytischem Fragment ungefähr dreimal höher, wenn Vesikel mit dem TOM-Kernkomplex verwendet wurden (Abb. 22A). Rekonstituiertes Porin hatte nur einen geringen Effekt auf den Einbau des Proteins (Abb. 22A). Ähnliche Ergebnisse wie mit dem Tom20<sub>ext</sub>-Vorstufenprotein wurden auch mit *N. crassa* Tom70 erhalten. Der Einbau des radioaktiv markierten Tom70-Vorstufenproteins wurde durch Analyse eines typischen Fragments nach Proteinase K Zugabe analysiert (Abb. 22B).



**Abb. 22. Insertion von Tom20<sub>ext</sub> und Tom70 in Proteoliposomen mit rekonstituiertem TOM-Kernkomplex.** Radioaktiv markierte Vorstufenproteine von Tom20<sub>ext</sub> (A) und *N. crassa* Tom70 (B) wurden entweder mit Liposomen oder mit Proteoliposomen, die entweder rekonstituiertes Porin oder den rekonstituierten TOM-Kernkomplex enthielten, inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben halbiert. Eine Hälfte wurde unbehandelt gelassen und die andere mit PK inkubiert. Die Proteoliposomen wurden reisoliert, in Laemmli-Puffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die den proteolytischen Fragmenten entsprechenden Banden wurden quantifiziert und die Insertionseffizienz in Liposomen als 1 definiert. r.E., relative Einheiten.

Die relativ geringe Steigerung der Importeffizienz bei Verwendung von Vesikeln mit rekonstituiertem TOM-Kernkomplex im Vergleich zu reinen Lipidvesikeln ist höchstwahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur ungefähr die Hälfte der rekonstituierten Komplexe die richtige Orientierung in der Membran besaß (nicht gezeigt). Folglich war nur ein Teil des rekonstituierten TOM-Kernkomplexes Import-kompetent.

### 3.3. Identifizierung des TOB-Komplexes

#### 3.3.1. Identifizierung von Tob55

Neben der Charakterisierung der Signalsequenz und des Imports von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Außenmembranproteine identifiziert werden, die am Import und der Assemblierung von mitochondrialen Vorstufenproteinen beteiligt sind. Dazu wurde ein proteomischer Ansatz gewählt. Aus isolierten *N. crassa* Mitochondrien wurden Außenmembranvesikel gewonnen (Mayer et al., 1995a) und die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Außenmembranvesikel wurden von Simone Schmitt zur Verfügung gestellt und die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch das Labor für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Institutes, LMU München, unter der Leitung von Dr. Jörg Regula. Unbekannte Proteinbanden wurden anschließend ausgeschnitten, die enthaltenen Proteine im Gel mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie identifiziert. In einer Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa war das vom offenen Leseraster (ORF) NCU05583.1 kodierte Protein nachweisbar (nicht gezeigt). Die weiteren Arbeiten wurden mit dem Hefe-Homolog, das vom ORF YNL026w kodiert wird, durchgeführt. Dieses Protein wurde aufgrund seiner relativen molekularen Masse von 54,7 kDa und seiner im Verlauf dieser Arbeit identifizierten Funktion Tob55 (Topogenese von mitochondrialen Außenmembran- $\beta$ -Barrel-Membranproteinen; *topogenesis of outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*) genannt. Die Analyse der Funktion des Proteins erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Paschen.

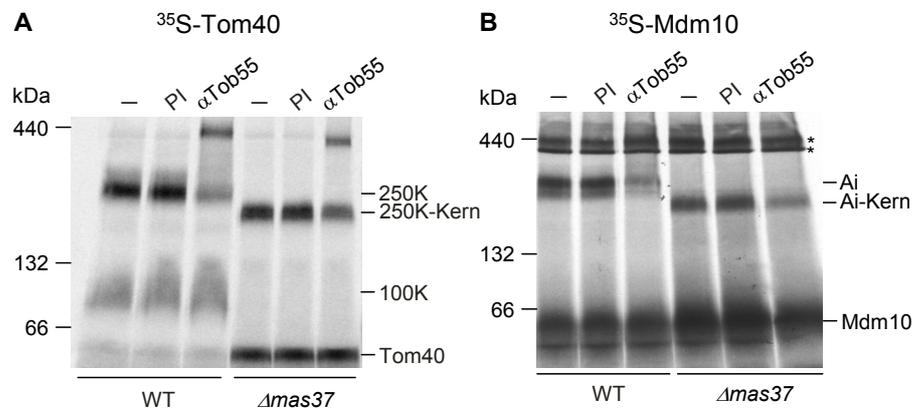
#### 3.3.2. Tob55 ist essenziell für die Biogenese von $\beta$ -Barrel-Membranproteinen

Bei der Analyse verschiedener offener Leseraster von *S. cerevisiae* wurde *TOB55* als essenzielles Gen identifiziert (Brachat et al., 2000). Zur Charakterisierung der Funktion des entsprechenden Proteins wurde der endogene Promotor chromosomal durch den Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *GAL10*-Promotor ersetzt und gleichzeitig ein

Oktahistidin-Anhang am N-Terminus des Proteins eingeführt (GAL-His<sub>8</sub>-Tob55) (Paschen et al., 2003). Durch den *GAL10*-Promotor kann die Tob55-Expression reguliert werden. Die Hefezellen wurden in Laktat-Medium, welches mit 0,1% (w/v) Glukose supplementiert worden war, für bestimmte Zeiten kultiviert und dadurch Tob55 depletiert. Anschließend wurden aus diesem Hefestamm und dem korrespondierenden Wildtypstamm, der unter den gleichen Bedingungen angezogen worden war, Mitochondrien isoliert. In den Tob55-depletierten Mitochondrien waren die endogenen Mengen an  $\beta$ -Barrel-Proteinen stark verringert (Paschen et al., 2003). Folglich könnte Tob55 bei der Biogenese dieser Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Dabei stellte sich die Frage, an welcher Stufe des Importprozesses Tob55 beteiligt ist. Um dies zu klären wurden radioaktiv markierte  $\beta$ -Barrel-Vorstufen in WT und in Tob55-depletierte Mitochondrien importiert und mittels BNGE analysiert. Der Import von Tom40 und Mdm10 in die Tob55-depletierten Mitochondrien war im Vergleich zu WT-Organellen stark verringert (Paschen et al., 2003 und nicht gezeigt). Diese beiden Vorstufenproteine bilden Importintermediate mit einem Molekulargewicht von ca. 250 kDa (Abb. 23A, B). In Tob55-depletierten Mitochondrien waren diese Intermediate nicht mehr nachweisbar (Paschen et al., 2003 und nicht gezeigt). Um zu klären, ob Tob55 Bestandteil dieser Importintermediate ist, wurden Tom40- bzw. Mdm10-Vorstufen in Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Digitonin lysiert, mit Antikörpern gegen Tob55 inkubiert und mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. Die Inkubation mit Antikörpern gegen Tob55 führte zur Bildung von höhermolekularen Superkomplexen, die sowohl die Tom40-Vorstufe als auch den Tob55-Antikörper enthielten (Abb. 23A). Mit der Vorstufe von Mdm10 war ein ähnliches Verhalten sichtbar (Abb. 23B). Folglich ist Tob55 Bestandteil des 250 kDa Importintermediates von Tom40 und Mdm10.

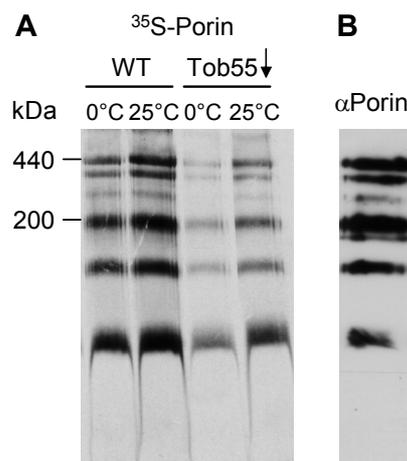
In einer zeitgleich durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass Mas37, ein mitochondriales Außenmembranprotein mit einem relativen Molekulargewicht von 37 kDa, dessen genaue Funktion bislang unklar war, ebenfalls Bestandteil des 250kDa Importintermediates von Tom40 ist (Wiedemann et al., 2003). Deshalb wurden Tom40- und Mdm10-Vorstufenproteine auch in Mitochondrien, die aus einem  $\Delta$ mas37-Hefestamm isoliert worden waren, importiert. Dies führte jeweils zur Bildung eines Importintermediates mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 210 kDa (Abb. 23A, B). Dieser Größenunterschied von ca. 40 kDa im Vergleich zum Wildtypintermediat läßt sich durch die Abwesenheit von Mas37 erklären. Sowohl im Falle von Tom40 als auch von Mdm10 führte die Inkubation mit Tob55-Antikörpern zur Ausbildung eines Superkomplexes, der radioaktiv markiertes Vorstufenprotein und Tob55-Antikörper enthielt (Abb. 23A, B). Diese Ergebnisse zeigen,

dass Tob55 direkt mit Importintermediaten der  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine Tom40 und Mdm10 in Kontakt steht. Des Weiteren scheint Tob55 auch in Abwesenheit von Mas37 Bestandteil eines stabilen Komplexes zu sein, der mit  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen interagiert.



**Abb. 23. Tob55 interagiert mit Importintermediaten von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen und ist auch in Abwesenheit von Mas37 Bestandteil eines funktionellen TOB-Kernkomplexes.**  
**A.** Radioaktiv markiertes Tom40-Vorstufenprotein wurde 20 min bei 25°C in WT- bzw.  $\Delta mas37$ -Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in 1% (w/v) Digitonin lysiert und das Lysat mit Antikörpern gegen Tob55 ( $\alpha Tob55$ ) oder Präimmunsereum (PI) inkubiert. Die weitere Analyse erfolgte mittels BNGE. Die Intermediate des Tom40 Importweges sind eingezeichnet. 250K-Kern, an den TOB-Kernkomplex gebundenes Tom40-Vorstufenprotein. **B.** Radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein wurde 20 min bei 15°C in WT- bzw.  $\Delta mas37$ -Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien wie unter *A* behandelt. Ai, Assemblierungsintermediat von Mdm10; Ai-Kern, an den TOB-Kernkomplex gebundenes Mdm10-Vorstufenprotein; \*, unspezifische Bande.

Zusätzlich wurde die Funktion von Tob55 bei der Biogenese von Porin, einem weiteren  $\beta$ -Barrel-Membranprotein, untersucht. Dazu wurden radioaktiv markierte Porin-Vorstufen in WT und Tob55-depletierte Mitochondrien (43 h Wachstum in Glukose-haltigem Medium: Tob55 $\downarrow$ ) importiert und die Porinkomplexe mittels BNGE analysiert (Abb. 24A)

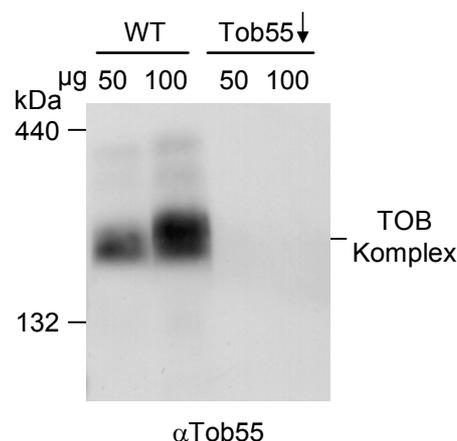


**Abb. 24. Import und Assemblierung von Porin sind von Tob55 abhängig.** **A.** Radioaktiv markiertes Porin-Vorstufenprotein wurde mit Wildtyp- bzw. Tob55-depletierten Mitochondrien (Tob55 $\downarrow$ ) für 20 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Der Import wurde mittels BNGE mit anschließender Autoradiographie analysiert. **B.** Native Porin-Komplexe. WT-Mitochondrien wurden wie in *A* solubilisiert und mittels BNGE mit anschließender Immunodekoration ( $\alpha$ Porin) analysiert.

Das importierte Porin-Vorstufenprotein assemblierte in verschiedene hochmolekulare Spezies, die denen des endogenen Porin entsprechen (Abb. 24A, B). Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Porin-Spezies ist nicht bekannt (Krimmer et al., 2001). Der Import von Porin in die Tob55-depletierten Mitochondrien war stark reduziert (Abb. 24A). Allerdings lässt sich keine spezifische Funktion von Tob55 bei der Biogenese einzelner Porin-Spezies ableiten, da alle Porin-Spezies betroffen sind (Abb. 24A). Keine der Banden scheint ein Importintermediat von Tob55 mit der Porin-Vorstufe darzustellen. Vielmehr scheint es sich um assemblierte Porinkomplexe bzw. die Porin-Vorstufe zu handeln. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Import von Porin zu schnell abläuft und deshalb keine Intermediate beobachtet werden. Im Gegensatz zu Tom40 und Mdm10 ist im Falle von Porin also kein klar definiertes Importintermediat des mit Tob55 assoziierten Vorstufenproteins mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 250 kDa nachweisbar.

### 3.3.3. Tob55 ist Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes

Die bisher bekannten mitochondrialen Importkomponenten sind Bestandteile von hochmolekularen Komplexen, wie dem TOM- oder den TIM-Komplexen (Pfanner und Geissler, 2001). Die Anwesenheit von Tob55 in dem 250K-Importintermediat von Tom40 und dem Assemblierungsintermediat von Mdm10 legt nahe, dass auch Tob55 Bestandteil eines oligomeren Komplexes ist. Um diesen Komplex zu analysieren, wurden WT-Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und die Lysate mittels BNGE mit anschließender Immunodekoration ( $\alpha$ Tob55) analysiert (Abb. 25).



**Abb. 25. Tob55 ist Bestandteil des hochmolekularen TOB-Komplexes.** WT- bzw. Tob55-depletierte Mitochondrien (Tob55 $\downarrow$ ) wurden mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert und mittels BNGE mit anschließender Immunodekoration gegen Tob55 analysiert.

Tob55 war dabei in einem hochmolekularen Komplex von ca. 200-210 kDa nachweisbar (Abb. 25), der im Folgenden als TOB-Komplex bezeichnet wird. Demnach ist

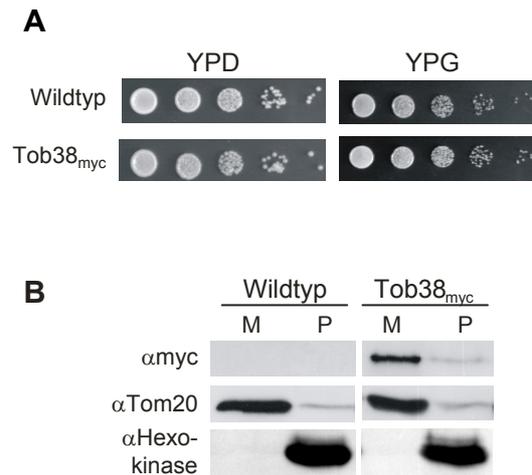
Tob55 keine Tom-Komponente, da der TOM-Komplex bei Analyse mittels BNGE ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 400 kDa aufweist (Dekker et al., 1998). Außerdem interagiert Tob55 auch nicht mit dem TOM-Komplex, da der TOB-Komplex mit Antikörpern gegen Tom-Komponenten nicht gefällt werden konnte (Paschen et al., 2003).

### **3.4. Identifizierung und Charakterisierung von Tob38, eine neue essenzielle Komponente in der Biogenese von mitochondrialen $\beta$ -Barrel-Proteinen**

#### **3.4.1. Identifizierung von Tob38**

Um neben Tob55 und Mas37 weitere Tob-Komponenten zu identifizieren, wurden Mitochondrien aus einem Wildtyp-Hefestamm und aus einem Stamm mit einem Oktahistidinanhang am Aminoterminus von Tob55 (His<sub>8</sub>-Tob55) (Paschen et al., 2003) in Digitonin lysiert und anschließend das solubilisierete Material mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Proteine, welche spezifisch zusammen mit His<sub>8</sub>-Tob55 gereinigt werden konnten, wurden mittels Massenspektroskopie identifiziert. Neben Mas37 und His<sub>8</sub>-Tob55 wurde ein weiteres Protein mit einer Masse von 38 kDa, welches Tob38 benannt wurde, gefunden. Tob38 wird von einem essenziellen Gen codiert (ORF YHR083w) (Niedenthal et al., 1999) und besteht aus 330 Aminosäureresten. In verschiedenen Datenbanken konnten keine prokaryotischen oder eukaryotischen Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit in der Sequenz zu Tob38 gefunden werden. Es zeigt allerdings eine schwache Sequenzähnlichkeit mit einem nicht näher charakterisierten Protein der Hefe *Schizosaccharomyces pombe*, welches seinerseits als Homologes von Metaxin 2, einem Außenmembranprotein in Säugermitochondrien, vorgeschlagen wurde (Armstrong et al., 1999).

Ein Hefestamm, in welchem die chromosomale Kopie von *TOB38* durch eine Version ersetzt wurde, die für Tob38 mit einem Myc-Anhang am Carboxyterminus kodiert, wuchs wie der Wildtyp (Abb. 26A). Nach subzellulärer Fraktionierung war das Protein mit dem Myc-Anhang in der mitochondrialen Fraktion zu finden (Abb. 26B). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen zweier vorangegangener Hoch-Durchsatz-Studien überein. Einerseits wurde Tob38 dabei im mitochondrialen Proteom gefunden und andererseits war das Protein mit C-terminalem GFP-Anhang in Mitochondrien lokalisiert (Huh et al., 2003; Sickmann et al., 2003).



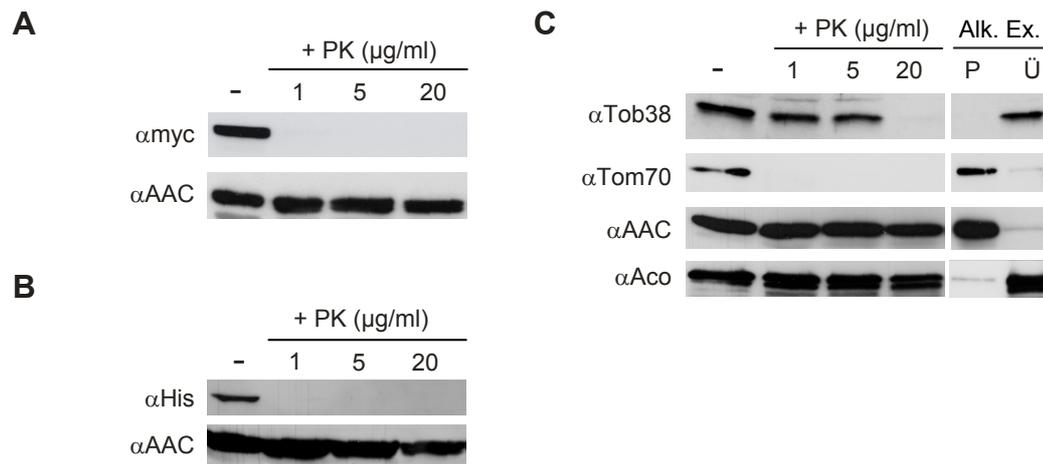
**Abb. 26. Tob38 ist ein mitochondriales Protein.** **A.** Tob38 mit Myc-Anhang ist funktionell. Wildtyp-Hefezellen und Zellen, die Tob38 mit Myc-Anhang exprimieren (Tob38<sub>Myc</sub>), wurden in einem Tüpfeltest auf ihr Wachstum bei 30°C auf den angegebenen Medien untersucht. **B.** Mitochondriale und post-mitochondriale Fraktionen (M und P) von Wildtyp- und Tob38<sub>Myc</sub>-Zellen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit Antikörpern gegen den Myc-Anhang (anti-Myc) und gegen Markerproteine für das Cytosol (anti-Hexokinase) und die mitochondriale Außenmembran (anti-Tom20) untersucht.

### 3.4.2. Tob38 ist ein peripheres Außenmembranprotein

Um die submitochondriale Lokalisierung von Tob38 zu untersuchen wurden Mitochondrien mit Proteinase K behandelt. Sowohl Tob38 mit einem C-terminalen Myc-Anhang als auch mit einem N-terminalen His-Anhang wurde dabei abgebaut und konnte folglich nicht mehr mit Antikörpern gegen den jeweiligen Anhang immunodekoriert werden (Abb. 27A, B). Auch wenn polyklonale Antikörper gegen rekombinantes Tob38 benutzt wurden, war Tob38 nach Proteasebehandlung von Mitochondrien nicht mehr nachweisbar (Abb. 27C). Folglich sind der Großteil des Proteins und auch seine beiden Termini cytosolisch lokalisiert.

Nach Alkalibehandlung von Mitochondrien war Tob38 im Gegensatz zu integralen Membranproteinen im Überstand zu finden (Abb. 27C). Wenn radioaktiv markiertes Tob38-Vorstufenprotein mit isolierten Mitochondrien inkubiert wurde assoziierte es mit den Organellen. Anschließende Behandlung mit PK führte zur Bildung mehrerer proteolytischer Fragmente, welche nicht beobachtet wurden, wenn lösliches Tob38-Vorstufenprotein mit PK inkubiert wurde (nicht gezeigt).

Zusammenfassend scheint Tob38 eher ein peripheres als ein integrales Protein der Außenmembran zu sein. Verschiedene Computerprogramme sagen keine Membranverankernden  $\beta$ -Faltblätter und/oder helikale Transmembransegmente voraus.



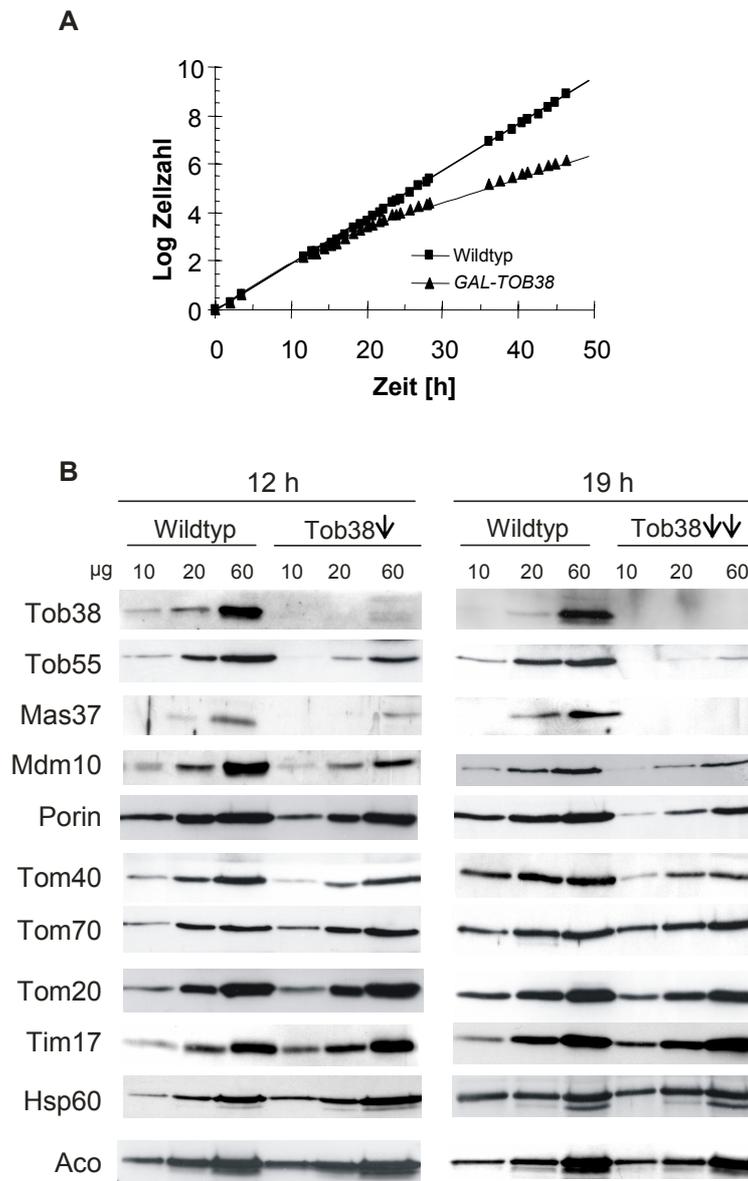
**Abb. 27. Tob38 ist ein peripheres Außenmembranprotein.** **A, B.** Mitochondrien aus Zellen mit Tob38 mit C-terminalem Myc-Anhang (*A*) oder N-terminalem His-Anhang (*B*) wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von Proteinase K (PK) inkubiert. Die Proben wurden wie unter Abb. 26B beschrieben unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Anti-His, Antikörper gegen den His-Anhang; AAC (ADP/ATP Carrier), ein integrales Innenmembranprotein. **C.** Wildtyp-Mitochondrien wurden mit PK behandelt oder einer alkalischen Extraktion (Alk. Ex.) unterzogen und wie unter Abb. 26B beschrieben analysiert. Aco (Aconitase), ein lösliches Matrixprotein; P und Ü, Pellet beziehungsweise Überstandfraktion; Tom70, ein zum Cytosol exponiertes Außenmembranprotein.

### 3.4.3. Tob38 ist eine Komponente des TOB-Komplexes

Ein Hefestamm, in welchem das *TOB38*-Gen unter der Kontrolle des *GAL10*-Promotors ist, wurde konstruiert. In Gegenwart von Galaktose wuchsen diese Zellen vergleichbar zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum des *GAL10-TOB38*-Stammes bei Wachstum auf Glukose-haltigem Medium nach 12 h etwas und nach 19 h deutlich langsamer (Abb. 28A). Dieser unvollständige Wachstumsstopp stimmt gut mit den Ergebnissen einer vorangegangenen systematischen genomischen Analyse überein. Nach Sporulation heterozygot diploider Zellen und Tetradenanalyse waren dort Tob38-defiziente Sporen noch in der Lage, eine beschränkte Anzahl von Zellteilungen zu durchlaufen (Niedenthal et al., 1999).

*GAL-TOB38*-Zellen und ihr korrespondierender Wildtyp wurden entweder für 12 oder 19 h in Gegenwart von Glukose kultiviert. Tob38 war in Mitochondrien der auf Glukose gewachsenen *GAL-TOB38*-Zellen nicht mehr nachweisbar (Abb. 28B). Die Mengen einiger anderer mitochondrialer Proteine wurden mittels Immunodekoration bestimmt (Abb. 28B). Mas37 und Tob55 waren schon nach 12 h Wachstum auf Glukose stark reduziert. Die Depletion von Tob38 für 19 h führte zu noch geringeren Mengen an Mas37 und Tob55 (5-15% der Wildtypmengen) und auch die Mengen der  $\beta$ -Barrel-Proteine Tom40, Mdm10 und Porin waren dann deutlich reduziert (35-60% der Wildtypmengen; Abb. 28B). Im Gegensatz dazu waren die Mengen anderer Proteine aus den verschiedenen mitochondrialen

Subkompartimenten mit denen im Wildtyp vergleichbar (82-104% der Wildtypmengen; Abb. 28B).



**Abb. 28. Tob38 ist essenziell für die Biogenese von  $\beta$ -Barrel-Proteinen.** **A.** Die Depletion von Tob38 beeinflusst das Zellwachstum. Wildtyp-Zellen und Zellen, welche Tob38 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors exprimieren (*GAL-TOB38*) wurden zum Zeitpunkt Null von Galaktose- auf Glukose-haltiges Medium transferiert. **B.** Die Mengen an Tob38, Mas37, Tob55 und der  $\beta$ -Barrel-Proteine sind in Mitochondrien aus Tob38-depletierten Zellen verringert. Proteinmengen wurden mittels Immunodekoration mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine bestimmt.

Da die Depletion von Tob38 zu deutlich verringerten endogenen Mengen der anderen Tob-Komponenten Tob55 und Mas37 führte, stellte sich die Frage ob die verschiedenen Tob-Komponenten koreguliert sind. Die Mengen an Tob38 in Mitochondrien aus  $\Delta mas37$ -Zellen waren leicht reduziert. Im Gegensatz dazu führte die Depletion von Tob55 zu einer viel stärkeren Verringerung der Tob38-Mengen (Abb. 29A). Folglich scheinen Tob38 und Tob55 koreguliert zu sein. Umgekehrt beeinflusste die Deletion von Mas37 die Mengen an Tob55

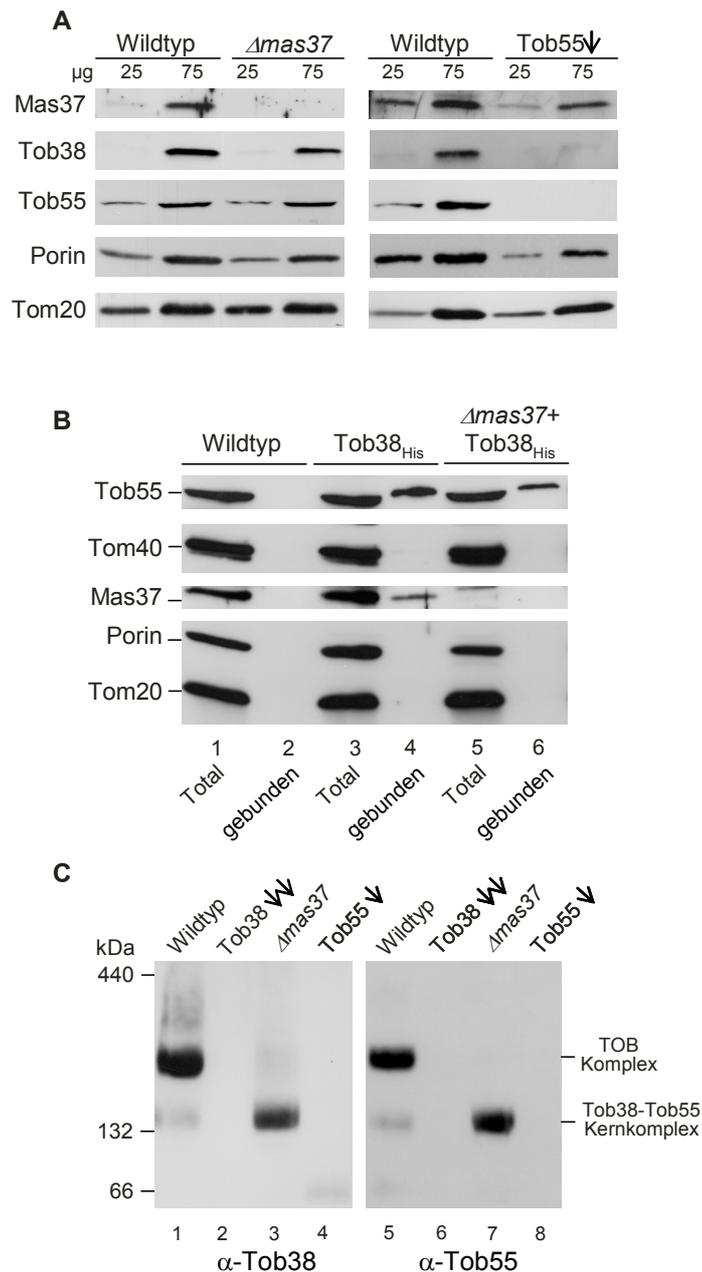
nicht und die Depletion von Tob55 führte zu einer moderaten Verringerung der Mas37-Mengen.

Als nächstes wurden Ni-NTA-Affinitätsfällungen durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien aus einem Stamm ohne Wildtyp Tob38 verwendet, der aber stattdessen Tob38 mit einem Histidin-Anhang am C-Terminus exprimiert (Tob38<sub>His</sub>). Diese Zellen wuchsen wie der Wildtyp (nicht gezeigt) und deshalb scheint das Protein voll funktionell zu sein. Die zwei bekannten Komponenten des TOB-Komplexes, Tob55 und Mas37, wurden zusammen mit Tob38<sub>His</sub> kogereinigt. Mit anderen Außenmembranproteinen wurde diese Interaktion nicht beobachtet (Abb. 29B und nicht gezeigt). Ungefähr 80% des Tob55 der Mitochondrien wurde mit Tob38 koisoliert, aber nur 15% von Mas37 (Mittelwerte von vier Experimenten). Folglich ist Tob38 Bestandteil des TOB-Komplexes und zeigt eine starke Interaktion mit Tob55, wohingegen die Interaktion von Tob38 mit Mas37 schwächer zu sein scheint.

Um zu überprüfen ob die Interaktion von Tob38 mit Tob55 von Mas37 abhängig ist wurden Ni-NTA-Affinitätsfällungen mit Mitochondrien aus einem  $\Delta mas37$ -Stamm, welcher Tob38<sub>His</sub> enthält, durchgeführt. Tob55 wurde auch in Abwesenheit von Mas37 mit Tob38<sub>His</sub> koisoliert, allerdings mit etwas geringerer Effizienz (Abb. 29B). Somit ist die Assoziation von Tob38 mit Tob55 nicht strikt von der Anwesenheit von Mas37 abhängig.

Der TOB-Komplex wurde mittels BNGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tob55 und Tob38 weiter analysiert. Nach Solubilisierung von Wildtyp-Mitochondrien mit Triton X-100 wanderte der Komplex mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 200-210 kDa (Abb. 29C) (Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Eine schwache Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kDa, welche sowohl Tob55 als auch Tob38 enthält, war ebenfalls sichtbar. Dieser TOB-Kernkomplex mit kleinerem Molekulargewicht war bereits zuvor in Mitochondrien ohne Mas37 beobachtet worden (Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Folglich repräsentiert die 160 kDa-Spezies geringe Mengen an TOB-Komplex, in welchem Mas37 nicht vorhanden oder vom TOB-Holokomplex abdissoziiert ist. Tatsächlich war in Mitochondrien aus dem  $\Delta mas37$ -Hefestamm der TOB-Komplex nicht mehr vorhanden und Tob55 und Tob38 waren nur im TOB-Kernkomplex mit ungefähr 160 kDa Molekulargewicht nachweisbar (Abb. 29C).

In Tob38- oder Tob55-depletierten Mitochondrien konnte weder der TOB-Komplex noch der TOB-Kernkomplex detektiert werden (Abb. 29C). Demnach enthalten sowohl der TOB-Komplex als auch der TOB-Kernkomplex Tob38 und Tob55. Tob38 ist also eine integrale und elementare Komponente des TOB-Komplexes.



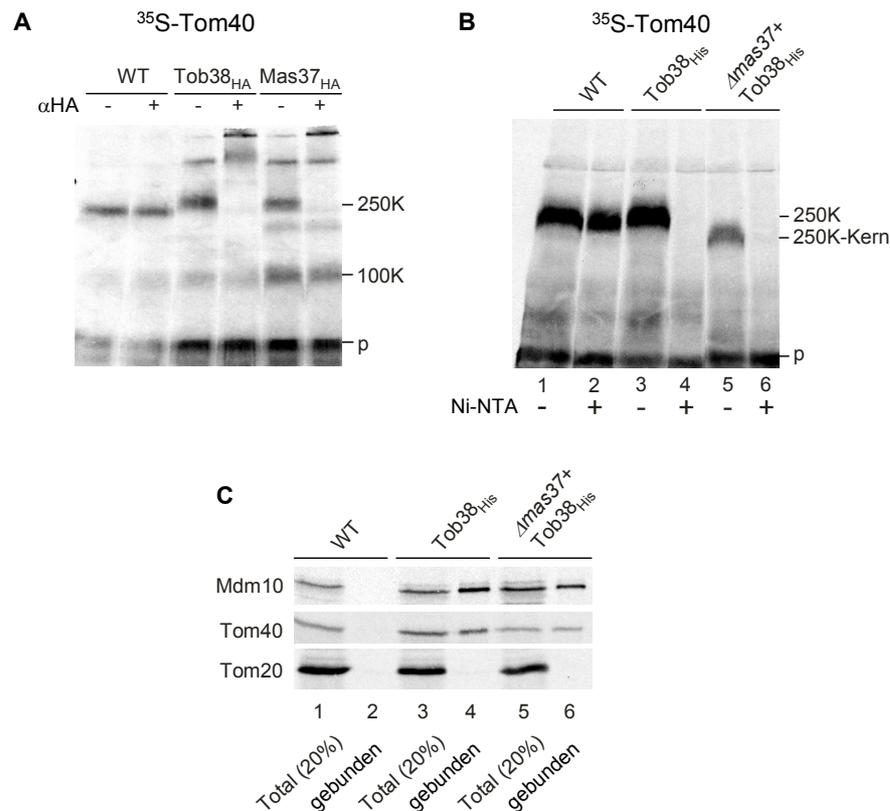
**Abb. 29. Tob38 ist eine Komponente des TOB-Komplexes.** **A.** Mitochondrien aus einem  $\Delta mas37$ -Stamm, aus Tob55-depletierten Zellen (Tob55 $\downarrow$ ) und aus korrespondierenden Wildtyp-Zellen wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine analysiert. **B.** Mitochondrien mit der authentischen (Wildtyp) oder der Form von Tob38 mit His-Anhang (Tob38<sub>His</sub>) und Mitochondrien aus  $\Delta mas37$ -Zellen mit Tob38<sub>His</sub> ( $\Delta mas37+$ Tob38<sub>His</sub>) wurden lysiert und einer Ni-NTA-Affinitätsreinigung unterzogen. Gleiche Mengen an eingesetztem (Total) und gebundenem Protein wurden wie unter A beschrieben analysiert. **C.** Mitochondrien aus Wildtyp-, Tob38-depletierten (Tob38 $\downarrow\downarrow$ ),  $\Delta mas37$ - und Tob55-depletierten (Tob55 $\downarrow$ ) Zellen wurden in Triton X-100 lysiert und mittels BNGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tob38 und Tob55 analysiert.

### 3.4.4. Tob38 ist beteiligt an der Membraninsertion von $\beta$ -Barrel-Proteinen

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden ob Tob38 am Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beteiligt ist und falls ja an welchem Schritt. Tom40- und Mdm10-Vorstufenproteine binden an den TOB-Komplex und dabei wird ein Importintermediat von ungefähr 250 kDa



Tob55 ist Bestandteil des 250 kDa-Importintermediates im Tom40-Importweg (Abb. 23A, 250K). Zur Klärung ob auch Tob38 Bestandteil dieses Intermediates ist wurden Mitochondrien aus einem Hefestamm, welcher Tob38 mit Hämagglutinin-Anhang am C-Terminus exprimiert (Tob38<sub>HA</sub>), mit Tom40-Vorstufenproteinen unter Bedingungen inkubiert, die zur Bildung des 250 kDa-Importintermediates führen. Nach Lyse mit Digitonin und Inkubation mit Antikörpern gegen den Hämagglutinin-Anhang ( $\alpha$ HA) war das 250 kDa-Importintermediat zu höherem Molekulargewicht durch Bindung des HA-Antikörpers an dieses verschoben (Abb. 31A).



**Abb. 31. Tob38 interagiert mit Vorstufen von  $\beta$ -Barrel-Proteinen.** **A.** Wildtyp-, Tob38<sub>HA</sub>- und Mas37<sub>HA</sub>-Mitochondrien wurden mit radioaktiv markierten Tom40-Vorstufen inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in Digitonin lysiert und das Lysat mit Antikörpern gegen den HA-Anhang ( $\alpha$ HA) inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die weitere Analyse erfolgte mittels BNGE. Die 250 kDa- und 100 kDa-Assemblierungsintermediate (250K, 100K) und die Vorstufenform (p) von Tom40 sind eingezeichnet. **B.** Wildtyp-, Tob38<sub>His</sub>- und  $\Delta$ mas37<sup>+</sup>Tob38<sub>His</sub>-Mitochondrien wurden mit radioaktiv markierten Tom40-Vorstufen inkubiert. Die Mitochondrien wurden resoliert, in Puffer mit Digitonin resuspendiert und halbiert. Eine Hälfte wurde direkt mittels BNGE analysiert, wohingegen die andere mit Ni-NTA-Agarose inkubiert wurde. Das nicht gebundene Material wurde analysiert. 250K-Kern, an den TOB-Kernkomplex gebundenes Tom40-Vorstufenprotein. **C.** Die angegebenen radioaktiv markierten Vorstufenproteine wurden wie unter B beschrieben in Mitochondrien importiert. Nach Lyse wurde eine Portion (Total (20%)) abgenommen. Der Rest wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Diese wurde anschließend gewaschen und mit SDS-haltigem Puffer eluiert (gebunden). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Alternativ konnte die Anwesenheit von Tob38 in dem 250 kDa-Importintermediat gezeigt werden, indem Tom40-Vorstufenproteine in Mitochondrien aus einem Tob38<sub>His</sub>-

Hefestamm unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 31A importiert wurden. Nach dem Import wurden die Mitochondrien in Digitonin lysiert und das Lysat mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, wobei das 250 kDa-Intermediat komplett aus dem Lysat entfernt werden konnte (Abb. 31B). Folglich ist Tob38 eine integrale Komponente des 250 kDa-Intermediat-Komplexes. Wenn der gleiche Versuch mit Mitochondrien aus einem *Δmas37*-Hefestamm, welcher Tob38<sub>His</sub> exprimiert, durchgeführt wurde, band das 250K-Kern-Intermediat vollständig an Ni-NTA-Agarose (Abb. 31B). Demnach ist Tob38 Bestandteil eines TOB-Kernkomplexes, bestehend aus Tob55 und Tob38, der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen binden kann.

Zur Demonstration der direkten oder indirekten Interaktion von Tob38 mit Vorstufen von  $\beta$ -Barrel-Proteinen während deren Import wurden radioaktiv markierte Vorstufen von Tom40 und Mdm10 mit Tob38<sub>His</sub>-Mitochondrien inkubiert. Nach Lyse und Inkubation mit Ni-NTA-Agarose wurden die Vorstufenproteine tatsächlich mit Tob38<sub>His</sub> kogereinigt, im Gegensatz zu Tom20 (Abb. 31C). Daher interagiert Tob38 mit  $\beta$ -Barrel-Proteinen auf ihrem Importweg. Dies war sogar in Abwesenheit von Mas37 der Fall (Abb. 31C).

Folglich ist Tob38 eine Komponente des TOB-Komplexes und wird für die Bindung von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen benötigt. Tob38 bildet mit Tob55 einen funktionellen TOB-Kernkomplex, der auch in Abwesenheit von Mas37 Vorstufen von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen binden kann.

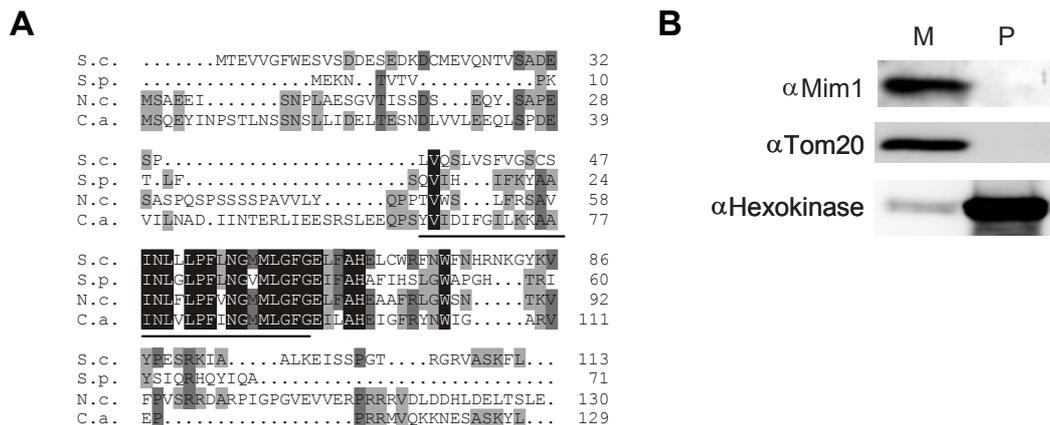
### **3.5. Mim1, ein Protein welches für die Assemblierung des TOM-Komplexes benötigt wird**

#### **3.5.1. Mim1 ist ein mitochondriales Protein**

Bei der Analyse des Proteoms der mitochondrialen Außenmembran von *N. crassa* wurde ein weiteres, bisher nicht charakterisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 14,2 kDa (NCU01101.1), welches eine starke Sequenzähnlichkeit zu Mim1 (mitochondrialer Import) aus *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YOL026C) besitzt, identifiziert. Mim1 wurde kürzlich in einem Hoch-Durchsatz-Screen gefunden und als essenzielles Protein (Giaever et al., 2002) mit unbestimmter Rolle in der Biogenese von Mitochondrien beschrieben. In Gesamtzellextrakten wurde nach Depletion von Mim1 die Akkumulation der Vorstufenform der ATPase-Untereinheit F<sub>1</sub> $\beta$  beobachtet (Mnaimneh et al., 2004). Mim1 ist unter Pilzen stark konserviert. Diese Konservierung der Sequenz ist auf die vorhergesagte Transmembranregion

beschränkt (Abb. 32A). In höheren Eukaryoten konnten keine Homologe von Mim1 identifiziert werden.

Für die weitere Charakterisierung des Proteins wurde Mim1 in *S. cerevisiae* untersucht. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Mim1 wurde ein Antikörper verwendet, der gegen ein Fusionsprotein aus Mim1 und Maltose-bindendem Protein (MBP-Mim1) gebildet worden war. Mim1 war in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar (Abb. 32B).



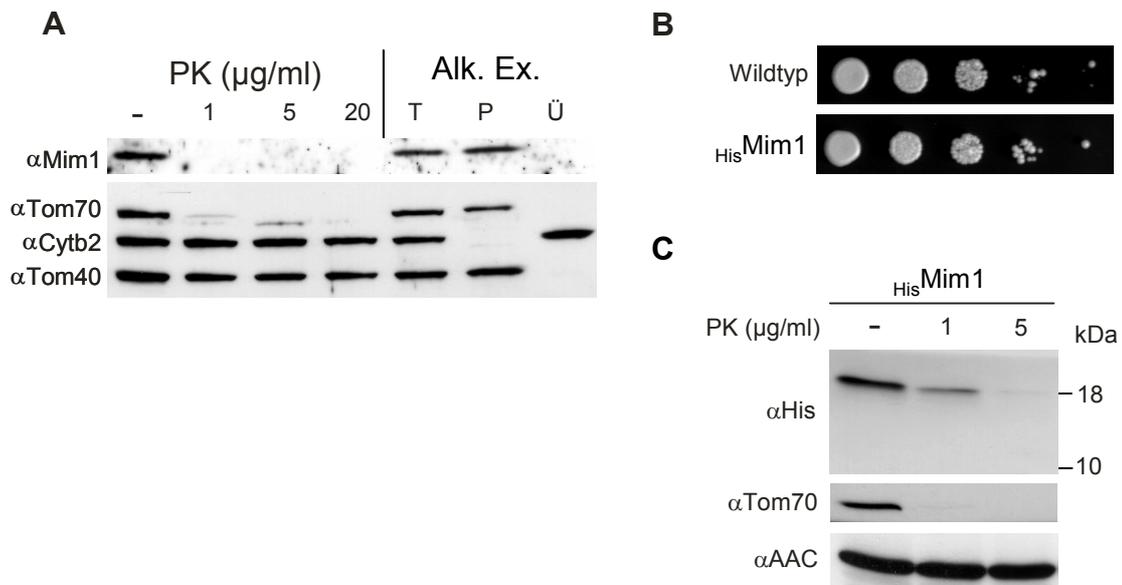
**Abb. 32. Mim1 ist ein mitochondriales Protein.** **A.** Mim1 ist unter Pilzen konserviert. Die Aminosäuresequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.), *Schizosaccharomyces pombe* (S.p.), *Neurospora crassa* (N.c.) und *Candida albicans* (C.a.) Mim1 sind abgebildet. Identische Reste sind weiß auf schwarzem Hintergrund und ähnliche Reste in grau dargestellt. Die vermeintliche Transmembrandomäne des *S. cerevisiae* Proteins ist unterstrichen. **B.** Mitochondriale (M) und postmitochondriale Fraktionen (P) wurden aus Hefezellen isoliert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting mit Antikörpern gegen Mim1, Hexokinase, ein Markerprotein für das Cytozol, und das mitochondriale Protein Tom20 analysiert.

### 3.5.2. Mim1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran

Die Membrantopologie von Mim1 wurde durch Proteasebehandlung von Mitochondrien untersucht. Wenn polyklonale Antikörper gegen rekombinantes Mim1 benutzt wurden war selbst nach Verwendung von niedrigen Konzentrationen an PK Mim1 nicht mehr detektierbar. Cytochrom *b2*, ein Protein im Intermembranraum, war durch diese Behandlung nicht betroffen, was die Unversehrtheit der Außenmembran demonstriert (Abb. 33A). Demnach ist Mim1 ein Außenmembranprotein. Die Assoziation von Mim1 mit der Außenmembran wurde mittels alkalischer Behandlung von Mitochondrien untersucht. Mim1 war dabei, wie die bekannten integralen Außenmembranproteine Tom40 und Tom70, in der Membranfraktion zu finden (Abb. 33A).

Um mehr Informationen über die Topologie des Proteins zu erhalten, wurde die chromosomale Kopie des *MIMI*-Gens durch eine Version ersetzt, welche für Mim1 mit einem Histidin-Anhang am Aminoterminus ( $_{\text{His}}$ Mim1) kodiert. Dieser Stamm wuchs wie der

korrespondierende Wildtyp (Abb. 33B). Mim1 mit Histidin-Anhang enthaltende Mitochondrien wurden mit PK behandelt. Mim1 wurde abgebaut und konnte nicht mehr mit Antikörpern gegen den Histidin-Anhang immunodekoriert werden (Abb. 33C). Folglich ist der Aminoterminus des Proteins zum Cytosol hin exponiert. Die Topologie der Carboxy-terminalen Domäne des Proteins konnte nicht bestimmt werden, da Mim1 mit einem C-terminalen HA-Anhang nicht voll funktionell war (nicht gezeigt).

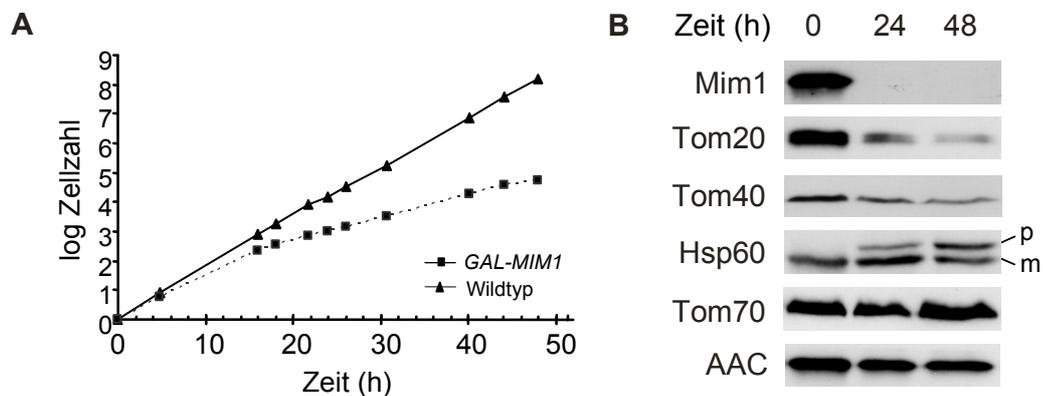


**Abb. 33. Mim1 ist ein integrales Außenmembranprotein.** **A.** Mitochondrien wurden mit den angegebenen Konzentrationen an PK behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen Mim1, die Außenmembranproteine Tom70 und Tom40 und das IMR-Protein Cytb2 analysiert. Andere Proben wurden einer Carbonatextraktion unterzogen. Unbehandelte Mitochondrien (Total, T), Pellet (P) und Überstandfraktion (Ü) wurden wie oben beschrieben analysiert. **B.** Ein Stamm, welcher eine Variante von Mim1 mit N-terminalem Histidin-Anhang enthält, wächst wie der Wildtyp. Zellen, die Mim1 mit N-terminalem Histidin-Anhang enthalten, sowie entsprechende Wildtyp-Zellen, wurden hinsichtlich ihres Wachstums auf YPGal-Medium bei 30°C untersucht (Verdünnungen in 10er Schritten). **C.** Mitochondrien, die Mim1 mit N-terminalem Histidin-Anhang enthalten, wurden mit PK in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen den Histidin-Anhang, Tom70 und den ADP/ATP Carrier (AAC) untersucht.

### 3.5.3. Die Depletion von Mim1 führt zu geringeren Mengen an Tom-Komponenten in Mitochondrien

Um die Funktion von Mim1 zu untersuchen wurde ein Hefestamm hergestellt, in dem das Gen unter der Kontrolle des *GAL10*-Promotors war. In Anwesenheit von Galaktose wuchsen diese Zellen wie Wildtyp-Zellen. Im Gegensatz dazu war in Gegenwart von Glukose das Wachstum dieses Stammes nach 24 h stark verlangsamt, jedoch hörten die Zellen nie vollständig auf zu wachsen (Abb. 34A). Ein ähnlicher Wachstumsphänotyp war zuvor schon beobachtet worden (Mnaimneh et al., 2004). In dieser Studie zeigte ein Hefestamm mit dem *MIMI*-Gen unter Kontrolle des TetO<sub>7</sub>-Promotors ein gewisses Restwachstum auf

YPG+Doxycylin. Durch dessen Zugabe zum Medium wird die Expression des Gens unter Kontrolle des TetO<sub>7</sub>-Promotors reprimiert. Gesamtzellextrakte wurden von *GAL-MIM1*-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Wechsel von Galaktose-haltigem auf Glukose-haltiges Medium angefertigt. Die Mengen verschiedener mitochondrialer Proteine wurden mittels Immunodekoration analysiert (Abb. 34B). Wie erwartet war Mim1 nach 24 h Wachstum auf Glukose-haltigem Medium nicht mehr nachweisbar. Eine starke Verringerung der Mengen der Tom-Komponenten Tom40 und Tom20 war ebenfalls beobachtbar. Der andere Rezeptor des TOM-Komplexes, Tom70, und das ADP/ATP-Carrier Protein waren in praktisch unveränderten Mengen wie vor dem Medienwechsel vorhanden. Mit der Verringerung der Mengen an Tom20 und Tom40 ging eine Akkumulation der Vorstufenform des Matrixproteins Hsp60 einher (Abb. 34B). Demnach beeinträchtigt die Depletion von Mim1 die Biogenese der Mitochondrien.



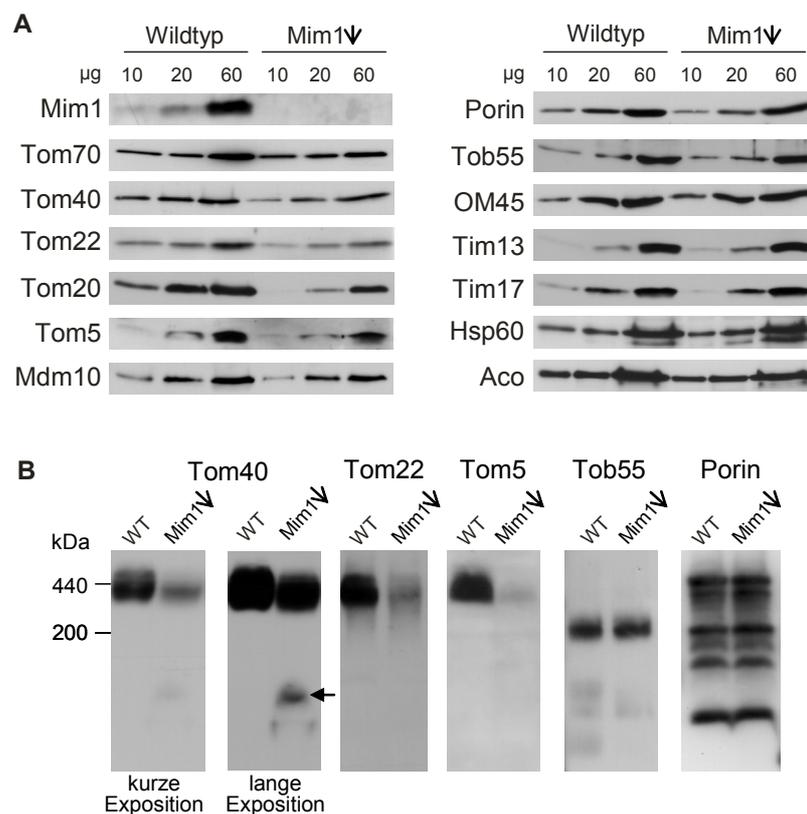
**Abb. 34. Die Depletion von Mim1 führt zu verringerten Mengen mitochondrialer Proteine.**

**A.** Die Depletion von Mim1 beeinflusst das Zellwachstum. Wildtyp-Zellen und Zellen, welche Mim1 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors exprimieren (*GAL-MIM1*) wurden zum Zeitpunkt null von Galaktose-haltigem auf Glukose-haltiges Medium transferiert. **B.** Die Abwesenheit von Mim1 führt zur Akkumulation von mitochondrialen Vorstufenproteinen. Gesamtzellextrakte wurden von *GAL-MIM1*-Zellen angefertigt, welche bei 30°C in Laktatmedium mit 0,1% (w/v) Glukose für die angegebenen Zeiten angezogen worden waren. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit den angegebenen Antikörpern analysiert. P und m repräsentieren die Vorstufen- beziehungsweise die reife Form von Hsp60.

### 3.5.4. Mim1 ist für die Assemblierung des TOM-Komplexes notwendig und Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes

Um die molekulare Funktion von Mim1 zu untersuchen wurde der Effekt der Depletion von Mim1 auf verschiedene mitochondriale Prozesse näher betrachtet. Mitochondrien wurden sowohl aus *GAL-MIM1* als auch korrespondierenden Wildtyp-Zellen isoliert, welche beide 15 h in Anwesenheit von Glukose kultiviert worden waren. Die Mengen verschiedener mitochondrialer Proteine wurden mittels Immunodekoration bestimmt (Abb. 35A). In Mim1-depletieren Mitochondrien (Mim1↓) war im Vergleich zu Wildtyp-Organellen

die Menge an Tom20 stark verringert, wohingegen die Mengen anderer Tom-Komponenten wie Tom40, Tom22 und Tom5 nur moderat reduziert waren. Im Gegensatz dazu waren andere mitochondriale Proteine, wie die Außenmembranproteine Tom70, Mdm10, Porin, Tob55 und OM45, die IMR-Komponente Tim13, das Innenmembranprotein Tim 17 und die Matrixproteine Hsp60 und Aconitase ungefähr in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen vorhanden (Abb. 35A).

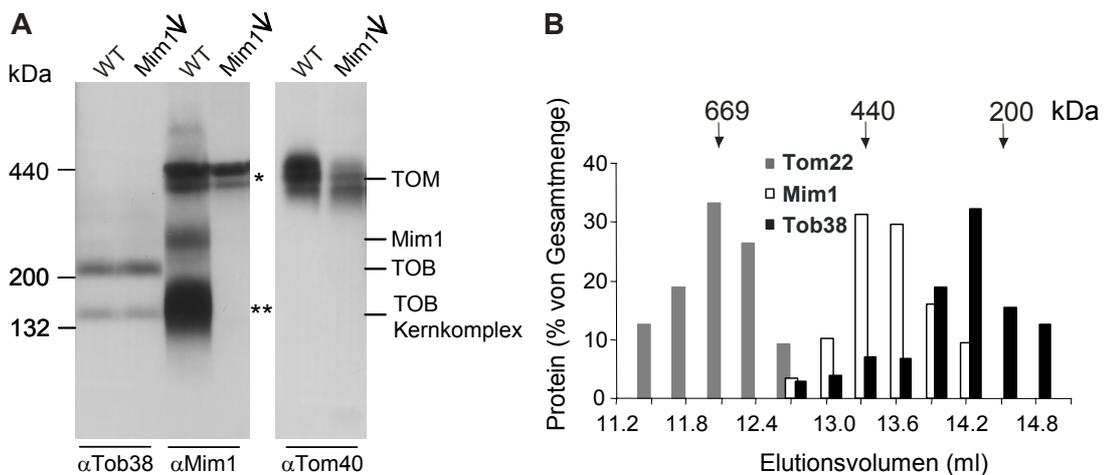


**Abb. 35. Mim1 ist für die Assemblierung des TOM-Komplexes notwendig.** **A.** Mengen verschiedener Proteine in Mitochondrien aus WT- und Mim1-depletierten Zellen (15 h; Mim1↓) wurden mittels Immunodekoration bestimmt. **B.** TOM-Komplex in Mim1-depletierten Zellen. Mitochondrien wie unter *A* wurden mit 0,5% (v/v) Triton X-100 (Tob55) oder 1% (w/v) Digitonin lysiert und die Proteine mittels BNGE und anschließender Immunodekoration mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Eine kurze und eine lange Exposition der Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tom40 sind dargestellt. Die Tom40-enthaltende niedermolekulare Spezies ist mit einem Pfeil markiert.

Die geringeren Mengen mancher Tom-Proteine könnten auf eine gestörte Biogenese des TOM-Komplexes als Folge der Depletion von Mim1 zurückzuführen sein, was wiederum zu Sekundäreffekten wie verringertem Proteinimport führen würde. Um dies zu überprüfen wurde der TOM-Komplex mittels BNGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tom40, Tom22 und Tom5 untersucht. Der TOM-Komplex von Mim1-depletierten (Mim1↓) und WT-Zellen war bezüglich seines Molekulargewichtes nicht zu unterscheiden (Abb. 35B). Jedoch waren die Mengen an assembliertem TOM-Komplex in den Mim1-depletierten Mitochondrien (Mim1↓) deutlich verringert. Nach 15 h Depletion waren nur ungefähr 30%

der Wildtypmenge übrig. In den Mim1-depletierten Mitochondrien (Mim1↓) war eine weitere Tom40-enhaltende Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 100 kDa vorhanden (Abb. 35B und Abb. 37A-C). Diese Spezies ähnelt in ihrem Laufverhalten Tom40-enhaltenden Spezies, die in Mitochondrien aus *Δtom6*- und *Δtom22*-Hefestämmen beobachtet worden waren, in denen die Assemblierung des TOM-Komplexes beeinträchtigt ist (Dekker et al., 1998; van Wilpe et al., 1999). Im Gegensatz dazu waren andere Komplexe in der mitochondrialen Außenmembran, wie der TOB-Komplex und die von Porin gebildeten Komplexe, nicht betroffen (Abb. 35B). Demnach spielt Mim1 eine Rolle bei der Biogenese des TOM-Komplexes, aber nicht von Außenmembranproteinen oder  $\beta$ -Barrel-Proteinen im Allgemeinen oder von anderen mitochondrialen Proteinen.

Um zu untersuchen ob Mim1 eine Komponente des TOM- oder TOB-Komplexes ist, wurden Mitochondrien nach Lyse mit dem milden Detergenz Digitonin mittels BNGE bzw. Gelfiltration analysiert. Mim1 war in einem hochmolekularen Komplex mit einer Masse von ca. 250-300 kDa (laut BNGE) bzw. 400-450 kDa (gemäß Gelfiltration) nachweisbar (Abb. 36A, B).

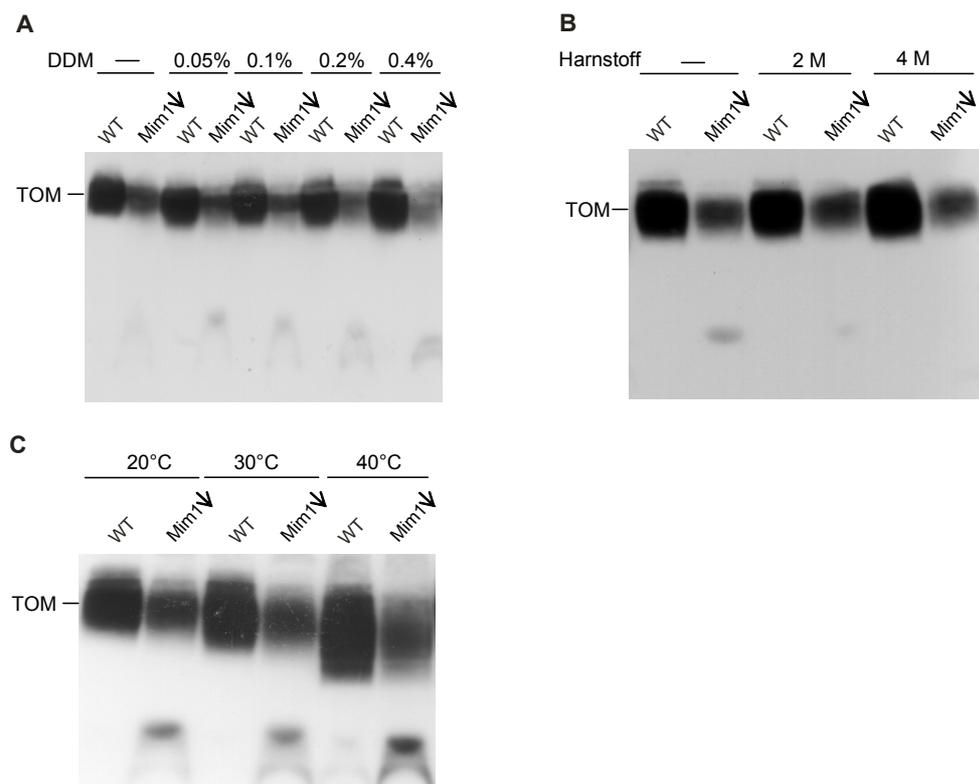


**Abb. 36. Mim1 ist Teil eines hochmolekularen Komplexes.** **A.** Mitochondrien aus WT- und Mim1-depletierten Zellen (15 h; Mim1↓) wurden in 1% (w/v) Digitonin lysiert und die Proteine mittels BNGE und anschließender Immunodekoration mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Mit einem Stern ist die unspezifische Kreuzreaktivität des Mim1-Antikörpers und mit zwei Sternen ein Mim1-enhaltender Komplex, der vermutlich durch Zerfall des höhermolekularen Mim1-Komplexes während der BNGE entsteht, markiert. **B.** Mitochondrien aus WT-Zellen wurden mit 1,5% (w/v) Digitonin lysiert und einer Gelfiltration mit einer Superose6-Säule unterzogen. Fraktionen von 300  $\mu$ l wurden mittels Immunoblotting gegen Tom22, Mim1 und Tob38 analysiert. Lösliche Markerproteine sind mit Pfeilen eingezeichnet.

Dieser Komplex war in seinem Laufverhalten deutlich vom TOM- bzw. TOB-Komplex zu unterscheiden. Folglich ist Mim1 weder eine Tob- noch eine Tom-Komponente. Die unterschiedlichen scheinbaren Molekulargewichte bei Analyse des Mim1-Komplexes mittels BNGE bzw. Gelfiltration könnten auf die Anwesenheit von Coomassie bei der BNGE

zurückzuführen sein. Zusätzlich war Mim1 bei der Analyse mittels BNGE in einer Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 150-200 kDa vorhanden (Abb. 36C). Diese ist höchstwahrscheinlich auf einen teilweisen Zerfall des Mim1-Komplexes während der BNGE zurückzuführen, da bei Gelfiltrationsexperimenten nur die höhermolekulare Spezies detektiert wurde.

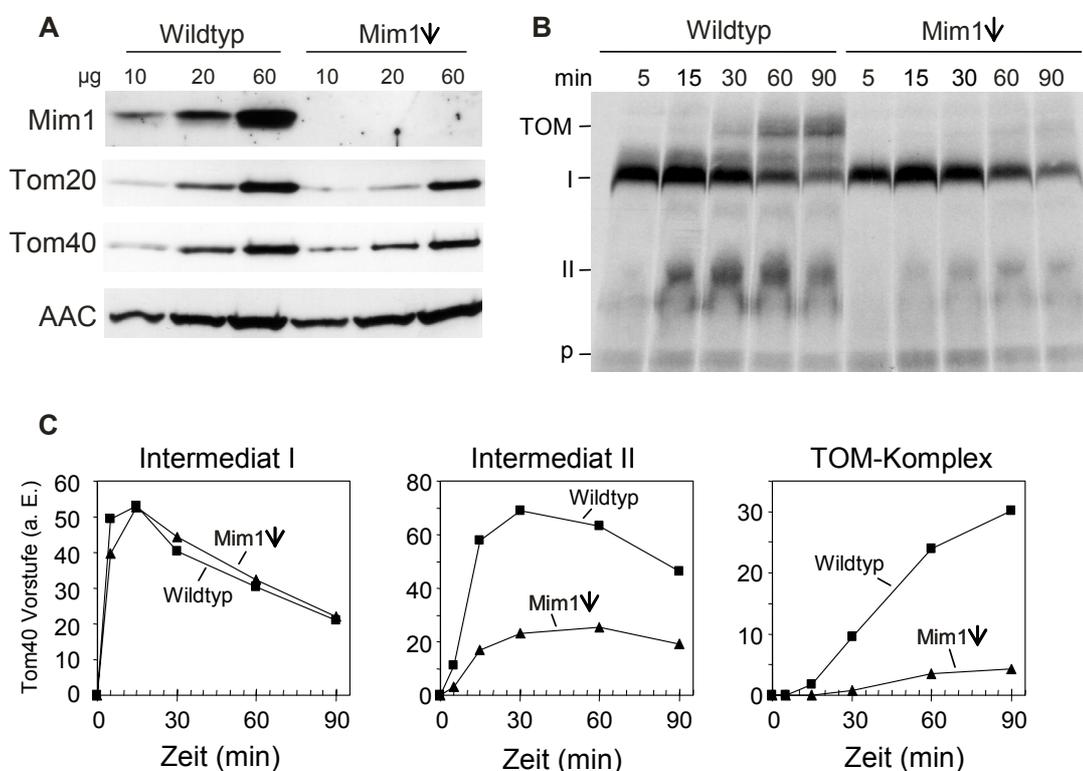
Für den massiven Mangel an assembliertem TOM-Komplex in Abwesenheit von Mim1 kann es zwei Ursachen geben. Einerseits könnte der Assemblierungsprozess beeinträchtigt sein und andererseits der TOM-Komplex in Abwesenheit von Mim1 weniger stabil sein. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Stabilität des TOM-Komplexes in Mim1-depletierten Mitochondrien (Mim1↓) untersucht. Obwohl die Gesamtmenge an TOM-Komplex in Mim1-depletierten Mitochondrien (Mim1↓) deutlich verringert war, bestand kein Unterschied in der Stabilität des Komplexes im Vergleich zum Wildtyp bei Behandlung mit n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) oder Harnstoff oder bei Erhitzen auf 40°C (Abb. 37A-C).



**Abb. 37. Mim1 wird für die Stabilität des TOM-Komplexes nicht benötigt.** **A.** Mitochondrien aus WT-Zellen oder Mim1-depletierten Zellen (15 h; Mim1↓) wurden in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) mit 1% (w/v) Digitonin lysiert. Die Lysate wurden mittels BNGE analysiert und mit Antikörpern gegen Tom40 immunodekoriert. **B.** Mitochondrien wie unter *A* wurden mit 1% (w/v) Digitonin in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Harnstoff lysiert. **C.** Mitochondrien wie unter *A* wurden in 1% (w/v) Digitonin lysiert und 10 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Diese Behandlungen führen bekanntermaßen zur teilweisen Destabilisierung des TOM-Komplexes bzw. der von Porin gebildeten Komplexe (Meisinger et al., 2001). Demnach spielt Mim1 vermutlich eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des TOM-Komplexes. Allerdings bleibt dieser nach erfolgter Assemblierung auch in Abwesenheit von Mim1 stabil.

Als nächstes wurde untersucht welcher Schritt im Assemblierungsprozess des TOM-Komplexes in Mim1-depletierten Mitochondrien blockiert ist. Um Sekundäreffekte aufgrund verringerter Mengen an Tom-Komponenten zu verhindern wurden Mitochondrien aus Zellen verwendet, in denen Mim1 nur 8 h depletiert worden war. Die Mengen an Tom20 und Tom40 waren in diesen Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Organellen nur leicht verringert, wohingegen Mim1 nicht mehr detektierbar war (Abb. 38A).



**Abb. 38. Mim1 agiert bei einem Schritt nach Bindung des Tom40-Vorstufenproteins an den TOB-Komplex.** A. Mitochondrien aus WT- und Mim1-depletierten Zellen (8 h; Mim1 $\Delta$ ) wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Immunodekoration mit den angegebenen Antikörpern analysiert. B. Mitochondrien wie unter A wurden mit radioaktiv markierten Tom40-Vorstufen bei 25°C für verschiedene Zeiten inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit Digitonin lysiert und mittels BNGE und anschließender Autoradiographie analysiert. p, Vorstufenprotein; I und II, Assemblierungsintermediate I und II von Tom40; TOM, der assemblierte TOM-Komplex. C. Quantifizierung der Banden, die den verschiedenen in B dargestellten Intermediaten entsprechen. a. E., arbiträre Einheiten.

Intermediate in der Assemblierung des Komplexes wurden durch Untersuchung des *in vitro*-Imports von Tom40 identifiziert. Insbesondere wurden zwei charakteristische Assemblierungs-Intermediate von Tom40 beobachtet (Abb. 38B). Intermediat I mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 250 kDa repräsentiert einen Komplex von Tom40 mit

dem TOB-Komplex. Intermediat II (100 kDa) stellt einen späteren Schritt des Assemblierungsprozesses dar, nämlich nachdem Tom40 vom TOB-Komplex in die Lipidphase der Membran entlassen wurde. Beim Import in isolierte Mitochondrien akkumuliert ein Großteil der Tom40-Vorstufen bei diesen Schritten und nur ein Teil assembliert in den TOM-Kernkomplex, da die beteiligten Reaktionen unter den *in vitro*-Bedingungen offensichtlich nicht effizient ablaufen (Model et al., 2001; Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003).

In Mim1-depletierten Mitochondrien wurde das Intermediat I in ähnlichem Ausmaß wie in Wildtyp-Organellen gebildet, wohingegen die Mengen an Intermediat II deutlich verringert und assemblierter TOM-Komplex so gut wie nicht vorhanden waren (Abb. 38B, C). Folglich scheint Mim1 nach dem TOB-Komplex zu agieren. Zwei Möglichkeiten können als Erklärung dienen, warum keine massive Akkumulation der Tom40-Vorstufe am TOB-Komplex (Intermediat I) zu beobachten ist. Erstens könnten die Bindungsstellen für die Vorstufenproteine am TOB-Komplex unter den experimentellen Bedingungen gesättigt sein. Zweitens könnte, obwohl Mim1 keine integrale Komponente des TOB-Komplexes ist, in Abwesenheit von Mim1 die Affinität des TOB-Komplexes für die Tom40-Vorstufenproteine geringer sein.

Mim1 wurde als eine für die Assemblierung des TOM-Komplexes entscheidende Komponente identifiziert und charakterisiert. Es scheint nicht eine generelle Rolle bei der Biogenese aller  $\beta$ -Barrel-Membranproteine zu spielen, sondern spezifisch für die Assemblierung von Tom40 mit den anderen Tom-Komponenten notwendig zu sein.

## 4. Diskussion

Mitochondriale Außenmembranproteine erfüllen wichtige und essenzielle Funktionen dieser Organellen und folglich für das Leben der Zellen. Bis jetzt ist allerdings wenig über ihre molekularen Strukturen, ihre Funktionen und ihre Importwege in Mitochondrien bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fragestellungen bezüglich der Biogenese von mitochondrialen Außenmembranproteinen adressiert: 1) Wie sind die Informationen für den Transport zu Mitochondrien und den korrekten Einbau in die mitochondriale Außenmembran kodiert? 2) Wie werden diese Signale an der Außenmembran erkannt? 3) Wie werden die Proteine schließlich in die Membran eingebaut? Diese Fragen sollten einerseits für Proteine mit einer Signal-Anker-Domäne und andererseits für  $\beta$ -Barrel-Membranproteine beantwortet werden.

### 4.1. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von Signal-Anker-Domänen

Eine Klasse mitochondrialer Außenmembranproteine, zu der Tom20, Tom70 und OM45 gehören, ist mit dem N-terminalen Segment in der Membran verankert während der Großteil des Proteins cytosolisch lokalisiert ist. N-terminal verankerte Proteine sind auch als Proteine mit Signal-Anker-Domäne bekannt. Ob die Signal-Anker-Domänen mitochondrialer Außenmembranproteine für die spezifische Funktion des jeweiligen Proteins entscheidend sind war bisher weitestgehend unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Signal-Anker-Domänen funktionell austauschbar sind. Wenn man die geringe Sequenz-Ähnlichkeit in diesen Regionen in Betracht zieht ist diese Beobachtung ziemlich überraschend. Da OM45 keine Tom-Komponente ist führt dieses Ergebnis außerdem zu der Schlussfolgerung, dass die Assemblierung von Tom20 und Tom70 in den TOM-Komplex hauptsächlich über die cytosolischen Domänen dieser Rezeptorproteine vermittelt wird. In Übereinstimmung damit wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten eine Interaktion zwischen der cytosolischen Domäne von Tom20 und den cytosolischen Domänen von Tom70 und Tom22 gefunden (Suzuki et al., 2002; van Wilpe et al., 1999). Die mangelnden Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen von Tom20 und Tom70 und den in die Membran eingebetteten Elementen des TOM-Komplexes würde auch erklären warum Tom20 und Tom70 nur peripher mit dem Kernkomplex assoziierte Tom-Komponenten sind (Ahting

et al., 1999; Dekker et al., 1998). Folglich ist die Hauptfunktion der N-terminalen Signal-Anker-Domänen von Tom20 und Tom70 nicht die Rekrutierung dieser Rezeptoren zum TOM-Komplex, sondern eher deren Verankerung in der Außenmembran, so dass die Rezeptoren Vorstufenproteine auf der gesamten mitochondrialen Oberfläche einsammeln können. Wie hier gezeigt, kann Tom20 ohne seine Signal-Anker-Domäne nicht als Rezeptor fungieren. Gleichzeitig enthalten die Transmembrandomänen mit ihren flankierenden Regionen die Signale für den Transport zur und den Einbau in die mitochondriale Außenmembran, sind aber offensichtlich für die spezifische Funktion des jeweiligen Proteins nicht von entscheidender Bedeutung.

Außerdem suchte ich nach gemeinsamen strukturellen Elementen der Signal-Anker-Domänen mitochondrialer Außenmembranproteine. Dazu wurden zwei Eigenschaften dieser Sequenzen analysiert: die Ladungen von Aminosäureresten in den den Membrananker flankierenden Regionen und die Hydrophobizität der Transmembrandomäne selbst. Die C-terminal flankierenden Regionen der Transmembrandomänen besitzen in allen mitochondrialen Hefeproteinen, die mit dem N-Terminus in der Membran verankert sind, eine positive Nettoladung (siehe Abb. 3). Zusätzlich sind in den N-terminal flankierenden Regionen häufig hydroxylierte und positiv geladene Aminosäurereste vorhanden. Eine neutrale Nettoladung der C-terminal flankierenden Regionen wurde toleriert; sogar eine negative Nettoladung führte zu korrekter mitochondrialer Lokalisation, allerdings nur mit relativ geringer Effizienz. Die hydroxylierten Reste in der N-terminalen Region konnten ohne Effekt entfernt werden. Ebenso wenig wurde die Funktionalität der Signalsequenz beeinträchtigt, wenn die positiv geladenen Reste in diesen Segmenten durch neutrale ersetzt wurden. Folglich steigern positiv geladene Reste in beiden flankierenden Regionen die Transporteffizienz zu Mitochondrien und die Membraneinbaurate, sie sind allerdings für beide Prozesse nicht absolut notwendig. Frühere Beobachtungen, wonach Tom70 auch nach Entfernen der positiven Ladungen in der N-terminal flankierenden Region in isolierte Mitochondrien importiert wurde, unterstützen diese Annahme (McBride et al., 1992).

In Säugersystemen allerdings ist eine positive Nettoladung in den C-terminal flankierenden Regionen für die mitochondriale Lokalisation sowohl von Tom70 als auch von Tom20 essenziell (Kanaji et al., 2000; Suzuki et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für die offensichtlich unterschiedliche Situation in Hefe und Ratte könnte die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Außenmembran in diesen beiden Organismen sein. Während nur 28% der Gesamtlipide in mitochondrialen Außenmembranen der Ratte Phosphatidylethanolamin (PE) sind, haben Außenmembranen in Hefe einen höheren

Prozentsatz von 36% PE (De Kroon et al., 1997; De Kroon et al., 1999). Solche „*nonbilayer* Lipide“ bilden Insertionsstellen für Proteine (van den Brink-van der Laan et al., 2001). Der höhere PE-Anteil in Hefe könnte den Einbau der Transmembrandomäne fördern, selbst wenn nicht alle strukturellen Parameter optimal sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein bislang unbekanntes Protein, welches die Signalsequenz an der mitochondrialen Oberfläche dekodiert, in Hefe im Vergleich zu Säugern die Anwesenheit positiver Ladungen weniger stark benötigt.

Eine moderate Hydrophobizität der Transmembrandomäne scheint der entscheidende Parameter für Signal-Anker-Domänen zu sein, damit das Vorstufenprotein zu den Mitochondrien gelangt. Das Einführen einer hydrophoberen Transmembrandomäne, ohne die flankierenden Regionen zu verändern, verhinderte den korrekten Transport zur und die Funktionalität in der mitochondrialen Außenmembran. Selbst wenn nur vier Aminosäurereste in der Transmembrandomäne von Tom20 in hydrophobere umgewandelt wurden führte dies zu etwas verlangsamtem Wachstum der Hefezellen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass Tom20 aus Säugern bei Erhöhung der Hydrophobizität der Transmembrandomäne zum ER dirigiert wird (Kanaji et al., 2000). Die Bedeutung der Hydrophobizität wird durch die Tatsache unterstrichen, dass eine negative Nettoladung in der N-terminal flankierenden Region der Signal-Anker-Domäne von Tom20 viel besser toleriert wird als im Fall von OM45. Dieser Unterschied könnte auf die höhere Hydrophobizität der Transmembrandomäne von OM45 zurückzuführen sein (nach Kyte und Doolittle: 2,2 im Vergleich zu 1,4 im Fall von Tom20). Bei Tom20 kann die Abweichung von der optimalen Ladungsverteilung durch eine günstige relativ geringe Hydrophobizität kompensiert werden. Im Gegensatz dazu erlaubt die hohe Hydrophobizität der Transmembrandomäne von OM45 keine weitere Abweichung in Richtung einer negativeren Ladung.

Mäßige Hydrophobizität ist jedoch nicht die einzige strukturelle Bedingung. Da Tom20-Varianten mit vertauschter Aminosäurereihenfolge in der Transmembrandomäne nur teilweise die Funktion des Proteins erfüllen können ist es offensichtlich, dass die native Sequenz die Bildung eines bevorzugten strukturellen Elements, am ehesten einer  $\alpha$ -Helix, besser unterstützt.

Folglich ist die Signalsequenz in N-terminal verankerten mitochondrialen Außenmembranproteinen aus zwei Elementen mit klarer Hierarchie aufgebaut. Am wichtigsten ist eine moderate Hydrophobizität der Transmembrandomäne, während positiv geladene Reste in den flankierenden Regionen mit der Transmembrandomäne kooperieren, um den Transport zur und die Verankerung in der Außenmembran zu verbessern. Signal-

Anker-Domänen, die diese strukturellen Anforderungen erfüllen, sind funktionell austauschbar. Sie spielen nur eine untergeordnete Rolle für die spezifischen Funktionen der Proteine, sind aber von entscheidender Bedeutung als Signalsequenz und Membrananker.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Studien mit *Tail-anchor*-Proteinen erhalten. Dabei konnten die C-terminalen *Tail-anchor*-Domänen von Tom5 bzw. Tom6 diejenige von Fis1 funktionell ersetzen (Habib et al., 2003). Folglich spielt dieser Sequenzabschnitt nur eine untergeordnete Rolle für die Funktion von Fis1. Ebenfalls sind die Ergebnisse hinsichtlich der Notwendigkeit positiver Ladungen in der *Tail-anchor*-Domäne für die mitochondriale Lokalisation des Vorstufenproteins vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit Signal-Anker-Proteinen erhalten wurden. Ähnlich wie im Fall von Tom20 sind für den Transport von Tom5 zu Mitochondrien im Säugersystem die drei basischen Reste im C-terminalen Segment essenziell, wohingegen in Hefe auch nach Ersetzen dieser positiv geladenen Aminosäurereste durch neutrale das Protein in Mitochondrien wiederzufinden ist (Horie et al., 2002; Horie et al., 2003). Weitere Beispiele für die Notwendigkeit positiver Ladungen im die Transmembrandomäne C-terminal flankierenden Bereich in Säugerzellen sind VAMP-1B und Cytochrom *b<sub>5</sub>* (Isenmann et al., 1998; Kuroda et al., 1998). Allerdings sind in manchen Fällen auch in Hefezellen positive Ladungen im C-terminalen Segment für den Transport zu Mitochondrien notwendig, wie am Beispiel von Fis1 gezeigt werden konnte (Habib et al., 2003). Ein Unterschied zwischen Proteinen mit einer Signal-Anker- bzw. einer *Tail-anchor*-Domäne besteht darin, dass im Fall der C-terminal in der Membran verankerten Proteine weniger die Hydrophobizität der Transmembrandomäne als vielmehr ihre korrekte Länge und die richtige Entfernung zwischen den positiven Ladungen im C-terminalen Segment und der Transmembrandomäne für die mitochondriale Lokalisation entscheidend sind (Horie et al., 2002; Horie et al., 2003).

## **4.2. Import von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne**

Nach Charakterisierung der Signalsequenzen von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne wurde deren Import in die Außenmembran näher beleuchtet. Dabei waren sowohl der Importmechanismus als auch die daran beteiligten Komponenten von Interesse. Die Untersuchung dieses Problems war bisher nur begrenzt möglich, da keine Methoden verfügbar waren mit denen der Einbau dieser Vorstufenproteine in die Außenmembran zuverlässig analysiert werden kann. In vorangegangenen Arbeiten wurde die Carbonatextraktion als Kriterium für korrekte Insertion dieser Proteine in die Außenmembran

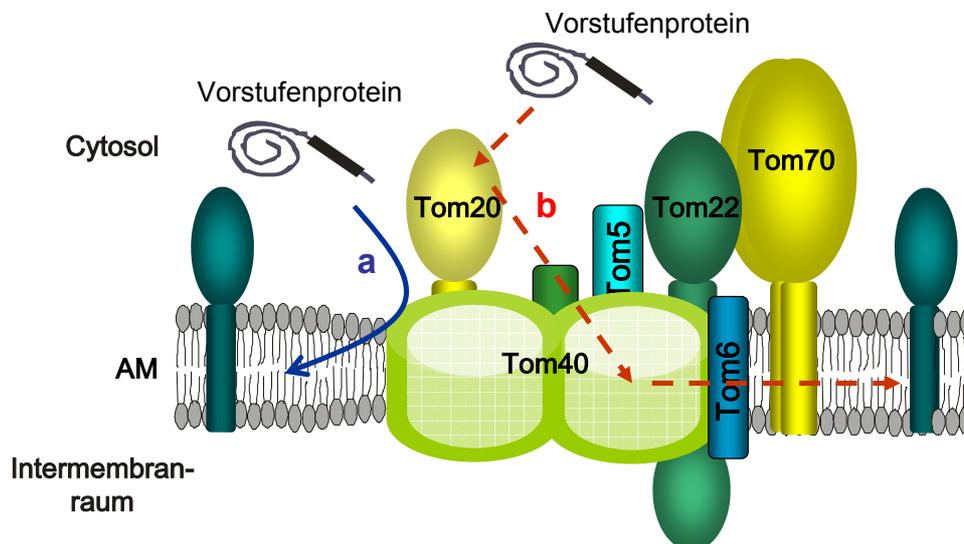
verwendet. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich zwischen unspezifischer Bindung und physiologischer Membranintegration von Vorstufenproteinen zu unterscheiden (Borgese et al., 2003). Deshalb wurde eine zuverlässige Methode zur Analyse des Membraneinbaus entwickelt, nämlich die Bildung eines definierten proteolytischen Fragments in intakten Mitochondrien. Dieses Fragment beinhaltet die in die Membran eingebaute Transmembrandomäne und das Segment im Intermembranraum, welche beide für die von außen zugegebene Protease nicht zugänglich sind.

Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass sowohl die bekannten Importrezeptoren Tom20 und Tom70 als auch cytosolische Domänen anderer mitochondrialer Proteine nicht für den korrekten Membraneinbau nötig sind. Diese Ergebnisse stimmen mit den vorangegangenen Beobachtungen überein, dass der mitochondriale Import von Tom20 und Tom70 von Protease-zugänglichen Oberflächenrezeptoren unabhängig ist (Schlossmann und Neupert, 1995; Schneider et al., 1991; Suzuki et al., 2002). Außerdem konnte der Wachstumsphänotyp des *Atom20*-Hefestammes durch Transformation mit einem für Tom20 kodierenden Hefeexpressionsvektor komplementiert werden. Folglich sind für den Import von neu synthetisierten Tom20-Vorstufen keine bereits vorhandenen Tom20-Moleküle notwendig.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Proteine mit einer Signal-Anker-Domäne entweder direkt von in die Membran eingebetteten Komponenten des TOM-Kernkomplexes oder von einem bisher nicht identifizierten Außenmembranprotein erkannt werden. Die erste Möglichkeit scheint wahrscheinlicher, da der gereinigte TOM-Kernkomplex den Einbau von Tom20 in Proteoliposomen unterstützte. Der Import von Tom20 und OM45 wurde durch Zugabe eines molaren Überschusses an Vorstufenprotein mit einer Präsequenz nicht inhibiert. Daher werden Signal-Anker-Proteine vermutlich nicht über die von Tom40 gebildete Pore in Mitochondrien importiert. Allerdings legen die gezeigten Ergebnisse, dass Tom20 in Mitochondrien aus dem *tom40-3* Hefestamm im Vergleich zu WT-Organellen weniger effizient importiert wird, eine Beteiligung von Tom40 am Insertionsprozess nahe. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Resultaten einer früheren Studie, in der Antikörper gegen Tom40 den Membraneinbau von neu synthetisiertem Tom20 inhibierten (Schneider et al., 1991). Allerdings könnten auch noch zusätzliche Faktoren den Insertionsprozess unterstützen.

Zwei verschiedene Szenarien scheinen nach der initialen Erkennung des Vorstufenproteins durch den TOM-Komplex möglich zu sein (Abb. 39). Erstens könnte die Signal-Anker-Domäne in das Lumen der von Tom40 gebildeten Translokationspore inseriert werden, worauf sich die  $\beta$ -Barrel-Struktur öffnen und das Protein lateral in die

Lipiddoppelschicht der Membran entlassen werden könnte (Abb. 39, *Weg b*). Ein solches Öffnen einer  $\beta$ -Barrel-Struktur ist allerdings thermodynamisch ungünstig (Gabriel et al., 2001). Das zweite Modell, bei welchem das Vorstufenprotein an der Interphase zwischen dem TOM-Kernkomplex und der Lipidphase der Membran inseriert wird (Abb. 39, *Weg a*), ist wesentlich wahrscheinlicher.



**Abb. 39. Modelle für die Insertion von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne in die Außenmembran.** Siehe Text für Details. In *Weg a* (*durchgezogene Linie*) werden Proteine mit einer Signal-Anker-Domäne ohne Beteiligung des von Tom40 gebildeten Importkanals in die Membran eingebaut, wohingegen *Weg b* (*unterbrochene Linien*) eine laterale Öffnung des TOM-Kanals beinhaltet.

In diesem Modell vermitteln Teile des Tom40 Moleküls mit potentieller Beteiligung von in die Membran eingebetteten Segmenten anderer Komponenten des TOM-Kernkomplexes die Insertion von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne, wohingegen andere Segmente von Tom40 den Importkanal bilden. Dieses Modell wird durch die kürzlich veröffentlichte Beteiligung von Tom40 am Sortieren verschiedener Vorstufenproteine unterstützt. Dabei wurde eine Tom40-Variante charakterisiert, welche Vorstufenproteine mit Präsequenz nur sehr ineffizient zum TIM23-Komplex transportiert, aber den Einbau von Außenmembranproteinen normal unterstützt (Gabriel et al., 2003). Darüber hinaus wurde auch für Cytochrom *c*, das im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist, ein Importweg vorgeschlagen, an dem zwar der TOM-Komplex beteiligt ist, aber nicht über den von Tom40 gebildeten Importkanal erfolgt (Diekert et al., 2001). Folglich scheinen manche mitochondrialen Vorstufenproteine vom TOM-Komplex auf eine Art und Weise importiert zu werden, die sich vom Importweg der überwiegenden Mehrheit mitochondrialer Vorstufenproteine unterscheidet.

Diese Hypothese deckt sich mit einem kürzlich erschienenen Bericht über die Insertion von Außenmembranproteinen in Chloroplasten. Darin wurde beschrieben, dass die Insertion des Modellaußenmembranproteins OEP14 durch die Hauptkomponente des TOC-Komplexes, Toc75, bewerkstelligt wird (Tu et al., 2004). Darüber hinaus schlugen Tu *et al.* vor, dass für die Bindung von Vorstufenproteinen mit Signalsequenz bzw. von Vorstufen von Außenmembranproteinen zwei verschiedene Stellen von Toc75 verantwortlich sind. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den hier dargestellten Beobachtungen überein. Daher scheint die Fähigkeit der Poren-bildenden Komponente der Translokasen endosymbiontischer Organellen, verschiedene Importwege in interne Kompartimente oder die Außenmembran zu vermitteln, eine evolutionär konservierte Funktion zu sein.

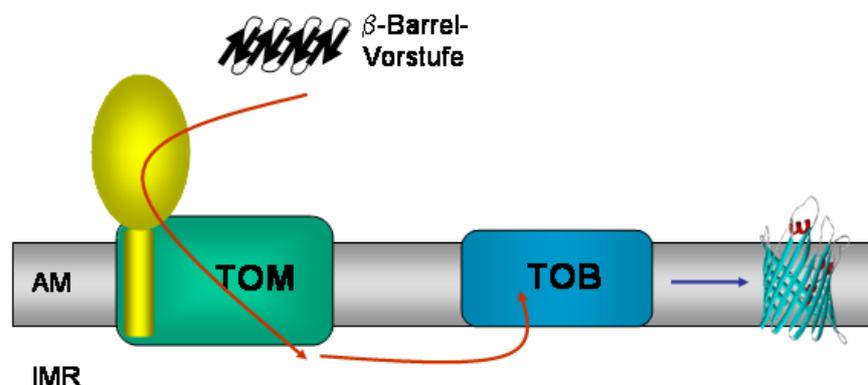
Die Frage, ob Vorstufen von Außenmembranproteinen durch laterales Öffnen des TOM-Kanals in die Lipiddoppelschicht der Membran eingebaut werden, ist immer noch unklar (Gabriel et al., 2001; Johnson und Jensen, 2004). Neue Erkenntnisse legen nahe, dass  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine über die generelle Importpore des TOM-Komplexes in den Intermembranraum transportiert werden, bevor sie mit Hilfe des TOB-Komplexes in die Außenmembran eingebaut werden (Johnson und Jensen, 2004; Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Daher findet kein laterales Öffnen des TOM-Kanals während der Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen statt. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Vermutung, dass auch der Import von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne vermutlich nicht über laterales Öffnen der generellen Importpore des TOM-Komplexes erfolgt.

### **4.3. Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des TOB-Komplexes**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Proteinkomplex in der mitochondrialen Außenmembran identifiziert und charakterisiert, der verschieden vom TOM-Komplex ist und für den Import und die Assemblierung der  $\beta$ -Barrel-Außenmembranproteine essenziell ist. Tob55 (auch Sam50/Omp85 genannt), welches selbst ein  $\beta$ -Barrel-Protein ist, bildet die zentrale Komponente dieses TOB (SAM)-Komplexes, der die Vorstufenproteine vom TOM-Komplex übernimmt und anschließend deren Einbau in die mitochondriale Außenmembran vermittelt (Gentle et al., 2004; Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003). Diese Ergebnisse ändern die Sichtweise, wie Proteine in einer Organellenmembran sortiert werden. Bislang wurde angenommen, dass die Translokasen nicht nur die Translokation von

Vorstufenproteinen vermitteln, sondern auch für deren korrektes Sortieren und ihre richtige Assemblierung verantwortlich sind (Herrmann und Neupert, 2000; Rapaport, 2002). Jedoch ist für die Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine mit komplizierterer Topologie, wie z. B. den  $\beta$ -Barrel-Proteinen, der TOM-Komplex nicht ausreichend, sondern es wird ein weiterer oligomerer Proteinkomplex benötigt, so dass zwei große essenzielle Membranproteinkomplexe aufeinander folgend agieren.

Mitochondriale  $\beta$ -Barrel-Proteine stammen evolutionär von  $\beta$ -Barrel-Proteinen der bakteriellen Außenmembran ab (Gray et al., 1999). Angesichts der vielfältigen Erfordernisse für die Faltung und Assemblierung dieser Vorstufenproteine scheint es möglich, dass mitochondriale  $\beta$ -Barrel-Proteine auf eine evolutionär konservierte Art und Weise importiert werden. In Bakterien werden  $\beta$ -Barrel-Proteine von der periplasmatischen Seite in die Außenmembran eingebaut (Schulz, 2002). Dabei spielt Omp85 in *Neisseria meningitidis* eine entscheidende Rolle (Voulhoux et al., 2003). Diese Hypothese basiert auf der Akkumulation von  $\beta$ -Barrel-Intermediaten im Periplasma von Omp85-defizienten Zellen (Voulhoux et al., 2003). Allerdings wurde Omp85 auch eine Funktion beim Lipidexport zugeschrieben (Genevrois et al., 2003). Die Sequenzähnlichkeit von Tob55 zu den offensichtlich ubiquitär vorkommenden Omp85-artigen Proteinen gram-negativer Bakterien (Voulhoux et al., 2003) ist im Fall von *Rickettsia prowazekii* besonders hoch (Paschen et al., 2003). Letzteres gehört zu den  $\alpha$ -Proteobakterien, welche vermutlich die evolutionären Vorfahren der Mitochondrien sind (Gray et al., 1999). Nicht nur die Struktur, sondern auch die Topologie und Funktion der bakteriellen Omp85 Maschinerie könnten im TOB-Komplex konserviert sein. Demnach müssten  $\beta$ -Barrel-Vorstufen in Mitochondrien auch von der Innenseite der Außenmembran präsentiert werden (Abb. 40).



**Abb. 40. Modell für die evolutionär konservierte Biogenese mitochondrialer  $\beta$ -Barrel-Proteine.** Das  $\beta$ -Barrel-Vorstufenprotein wird nach seiner Synthese im Cytosol auf der mitochondrialen Oberfläche zunächst von Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes erkannt. Anschließend wird es durch den von Tom40 gebildeten Importkanal zur Intermembranraumseite transportiert, von wo aus es mit Hilfe des TOB-Komplexes in die mitochondriale Außenmembran eingebaut wird.

Folglich müssen die Vorstufenproteine zunächst die Außenmembran mittels des TOM-Komplexes überqueren. Anschließend interagieren sie mit den von den kleinen Tim-Komponenten gebildeten 70 kDa Tim9-Tim10- bzw. Tim8-Tim13-Komplexen, welche die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zum TOB-Komplex weiterleiten (Habib et al., 2005; Hoppins und Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004). In Abwesenheit der 70 kDa Komplexe ist diese Weitergabe der Vorstufen vom TOM- zum TOB-Komplex verzögert. Allerdings scheinen die Komplexe der „kleinen“ Tim-Proteine für diesen Transfer nicht essenziell zu sein, da z. B. in Mitochondrien ohne den Tim8-Tim13-Komplex die endogenen Mengen an  $\beta$ -Barrel-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp nicht verringert sind (Hoppins und Nargang, 2004). Eine Funktion der Tim9-Tim10- bzw. Tim8-Tim13-Komplexe könnte darin bestehen, die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vor Missfaltung und Aggregation zu schützen bis diese vom TOB-Komplex in die Außenmembran inseriert werden. Damit könnten die Komplexe der „kleinen“ Tim-Proteine im Intermembranraum die gleiche Aufgabe wie die periplasmatischen Chaperone Skp und SurA gram-negativer Bakterien erfüllen, die vermutlich nicht nur die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vor Missfaltung und Aggregation schützen, sondern auch deren Faltung in eine insertionskompetente Konformation unterstützen (Eppens et al., 1997; Kleinschmidt, 2003).

#### **4.4. Die Rolle von Tob38 bei der Biogenese von $\beta$ -Barrel-Proteinen der mitochondrialen Außenmembran**

Bei der Suche nach neuen Komponenten des TOB-Komplexes wurde Tob38 identifiziert, welches eine essenzielle Rolle bei der Biogenese von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinen spielt. Tob38 (auch Sam35/Tom38 genannt) bildet zusammen mit Mas37 und dem in die Membran eingebetteten Tob55 den TOB-Komplex in der mitochondrialen Außenmembran (Ishikawa et al., 2004; Milenkovic et al., 2004; Waizenegger et al., 2004). Tob38 scheint auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Mitochondrien als ein peripheres Membranprotein in Assoziation mit Tob55 lokalisiert zu sein. Eine Rolle von Mas37 als Ankerprotein ist aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: Erstens ist Mas37 selbst nur peripher mit der Außenmembran assoziiert (Ryan et al., 1999). Zweitens ist die Interaktion von Tob38 mit Mas37 weniger stabil als die Tob38-Tob55 Interaktion und drittens sind die Tob38-Mengen in  $\Delta mas37$ -Zellen nur moderat reduziert. Tob55 ist ein offensichtlicher Kandidat für diese Verankerungsrolle, da Tob38 stark an Tob55 gebunden ist und die Mengen an Tob38 in Tob55-depletierten Zellen stark verringert sind.

Eine kürzlich erschienene Analyse der Expressionsmengen aller Hefeproteine gibt einige Hinweise über die Stöchiometrie der verschiedenen Komponenten im TOB-Komplex. In dieser Studie wurden Tob38 und Mas37 ungefähr in einem molaren Verhältnis von 1:1 gefunden (1470 bzw. 1580 Moleküle pro Zelle), wohingegen die Anzahl an Tob55 Molekülen pro Zelle nicht bestimmt werden konnte (Ghaemmaghami et al., 2003). Folglich könnte eine Kopie Tob38 pro Komplex vorhanden sein, da ein Molekül Mas37 pro TOB-Komplex vorgeschlagen wurde (Wiedemann et al., 2003).

Was sind die Funktionen der drei Komponenten des TOB-Komplexes? Tob55 ist evolutionär stark konserviert und kann eine Pore in Lipidmembranen bilden. Deshalb könnte es für die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine verantwortlich sein. Die  $\beta$ -Faltblätter könnten in dem von Tob55 gebildeten Kanal in ihre native bzw. beinahe native Konformation falten und anschließend lateral in die Lipidphase der Außenmembran entlassen werden. Folglich könnte der TOB-Komplex als ein Anfinsen-Käfig betrachtet werden, in dem die  $\beta$ -Barrel-Membranproteine falten können (Ellis, 1996). Die laterale Freisetzung der gefalteten Vorstufenproteine aus der Kavität in die Lipidschicht ist aber fraglich, da strukturerhaltende Wasserstoffbrücken der  $\beta$ -Barrel-Struktur von Tob55 gelöst werden müssten (Schulz, 2003). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Teile von Tob55 dabei helfen, die geordnete Struktur der Lipidphase der Außenmembran vorübergehend aufzuheben, um damit die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zu ermöglichen. Die Funktion von Mas37 ist bisher unklar. Die Deletion des Proteins ist in Hefe nur bei höheren Temperaturen letal (Gratzer et al., 1995). Demnach könnte es eher eine stabilisierende als eine katalytische Rolle im Komplex erfüllen.

Tob38 ist im Gegensatz zu Mas37 essenziell für die Funktion des TOB-Komplexes. Zusammen mit dem in die Membran eingebetteten Tob55 bildet Tob38 einen aktiven TOB-Kernkomplex in Abwesenheit von Mas37. Die Depletion von Tob38 führt zu stark verringerten Mengen an Tob55 und Mas37. Ein Komplex von Mas37 und Tob55 in Abwesenheit von Tob38 konnte nicht detektiert werden. Folglich ist Tob38 für die Stabilität und Assemblierung des TOB-Komplexes notwendig.

Die Lokalisierung von Tob38 an der Oberfläche der Mitochondrien ergibt die Möglichkeit weiterer Funktionen des Proteins. Es könnte für Interaktionen des TOB-Komplexes mit cytosolischen Chaperonen verantwortlich sein, welche die  $\beta$ -Barrel-Proteine vor ihrer Interaktion mit dem TOM-Komplex in einer Import-kompetenten Konformation halten. Nach der Translokation durch den TOM-Komplex werden die  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine zum TOB-Komplex transferiert (Abb. 40). Tob38 könnte an der Ausbildung einer transienten Assoziation dieser beiden Komplexe beteiligt sein und dabei den

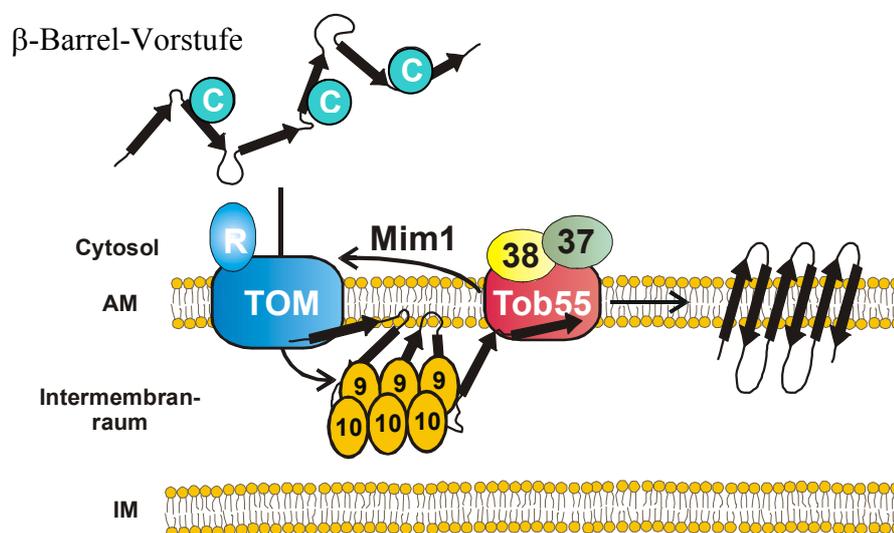
Transfer von Vorstufenproteinen erleichtern. Da die von Tob55 gebildete Pore vermutlich am Membraneinbau von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen beteiligt ist, könnte Tob38 auch als Regulator dieser Pore fungieren. Für ein besseres Verständnis der Funktion von Tob38 wird eine genaue Aufschlüsselung des Importweges von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen notwendig sein.

#### **4.5. Die Funktion von Mim1 bei der Assemblierung des TOM-Komplexes**

TOM-Komplexe werden nicht *de novo* gebildet, sondern entstehen durch Einbau von neu synthetisierten Tom-Untereinheiten in bereits vorhandene TOM-Komplexe. Folglich muss das Tom40-Vorstufenprotein nach seinem Membraneinbau durch den TOB-Komplex mit anderen Tom-Komponenten zur Bildung funktioneller TOM-Komplexe assemblieren. Mim1 (auch Tom13 genannt) wurde in dieser Arbeit als eine Komponente mit entscheidender Bedeutung in der Biogenese des TOM-Komplexes charakterisiert. Ursprünglich wurde Mim1 als essenzielles Protein beschrieben (Giaever et al., 2002), allerdings konnte gezeigt werden, dass es nur für das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen essenziell ist (Ishikawa et al., 2004). Der von uns hergestellte *mim1*-Null-Stamm wuchs jedoch bei 30°C sogar auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wohingegen bei 37°C auf YPG-Platten kein Wachstum mehr beobachtet wurde (nicht gezeigt). Mim1 unterstützt die Assemblierung des TOM-Komplexes. Die Biogenese anderer  $\beta$ -Barrel-Proteine enthaltender Komplexe in der Außenmembran, wie z. B. der TOB-Komplex und Porin-Komplexe, war bei Abwesenheit von Mim1 nicht beeinträchtigt. Die Mim1 benötigten Schritte in der Assemblierung des TOM-Komplexes liegen nach der vom TOB-Komplex abhängigen Insertion von Tom40 in die Außenmembran (Abb. 41). Allerdings ist bisher unklar ob die Ablösung von Tom40 vom TOB-Komplex, seine Oligomerisierung oder ein anderer Schritt, wie die Assemblierung der kleinen Tom Proteine oder von Tom22 von Mim1 kontrolliert wird.

Mim1 ist keine Komponente des TOM-Komplexes, sondern scheint eher katalytisch zu wirken. Wie Mim1 dies bewerkstelligt ist im Augenblick noch unklar. Ein besonderes Merkmal des Proteins ist das eher ungewöhnliche Muster der Sequenzkonservierung. Unter verschiedenen verwandten Pilzen ist die Konservierung der das Transmembransegment flankierenden hydrophilen Sequenzen überraschend niedrig. Gleichzeitig ist die Sequenz der Transmembranregion stark konserviert. Dies ist ein ungewöhnliches Muster, da in den meisten Membranproteinen die Transmembranregionen nur wenig konserviert sind. Dies könnte für eine spezifische und entscheidende Funktion des Transmembransegments in der

Funktion des Proteins sprechen. Mim1 könnte zum Beispiel integrale Membransegmente von nicht vollständig assemblierten Tom40 Untereinheiten abschirmen und damit deren Aggregation und anschließenden proteolytischen Abbau verhindern. Diese mit einem Membran-Chaperon vergleichbare potentielle Funktion von Mim1 könnte notwendig sein, da Tom40 alleine in Membranen nicht stabil zu sein scheint. Frühere Experimente haben eine Tendenz eines Tom40-Subkomplexes, welcher durch Ablösen der anderen Komponenten vom isolierten TOM-Komplex erhalten wurde, zur Aggregation gezeigt (Ahting et al., 2001). Eine andere Funktion von Mim1 könnte darin bestehen, nicht oder teilweise assembliertes Tom40 in einer kompetenten Form für die Assemblierung mit den kleinen Tom-Proteinen und mit Tom22 zu halten.



**Abb. 41. Biogenese von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinen, insbesondere von Tom40.** Die  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine werden nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen durch Interaktionen mit Chaperonen (C) vor Aggregation geschützt. Auf der mitochondrialen Oberfläche werden sie von Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes erkannt und anschließend über den von Tom40 gebildeten Importkanal zur Intermembranraumseite transportiert. Dort werden sie mit Hilfe der von den kleinen Tim-Komponenten gebildeten Tim9-Tim10- bzw. Tim8-Tim13-Komplexe zum TOB-Komplex weitergeleitet, welcher für ihren Einbau in die Außenmembran verantwortlich ist. Im Falle von Tom40 ist für dessen anschließende Assemblierung in den TOM-Komplex Mim1 notwendig.

Mdm10, welches für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie notwendig ist (Sogo und Yaffe, 1994), wurde kürzlich als weitere Komponente des TOB-Komplexes vorgeschlagen und spielt eine Rolle bei der Biogenese des TOM-Komplexes (Meisinger et al., 2004). Dieses Protein scheint ebenfalls für die Assemblierung von Tom40 mit anderen Tom-Komponenten nach dem Membraneinbau des Vorstufenproteins durch den TOB-Komplex notwendig zu sein. Mim1 und Mdm10 agieren daher an ähnlichen Stellen des

Importweges des Tom40-Vorstufenproteins. Bisher konnte ich allerdings keine direkte Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen finden.

Eine weitere detaillierte Untersuchung des Assemblierungsweges des TOM-Komplexes wird für die Aufklärung der genauen Funktion von Mim1 notwendig sein. Insbesondere sollten frühe Schritte der Ablösung von Tom40 vom TOB-Komplex charakterisiert werden und die Bildung von Tom40-Oligomeren sowie ihre Interaktionen mit den anderen Komponenten des TOM-Komplexes müssen aufgeklärt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die mitochondriale Außenmembran beherbergt eine Vielzahl an Proteinen, die anhand ihrer Topologie in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biogenese von zwei Klassen untersucht. Die erste besitzt eine hydrophile cytosolische Domäne und ist über eine Transmembrandomäne im N-terminalen Bereich in der Membran verankert. Dieser N-terminale Bereich enthält die Signalsequenz dieser Proteine und dient gleichzeitig als Membrananker, weshalb er als Signal-Anker-Domäne bezeichnet wird. Zu dieser Proteinklasse gehören die beiden Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes, Tom20 und Tom70, und in *S. cerevisiae* das Protein OM45 mit bisher unbekannter Funktion.

Zur Bestimmung der Bedeutung der Signal-Anker-Domäne für die Funktion des jeweiligen Proteins bzw. zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung dieses Sequenzabschnittes wurde ein Komplementationsansatz benutzt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Signal-Anker-Domänen mitochondrialer Außenmembranproteine funktionell austauschbar sind. Folglich spielen sie für die spezifische Funktion des Proteins nur eine untergeordnete Rolle, sind allerdings für den Transport zu den Mitochondrien und für die Verankerung in der Außenmembran von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren konnte ich die strukturellen Elemente bestimmen, die zusammen mit der Ankerdomäne das topogene Signal bilden. Eine moderate Hydrophobizität der Transmembrandomäne scheint am wichtigsten zu sein, um diese Proteine zu Mitochondrien zu dirigieren. Eine positive Nettoladung in beiden flankierenden Regionen der Transmembrandomäne erhöht die Effizienz des Transports zu den Mitochondrien und die Membraneinbaurate, ist aber keine essenzielle strukturelle Eigenschaft dieses Signals.

Zusätzlich zur Charakterisierung der Signal-Anker-Domänen wurde der Importmechanismus dieser Proteinklasse untersucht. Dieser ist gemäß unserer Ergebnisse nicht von den bekannten Importrezeptoren, Tom20 und Tom70, abhängig, benötigt aber sehr wohl die zentrale Tom-Komponente Tom40. Im Gegensatz zu Vorstufen von Proteinen interner mitochondrialer Kompartimente und von  $\beta$ -Barrel-Proteinen der Außenmembran scheinen die Vorstufen von Proteinen mit einer Signal-Anker-Domäne nicht über den von Tom40 gebildeten Kanal importiert zu werden. Höchstwahrscheinlich werden diese Proteine durch andere Teile von Tom40 erkannt und anschließend an der Protein-Lipid-Interphase in die Membran eingebaut.

Die zweite untersuchte Proteinklasse der mitochondrialen Außenmembran sind die  $\beta$ -Barrel-Proteine, welche über mehrere antiparallele  $\beta$ -Faltblätter in der Membran verankert sind. Diese Proteine sind neben Mitochondrien in der Außenmembran von Chloroplasten und gram-negativen Bakterien zu finden. Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Biogenese mitochondrialer  $\beta$ -Barrel-Proteine bekannt. Wir konnten zeigen, dass diese Proteinklasse über einen evolutionär konservierten Weg in Mitochondrien importiert wird.  $\beta$ -Barrel-Proteine werden zunächst mit Hilfe des TOM-Komplexes zur Intermembranraumseite transportiert. Von dort werden sie durch einen zweiten oligomeren Proteinkomplex, den TOB-Komplex, in die Außenmembran eingebaut. Als erste Tob-Komponente konnten wir das essenzielle Protein Tob55 identifizieren und charakterisieren. Es kann eine Pore in Lipidmembranen bilden und könnte folglich für die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen in die Außenmembran verantwortlich sein. Mas37 wurde ebenfalls als Bestandteil dieses Komplexes beschrieben. Auf der Suche nach weiteren Komponenten konnte ich Tob38 mit Tob55 zusammen reinigen. Tob38 ist wie Tob55 essenziell für das Wachstum von Hefezellen und für die Funktion des TOB-Komplexes. Es ist auf der Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert. Tob38 interagiert mit Mas37 und Tob55 und ist auch in Abwesenheit von Mas37 mit Tob55 assoziiert. Der Tob38-Tob55 Kernkomplex bindet Vorstufen von  $\beta$ -Barrel-Proteinen und ermöglicht deren Einbau in die Außenmembran. Die Depletion von Tob38 führt zu stark verringerten Mengen an Tob55 und Mas37 und die verbleibenden Proteine bilden keinen Komplex mehr. Der Import von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen in Tob38-depletierte Mitochondrien ist stark beeinträchtigt, wohingegen andere Außenmembranproteine oder Proteine anderer mitochondrialer Subkompartimente mit gleicher Effizienz wie in Wildtyp-Organellen importiert werden. Demnach besitzt Tob38 eine äußerst wichtige und spezifische Funktion bei der Biogenese von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinen. Es könnte für die Stabilität und Assemblierung des TOB-Komplexes notwendig sein oder an der Ausbildung einer transienten Assoziation zwischen dem TOM- und dem TOB-Komplex beteiligt sein und dabei den Transfer von Vorstufenproteinen erleichtern. Andererseits könnte Tob38 auch als Regulator der von Tob55 gebildeten Pore fungieren.

Mim1 konnte im Rahmen dieser Arbeit als eine weitere am Import bzw. der Assemblierung des  $\beta$ -Barrel-Proteins Tom40 beteiligte Komponente charakterisiert werden. Die Depletion von Mim1 führt zu stark verringerten Mengen an assembliertem TOM-Komplex und zur Akkumulation von Tom40 als niedermolekulare Spezies. Wie alle mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteine werden die Vorstufen von Tom40 durch den TOB-Komplex in die Außenmembran eingebaut. Mim1 wird höchstwahrscheinlich nach diesem

TOB-abhängigen Schritt benötigt. Aufgrund der starken Konservierung im Bereich des Transmembransegments von Mim1 beim Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Pilze könnte das Protein als eine Art Membran-Chaperon fungieren. Dabei könnte Mim1 notwendig sein, um nicht oder teilweise assembliertes Tom40 in einer kompetenten Form für die Assemblierung mit den kleinen Tom-Proteinen und mit Tom22 zu halten. Mim1 ist weder eine Komponente des TOM-Komplexes noch des TOB-Komplexes, sondern scheint vielmehr Bestandteil eines weiteren, bisher nicht charakterisierten Komplexes zu sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Mim1 eine spezifische und unverzichtbare Rolle bei der Assemblierung des TOM-Komplexes spielt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., und Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., und Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 153, 1151-1160.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., und Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 147, 959-968.
- Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 48-53.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., *et al.* (2000). OPA1, encoding dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.
- Allen, R., Egan, B., Gabriel, K., Beilharz, T., und Lithgow, T. (2002). A conserved proline residue is present in the transmembrane-spanning domain of Tom7 and other tail-anchored protein subunits of the TOM translocase. *FEBS Lett* 514, 347-350.
- Armstrong, L. C., Saenz, A. J., und Bornstein, P. (1999). Metaxin 1 interacts with metaxin 2, a novel related protein associated with the mammalian mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem* 74, 11-22.
- Baker, K. P., Schaniel, A., Vestweber, D., und Schatz, G. (1990). A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature* 348, 605-609.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G., und Pratje, E. (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet* 245, 272-278.
- Bauer, M. F., Hofmann, S., Neupert, W., und Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: role of TIM complexes. *Trends Cell Biol* 10, 25-31.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., und Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 87, 33-41.

- Bay, D. C., und Court, D. A. (2002). Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochem Cell Biol* 80, 551-562.
- Biederer, T., Volkwein, C., und Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in the ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278, 1806-1809.
- Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523 issn: 0301-5610.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1496-1500.
- Bloom, H., H., B., und Gross, H. S. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., und Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., und Lithgow, T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J* 14, 6318-6326.
- Borgese, N., Colombo, S., und Pedrazzini, E. (2003). The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J Cell Biol* 161, 1013-1019.
- Brachat, A., Liebundguth, N., Rebischung, C., Lemire, S., Scharer, F., Hoepfner, D., Demchyshyn, V., Howald, I., Dusterhoft, A., Mostl, D., *et al.* (2000). Analysis of deletion phenotypes and GFP fusions of 21 novel *Saccharomyces cerevisiae* open reading frames. *Yeast* 16, 241-253.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braun, H. P., und Schmitz, U. K. (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* 209, 267-274.
- Brix, J., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22 and Tom70. *J Biol Chem* 272, 20730-20735.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., und Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70

- in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* 274, 16522-16530.
- Cervený, K. L., McCaffery, J. M., und Jensen, R. E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DNM1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell* 12, 309-321.
- Court, D. A., Kleene, R., Neupert, W., und Lill, R. (1996). Role of the N- and C-termini of porin in import into the outer membrane of *Neurospora* mitochondria. *FEBS Lett* 390, 73-77.
- Cyr, D. M., Stuart, R. A., und Neupert, W. (1993). A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 268, 23751-23754.
- Daum, G., Bohni, P. C., und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13028-13033.
- Davis, A. J., Ryan, K. R., und Jensen, R. E. (1998). Tim23p contains separate and distinct signals for targeting to mitochondria and insertion into the inner membrane. *Mol Biol Cell* 9, 2577-2593.
- Davis, A. J., Sepuri, N. B., Holder, J., Johnson, A. E., und Jensen, R. E. (2000). Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol* 150, 1271-1282.
- De Kroon, A. I. P. M., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., und De Kruijff, B. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1325, 108-116.
- De Kroon, A. I. P. M., Koorengel, M. C., Goerdayal, S. S., Mulders, P. C., Janssen, M. J., und De Kruijff, B. (1999). Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* 16, 205-211.
- Dekker, P. J. T., Martin, F., Maarse, A. C., Bömer, U., Müller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., und Pfanner, N. (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J* 16, 5408-5419.
- Dekker, P. J. T., Müller, H., Rassow, J., und Pfanner, N. (1996). Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol Chem* 377, 535-538.

- Dekker, P. J. T., Ryan, M. T., Brix, J., Müller, H., Hönlinger, A., und 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.
- Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nargang, F. E., Neupert, W., und Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 276, 17679-17685.
- Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.
- Diekert, K., de Kroon, A. I. P. M., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B., und Lill, R. (2001). Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J* 20, 5626-5635.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., und Lill, R. (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11752-11757.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P. J. T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M., und Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 388, 195-200.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M. F., Neupert, W., und Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* 101, 401-412.
- Dower, W. J., Miller, J. F., und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli*. *Nucl Acid Res* 16, 6127-6145.
- Eilers, M., und Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* 322, 228-232.
- Ellis, R. J. (1996). Revisiting the Anfinsen cage. *Fold Des* 1, 9-15.
- Emtage, J. L., und 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., und Kohda, D. (2002). Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1592, 3-14.
- Endo, T., Yamamoto, H., und Esaki, M. (2003). Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* 116, 3259-3267.

- Endres, M., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* 18, 3214-3221.
- Epand, R. M., Hui, S.-W., Argan, C., Gillespie, L. L., und Shore, G. C. (1986). Structural analysis and amphiphilic properties of a chemically synthesized mitochondrial signal peptide. *J Biol Chem* 261, 10017-10020.
- Eppens, E. F., Nouwen, N., und Tommassen, J. (1997). Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J* 16, 4295-4301.
- Esaki, M., Shimizu, H., Ono, T., Yamamoto, H., Kanamori, T., Nishikawa, S. I., und Endo, T. (2004). Mitochondrial protein import: Requirement of the presequence elements and TOM components for precursor binding to the TOM complex. *J Biol Chem* 279, 45701-45707.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W., und Stuart, R. A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 15, 479-487.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., und Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to ER. *J Cell Biol* 93, 97-102.
- Gabriel, K., Buchanan, S. K., und Lithgow, T. (2001). The alpha and beta: protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. *Trends Biochem Sci* 26, 36-40.
- Gabriel, K., Egan, B., und Lithgow, T. (2003). Tom40, the import channel of the mitochondrial outer membrane, plays an active role in sorting imported proteins. *EMBO J* 22, 2380-2386.
- Gärtner, F., Bomer, U., Guiard, B., und Pfanner, N. (1995a). The sorting signal of cytochrome b(2) promotes early divergence from the general mitochondrial import pathway and restricts the unfoldase activity of matrix Hsp70. *EMBO J* 14, 6043-6057.
- Gärtner, F., Voos, W., Querol, A., Miller, B. R., Craig, E. A., Cumsky, M. G., und Pfanner, N. (1995b). Mitochondrial import of subunit Va of cytochrome c oxidase characterized with yeast mutants - Independence from receptors, but requirement for matrix Hsp70 translocase function. *J Biol Chem* 270, 3788-3795.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N., und Rehling, P. (2002). The mitochondrial

- presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* *111*, 507-518.
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J. J., und van der Ley, P. (2003). The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J* *22*, 1780-1789.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., und Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* *164*, 19-24.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., und Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* *425*, 737-741.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* *418*, 387-391.
- Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A., und Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acid Res* *20*, 1425.
- Glick, B. S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R. L., und Schatz, G. (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* *69*, 809-822.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R. E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S. D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G., und Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol* *129*, 25-34.
- Gray, M. W., Burger, G., und Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* *283*, 1476-1481.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A., und Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* *567*, 96-102.
- Habib, S. J., Vasiljev, A., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Multiple functions of tail-anchor domains of mitochondrial outer membrane proteins. *FEBS Lett* *555*, 511-515.
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem* *280*, 6434-6440.
- Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T., und Mihara, K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J* *13*, 5146-5154.

- Hahne, K., Haucke, V., Ramage, L., und Schatz, G. (1994). Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments. *Cell* 79, 829-839.
- Hamajima, S., Sakagushi, M., Mihara, K., Ono, S., und Sato, R. (1988). Both amino- and carboxyterminal portions are required for insertion of yeast porin into the outer mitochondrial membrane. *J Biochem (Tokyo)* 104, 362-367.
- Hammen, P. K., Gorenstein, D. G., und Weiner, K. (1996). Amphiphilicity determines binding properties of three mitochondrial presequences to lipid surface. *Biochemistry* 35, 3772-3781.
- Harkness, T. A., Nargang, F. E., van der Klei, I., Neupert, W., und Lill, R. (1994). A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol* 124, 637-648.
- Harlow, E., und Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hartl, F. U., und Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G., und Lithgow, T. (1996). The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *EMBO J* 15, 1231-1237.
- Haucke, V., Lithgow, T., Rospert, S., Hahne, K., und Schatz, G. (1995). The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. *J Biol Chem* 270, 5565-5570.
- Hawltschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U., und Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53, 795-806.
- He, S., und Fox, T. D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* 8, 1449-1460.
- Heim, R., und Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6, 178-182.

- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., und Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the novel N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W., und 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., und Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3, 210-214.
- Herrmann, J. M., Neupert, W., und Stuart, R. A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear encoded Oxa1p. *EMBO J* 16, 2217-2226.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., und Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395, 516-521.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brüttsch, H., und Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J* 9, 3191-3200.
- Hines, V., und Schatz, G. (1993). Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p. *J Biol Chem* 268, 449-454.
- Hochuli, E. (1988). Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* 444, 293-302.
- Holroyd, C., und Erdmann, R. (2001). Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett* 501, 6-10.
- Honlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J* 15, 2125-2137.
- Hoppins, S. C., und Nargang, F. E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 279, 12396-12405.
- Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., und Mihara, K. (2002). Characterization of signal that directs C-tail-anchored proteins to mammalian mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 13, 1615-1625.
- Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., und Mihara, K. (2003). Targeting and assembly of mitochondrial tail-anchored protein Tom5 to the TOM complex depend on a signal distinct from that of tail-anchored proteins dispersed in the membrane. *J Biol Chem* 278, 41462-41471.

- Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schönfeld, H.-J., Schatz, G., und Azem, A. (1997). Sequential action of two Hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J* 16, 1842-1849.
- Horwich, A. L., Kalousek, F., Mellmann, I., und Rosenberg, L. E. (1985). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J* 4, 1129-1135.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., und O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B., und Schatz, G. (1984). The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett* 178, 306-310.
- Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Opplinger, W., und Schatz, G. (1985). The first twelve amino acids (less than half of the presequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. *EMBO J* 4, 2061-2068.
- Isenmann, S., Khew-Goodall, Y., Gamble, J., Vadas, M., und Wattenberg, B. W. (1998). A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. *Mol Biol Cell* 9, 1649-1660.
- Ishikawa, D., Yamamoto, H., Tamura, Y., Moritoh, K., und Endo, T. (2004). Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly. *J Cell Biol* 166, 621-627.
- Iwahashi, J., Yamazaki, S., Komiya, T., Nomura, N., Nishikawa, S., Endo, T., und Mihara, K. (1997). Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. *J Biol Chem* 272, 18467-18472.
- Jarvis, J. A., Ryan, M. T., Hoogenraad, N. J., Craik, D. J., und Hoj, R. B. (1995). Solution structure of the acetylated and noncleavable mitochondrial targeting signal of rat chaperonin 10. *J Biol Chem* 270, 1323-1331.
- Jensen, R. E., und 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.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., und Stuart, R. A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* 22, 6438-6447.

- Jiang, X., und Wang, X. (2004). Cytochrome *c*-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73, 87-106.
- Johnson, A. E., und Jensen, R. E. (2004). Barreling through the membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11, 113-114.
- Kaldi, K., Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., und Brunner, M. (1998). Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *EMBO J* 17, 1569-1576.
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M., und Mihara, K. (2000). Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 151, 277-288.
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., und Pfanner, N. (1990). Requirement for Hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-143.
- Kassenbrock, C. K., Cao, W., und Douglas, M. G. (1993). Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J* 12, 3023-3034.
- Keil, P., und Pfanner, N. (1993). Insertion of MOM22 into the mitochondrial outer membrane strictly depends on surface receptors. *FEBS Lett* 321, 197-200.
- Keil, P., Weinzierl, A., Kiebler, M., Dietmeier, K., Söllner, T., und Pfanner, N. (1993). Biogenesis of the mitochondrial receptor complex. Two receptors are required for binding of MOM38 to the outer membrane surface. *J Biol Chem* 268, 19177-19180.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., und Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 139, 1663-1675.
- Kerscher, O., Sepuri, N. B., und Jensen, R. E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 11, 103-116.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I., Pfanner, N., und Neupert, W. (1993). The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* 74, 483-492.
- Kleinschmidt, J. H. (2003). Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 60, 1547-1558.

- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: More tags and improved practical routines. *Yeast* *15*, 963-972.
- Knox, C., Sass, E., Neupert, W., und Pines, O. (1998). Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast. *J Biol Chem* *273*, 25587-25593.
- Knudsen, K. A. (1985). Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal Biochem* *147*, 285-288.
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J., und Schatz, G. (1998). Import of Mitochondrial Carriers Mediated by Essential Proteins of the Intermembrane Space. *Science* *279*, 369-373.
- Koehler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T., und Schatz, G. (1999a). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 2141-2146.
- Koehler, C. M., Merchant, S., und Schatz, G. (1999b). How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* *24*, 428-432.
- Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., und Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* *20*, 1187-1193.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G., und Mihara, K. (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: Evidence for the "Acidic Chain" hypothesis. *EMBO J* *17*, 3886-3898.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C., und 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.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M. T., Meisinger, C., Kassenbrock, C. K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M. G., Neupert, W., Nargang, F. E., *et al.* (2001). Biogenesis of the major mitochondrial outer membrane protein porin involves a complex import pathway via receptors and the general import pore. *J Cell Biol* *152*, 289-300.
- Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P. J., Blom, J., Meijer, M., und Pfanner, N. (1994). The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett* *349*, 222-228.

- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., und Dalbey, R. E. (2003). The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* 13, 510-516.
- Künkele, K.-P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., und Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009-1019.
- Kuroda, R., Ikenoue, T., Honsho, M., Tsujimoto, S., Mitoma, J., und Ito, A. (1998). Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. *J Biol Chem* 273, 31097-31102.
- Kyshe-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-207.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafontaine, D., und Tollervey, D. (1996). One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 24, 3469-3471.
- Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W., und Stuart, R. A. (1999). The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem* 274, 20937-20942.
- Leuenberger, D., Bally, N. A., Schatz, G., und Koehler, C. M. (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J* 18, 4816-4822.
- Lill, R., und Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trend Biochem Sci* 25, 352-356.
- Lithgow, T., Glick, B. S., und Schatz, G. (1995). The protein import receptor of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 20, 98-101.
- Lithgow, T., Junne, T., Wachter, C., und Schatz, G. (1994). Yeast mitochondria lacking the two import receptors Mas20p and Mas70p can efficiently and specifically import precursor proteins. *J Biol Chem* 269, 15325-15330.
- Lohret, T. A., Jensen, R. E., und Kinnally, K. W. (1997). Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J Cell Biol* 137, 377-386.

- Mannella, C. A., Neuwald, A. F., und Lawrence, C. E. (1996). Detection of likely beta-strand regions in sequences of mitochondrial pore proteins using the Gibbs sampler. *J Bioenerg Biomemb* 28, 163-169.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., und Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* 3, 159-164.
- Martin, J., Mahlke, K., und Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. *J Biol Chem* 266, 18051-18057.
- Matouschek, A., Pfanner, N., und Voos, W. (2000). Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep* 1, 404-410.
- Mayer, A., Driessen, A., Neupert, W., und Lill, R. (1995a). Purified and protein-loaded mitochondrial outer membrane vesicles for functional analysis of preprotein transport. *Methods Enzymol* 260, 252-263.
- Mayer, A., Lill, R., und Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol* 121, 1233-1243.
- Mayer, A., Neupert, W., und Lill, R. (1995b). 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, M. P. (2004). Timing the catch. *Nat Struct Mol Biol* 11, 6-8.
- McBride, H. M., Millar, D. G., Li, J. M., und Shore, G. C. (1992). A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 119, 1451-1457.
- Meier, S., Neupert, W., und Herrmann, J. M. (2004). Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J Biol Chem* 280, 7777-7785.
- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L. K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Yaffe, M. P., *et al.* (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* 7, 61-71.
- Meisinger, C., Ryan, M. T., Hill, K., Model, K., Lim, J. H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H. E., Wagner, R., und Pfanner, N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol* 21, 2337-2348.

- Meisinger, C., Sommer, T., und Pfanner, N. (2000). Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem* 287, 339-342.
- Melton, D., Krieg, P., Rebagliati, M., Maniatis, T., Zinn, K., und Green, M. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl Acid Res* 12, 7035-7056.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem* 279, 22781-22785.
- Millar, D. G., und Shore, G. C. (1994). Mitochondrial Mas70p signal anchor sequence. Mutations in the transmembrane domain that disrupt dimerization but not targeting or membrane insertion. *J Biol Chem* 269, 12229-12232.
- Miller, B. R., und Cumsky, M. G. (1993). Intramitochondrial sorting of the precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit Va. *J Cell Biol* 121, 1021-1029.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A. P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W. T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* 118, 31-44.
- Moczko, M., Bömer, U., Kübrich, M., Zufall, N., Hönlinger, A., und Pfanner, N. (1997). The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. *Mol Cell Biol* 17, 6574-6584.
- Moczko, M., Dietmeier, K., Sollner, T., Segui, B., Steger, H. F., Neupert, W., und Pfanner, N. (1992). Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 310, 265-268.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K. N., Pfanner, N., und Ryan, M. T. (2001). Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Biol* 8, 361-370.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol* 316, 657-666.
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W., und Hell, K. (2003a). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J* 22, 816-825.

- Mokranjac, D., Sichtung, M., Neupert, W., und Hell, K. (2003b). Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J* 22, 4945-4956.
- Mori, M., und Terada, K. (1998). Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta* 1403, 12-27.
- Mühlenhoff, U., und Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459, 370-382.
- Murakami, H., Pain, D., und Blobel, G. (1988). 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 107, 2051-2057.
- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., und Herrmann, J. M. (2002). The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 277, 12846-12853.
- Nargang, F. E., Rapaport, D., Ritzel, R. G., Neupert, W., und Lill, R. (1998). Role of the negative charges in the cytosolic domain of TOM22 in the import of precursor proteins into mitochondria. *Mol Cell Biol* 18, 3173-3181.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66, 863-917.
- Neupert, W., und Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 555-565.
- Niedenthal, R., Riles, L., Guldener, U., Klein, S., Johnston, M., und Hegemann, J. H. (1999). Systematic analysis of *S. cerevisiae* chromosome VIII genes. *Yeast* 15, 1775-1796.
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., und Hartl, F.-U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with Hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 341, 125-130.
- Paschen, S. A., und Neupert, W. (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52, 101-112.
- Paschen, S. A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M. F., Neupert, W., und 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., und Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866.

- Pelham, H. R. B., und Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67, 247-256.
- Pfaller, R., Steger, H. F., Rassow, J., Pfanner, N., und Neupert, W. (1988). Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common insertion site. *J Cell Biol* 107, 2483-2490.
- Pfanner, N., und Chacinska, A. (2002). The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim Biophys Acta* 1592, 15-24.
- Pfanner, N., und Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 339-349.
- Pfanner, N., Tropschug, M., und Neupert, W. (1987). Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell* 49, 815-823.
- Pfanner, N., und Wiedemann, N. (2002). Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol* 14, 400-411.
- Puccio, H., und Koenig, M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 9, 887-892.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T., und Schatz, G. (1993). Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J* 12, 4115-4123.
- Rapaport, D. (2002). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci* 26, 191-197.
- Rapaport, D. (2003). How to find the right organelle - Targeting signals in mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO Rep* 4, 948-952.
- Rapaport, D., Mayer, A., Neupert, W., und Lill, R. (1998). Cis and trans sites of the TOM complex in unfolding and initial translocation of preproteins. *J Biol Chem* 273, 8806-8813.
- Rapaport, D., und Neupert, W. (1999). Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* 146, 321-331.
- Rapaport, D., Taylor, R. D., Kaeser, M., Langer, T., Neupert, W., und Nargang, F. E. (2001). Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol Biol Cell* 12, 1189-1198.
- Rassow, J., Harmey, M. A., Muller, H. A., Neupert, W., und Tropschug, M. (1990). Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for the mitochondrial precursor protein of the beta-subunit of F1-ATPase from *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* 18, 4922.

- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I. B., Pfanner, N., und Tropschug, M. (1995). Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Mol Cell Biol* 15, 2654-2662.
- Rehling, P., Brandner, K., und Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 519-530.
- Reichert, A. S., und Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Robinson, C., Thompson, S. J., und Woolhead, C. (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic* 2, 245-251.
- Roise, D., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., und Schatz, G. (1986). A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *EMBO J* 5, 1327-1334.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., Allison, D. S., und Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J* 7, 649-653.
- Rose, M. D., Winston, F., und Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B. S., und Schatz, G. (1996). Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J* 15, 764-774.
- Ryan, M. T., Muller, H., und Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 274, 20619-20627.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, CSH Laboratory Press).
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283, 1488-1493.
- Schägger, H., Cramer, W. A., und von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217, 220-230.
- Schatz, G. (1997). Just follow the acid chain. *Nature* 388, 121-122.
- Schleiff, E., Silvius, J. R., und Shore, G. C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J Cell Biol* 145, 973-978.

- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N., und Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J Biol Chem* 269, 11893-11901.
- Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W., und Court, D. A. (1996). Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J Biol Chem* 271, 17890-17895.
- Schlossmann, J., und Neupert, W. (1995). Assembly of the preprotein receptor MOM72/MAS70 into the protein import complex of the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 270, 27116-27121.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogl, B., Go, N. E., Nargang, F. E., Neupert, W., und Nussberger, S. (2005). Role of TOM5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 14499-14506.
- Schneider, H., Sollner, T., Dietmeier, K., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Trulzsch, B., Neupert, W., und Pfanner, N. (1991). Targeting of the master receptor MOM19 to mitochondria. *Science* 254, 1659-1662.
- Schneider, H.-C., Westermann, B., Neupert, W., und Brunner, M. (1996). The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *EMBO J* 15, 5796-5803.
- Schnell, D. J., und Hebert, D. N. (2003). Protein translocons. Multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112, 491-505.
- Schulz, G. E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1565, 308-317.
- Schulz, G. E. (2003). Transmembrane beta-barrel proteins. *Adv Protein Chem* 63, 47-70.
- Schwartz, M. P., und Matouschek, A. (1999). The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13086-13090.
- Shore, G. C., McBride, H. M., Millar, D. G., Steenaart, N. A. E., und Nguyen, M. (1995). Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur J Biochem* 227, 9-18.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R. S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., und Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W., und Brunner, M. (1998). Zinc finger-like proteins Tim10/Mrs11p and Tim12/Mrs5p mediating import of carrier proteins into mitochondria. *Nature* 391, 912-915.
- Sogo, L. F., und Yaffe, M. P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 130, 1361-1373.
- Soll, J., und Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 198-208.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N., und Neupert, W. (1989). MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* 59, 1061-1070.
- Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W., und Pfanner, N. (1992). Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature* 355, 84-87.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nussberger, S., Neupert, S., und Rapaport, D. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J* 19, 4895-4902.
- Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23, 2239-2250.
- Stein, I., Peleg, Y., Even-Ram, S., und Pines, O. (1994). The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14, 4770-4778.
- Stuart, R. A., und Neupert, W. (1996). Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 21, 261-267.
- Suzuki, H., Maeda, M., und Mihara, K. (2002). Characterization of rat TOM70 as a receptor of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Sci* 115, 1895-1905.
- Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A., und 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., und Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* 22, 6448-6457.
- Taylor, S. W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G. M., Warnock, D. E., Wiley, S., Murphy, A. N., Gaucher, S. P., Capaldi, R. A., Gibson, B. W., *et al.* (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* 21, 281-286.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 267-271.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y. M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Truscott, K. N., Brandner, K., und Pfanner, N. (2003a). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13, R326-R337.
- Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N., und 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., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Müller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., *et al.* (2003b). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol* 163, 707-713.
- Tu, S. L., Chen, L. J., Smith, M. D., Su, Y. S., Schnell, D. J., und Li, H. M. (2004). Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. *Plant Cell* 16, 2078-2088.
- Ungermann, C., Neupert, W., und Cyr, D. M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266, 1250-1253.
- van den Brink-van der Laan, E., Dalbey, R. E., Demel, R. A., Killian, J. A., und de Kruijff, B. (2001). Effect of nonbilayer lipids on membrane binding and insertion of the catalytic domain of leader peptidase. *Biochemistry* 40, 9677-9684.
- van Wilpe, S., Ryan, M. T., Hill, K., Maarse, A. C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P. J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., *et al.* (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., *et al.* (2004). Reconstituted TOM core complex and

- Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol Biol Cell* *15*, 1445-1458.
- von Heijne, G., Stepphun, J., und Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* *180*, 535-545.
- Voos, W., von Ahsen, O., Muller, H., Guiard, B., Rassow, J., und Pfanner, N. (1996). Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *EMBO J* *15*, 2668-2677.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M., und Tommassen, J. (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* *299*, 262-265.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., und Philippsen, P. (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1065-1075.
- Waizenegger, T., Habib, S. J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S. A., Hell, K., Neupert, W., und Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* *5*, 704-709.
- Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep* *6*, 57-62.
- Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem* *278*, 42064-42071.
- Waltner, M., und Weiner, H. (1995). Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* *270*, 26311-26317.
- Wattenberg, B., und Lithgow, T. (2001). Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* *2*, 66-71.
- Westermann, B., und Neupert, W. (2003). 'Omics of the mitochondrion'. *Nat Biotechnol* *21*, 239-240.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfish, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* *424*, 565-571.

- Wiedemann, N., Pfanner, N., und 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., und 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* 279, 18188-18194.
- Wimley, W. C. (2003). The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13, 404-411.
- Yaffe, M. P., Jensen, R. E., und Guido, E. C. (1989). The major 45-kDa protein of the yeast mitochondrial outer membrane is not essential for cell growth or mitochondrial function. *J Biol Chem* 264, 21091-21096.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., und 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., Terada, K., und Mori, M. (2003). AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. *J Cell Biol* 163, 45-56.
- Yoon, Y., und McNiven, M. A. (2001). Mitochondrial division: New partners in membrane pinching. *Curr Biol* 11, 67-70.
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J., und Hartl, F.-U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112, 41-50.
- Youngman, M. J., Hobbs, A. E., Burgess, S. M., Srinivasan, M. und Jensen, R.E. (2004). Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol* 164, 677-688.

## 7. Abkürzungen

$\alpha$	Anti
Abb.	Abbildung
a. E.	arbiträre Einheiten
Ai	Assemblierungsintermediat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AIP	Arylhydrokarbon-Rezeptor-interagierendes Protein
Alb3	Albino3
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNGE	Blaue Nativgelelektrophorese
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Chaperon
C-	Carboxy-
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CNBr	Cyanbromid
COX	Cytochrom Oxidase
cyt	cytosolische Domäne
Cyt	Cytosol
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
f	Fragment
5-FOA	5-Fluor-Orotsäure
GFP	grünfluoreszierendes Protein

GIP	generelle Import-/Insertionspore
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazino-N'-2-ethansulfonsäure
His <sub>7</sub>	heptamerer His-Anhang
His <sub>8</sub>	oktamerer His-Anhang
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMP	Innenmembranpeptidase
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- $\beta$ ,D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Mim	<u>M</u> itochondrialer <u>I</u> mport
Mit	Mitochondrien
MOPS	3-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
MSF	<u>m</u> itochondrialen <u>I</u> mport <u>s</u> timulierender <u>F</u> aktor
mt	mitochondrial
N-	Amino-
<i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmunserum
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidenfluorid
r. E.	relative Einheiten
<i>R.n.</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
Sam	Protein des SAM-Komplexes
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat
<i>S.p.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
Su9	Untereinheit 9 der F <sub>0</sub> -Untereinheit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TMD	Transmembrandomäne
Tob	Protein des TOB-Komplexes
TOB	Topogenese von mitochondrialen Außenmembran-β-Barrel-Proteinen ( <i>topogenesis of mitochondrial outer membrane β-barrel proteins</i> )
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
U	enzymatische Einheiten ( <i>units</i> )
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
v/v	Volumen pro Volumen
Var.	Variante
VDAC	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>

w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildty

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

Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem* 278, 42064-42071.

Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., und Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866.

Waizenegger, T., Habib, S. J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S. A., Hell, K., Neupert, W., und Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* 5, 704-709.

Ahting, U.\* , Waizenegger, T.\* , Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 48-53.

Waizenegger, T.\* , Schmitt, S.\* , Zivkovic, J., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep* 6, 57-62.

Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 6434-6440.

Schmitt, S., Prokisch, H., Schlunk, T., Camp, D. G. 2nd, Ahting, U., Waizenegger T., Scharfe, C., Meitinger, T., Imhof, A., Neupert, W., Oefner, P. J., und Rapaport, D. (2005). Proteome analysis of mitochondrial outer membrane from *Neurospora crassa*. *Proteomics*, *in press*.

Waizenegger, T., und Rapaport, D. (2005). Analyzing import intermediates of mitochondrial proteins by blue native gel electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, *in Vorbereitung*.

\*Diese Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

## **Danksagung**

Am Ende meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei einigen Leuten bedanken, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Sehr herzlich möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die schöne Zeit an seinem Institut danken, während der ich viele Dinge lernen durfte. Außerdem bin ich ihm für seine fortwährende Unterstützung sowie seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft dankbar.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Jürgen Soll für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie.

Von Herzen danke ich meinem Betreuer PD Dr. Doron Rapaport, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine vielfältigen Ideen und Anregungen, sowie seine konstruktive Kritik und Offenheit trugen ganz maßgeblich zur erfolgreichen Zusammenarbeit und zum Gelingen dieser Arbeit bei. Für die Freiheit, meine Ideen zu verwirklichen, bin ich ihm sehr dankbar. Des Weiteren möchte ich ihm und seiner Frau für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken, wann immer sie notwendig war.

Frau Petra Heckmeyer danke ich für ihre gute Arbeit. Ohne ihre Mithilfe hätten manche Projekte nicht so schnell erfolgreich beendet werden können.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen jetzigen Kollegen Shukry, Jelena, Patricia, Christian Kemper, Agathe, Simone, Martin und Christian Kozany sowie bei meinen ehemaligen Kolleginnen Tina und Andreja bedanken. Sie haben alle zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen und für viele schöne Erlebnisse sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors gesorgt.

Frau Döge, Frau Hauck und Frau Farsen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Verwaltungsangelegenheiten.

Mein Dank gilt weiterhin allen Leuten aus der Werkstatt, der Spülküche und dem Tierstall, die mir die Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Ein großer Dank gilt dem Boehringer Ingelheim Fonds und allen seinen Mitarbeitern für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Biochemie-Studium ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich meiner Frau Nina für ihre fortwährende Unterstützung danken. Sie hat mir immer wieder vor Augen geführt, dass man trotz mancher Rückschläge niemals aufgeben sollte.

## Lebenslauf

### Thomas Waizenegger

10.02.1975	Geboren in Ochsenhausen
1981-1984	Besuch der Grundschule in Hürbel
1984-1985	Besuch der Grundschule in Gutenzell
1985-1994	Besuch des Gymnasiums Ochsenhausen
1994	Abitur
10/1994-09/1995	Studium Höheres Lehramt Mathematik/Chemie an der Universität Ulm
10/1995-08/2001	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/1999-03/2000	Sechs Forschungspraktika in verschiedenen Arbeitsgruppen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und an der Ludwig-Maximilians-Universität München
12/2000-08/2001	Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Günther Jung an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen am Institut für Organische Chemie: „Entwicklung niedermolekularer Peptidvakzine mittels fluoreszenzbasierter Methoden“
10/2001-03/2002	Zivildienst am Institut für Klinische Chemie der Universität Ulm
04/2002-07/2002	Zivildienst am Institut für Humangenetik der Technischen Universität München am Klinikum Rechts der Isar
seit 08/2002	Dissertation im Labor von Prof Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, unterstützt durch den Boehringer Ingelheim Fonds.

## **Ehrenwörtliche Versicherung:**

Ich, Thomas Waizenegger, versichere, dass die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Des Weiteren habe ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 04.05.05

Thomas Waizenegger