

1. Einleitung

In der eukaryontischen Zelle sind die verschiedenen Stoffwechselwege durch Kompartimentierung in Zellorganellen räumlich voneinander getrennt. Organellen wie das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, Lysosomen und Peroxisomen sind von einer einzelnen Membran begrenzt. Der Kern, Mitochondrien und Chloroplasten sind jeweils von einer doppelten Lipidmembran umgeben. Allen Organellen ist gemeinsam, dass Proteine, die in das Kompartiment eingebracht werden sollen, über die Membranen befördert werden müssen. Diese Funktion wird von Proteintranslokasen erfüllt.

1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien stammen von aeroben α -Proteobakterien ab, die vor ca. 1,5 Milliarden Jahren von einer Eukaryonten-Vorläuferzelle aufgenommen wurden (Endosymbiontentheorie; Gray *et al.*, 1999). Sie entstehen nicht *de novo*, sondern vermehren sich durch Wachstum, Fusion und Teilung bereits vorhandener Organellen. Mitochondrien sind neben dem Zellkern und den ebenfalls von bakteriellen Vorläufern abstammenden Chloroplasten die einzigen Zellorganellen, die DNA enthalten. Im Lichtmikroskop stellen sich Mitochondrien in der Regel fadenförmig dar, wobei Zelltyp-abhängige Unterschiede festgestellt werden können.

Es werden vier mitochondriale Kompartimente unterschieden: die Außenmembran, der Intermembranraum, die Innenmembran sowie die mitochondriale Matrix. Während die Außenmembran für Ionen und kleine Metabolite permeabel ist, stellt die Innenmembran eine Diffusionsbarriere dar, ohne die der Aufbau eines Membranpotentials und damit die oxidative Phosphorylierung nicht möglich wären. Ionen und Metabolite gelangen über spezifische Transporter in die mitochondriale Matrix. Die innere Membran der Mitochondrien enthält die für die Adenosin-5'-Triphosphat-Gewinnung (ATP) notwendigen Proteinkomplexe der Atmungskette, deren Homologe sich auch in eu-bakteriellen Plasmamembranen nachweisen lassen. In Zellen mit hohem Energiebedarf ist eine Einfaltung der Innenmembran zur Oberflächenvergrößerung zu beobachten, sogenannten Cristae-Membranen, in denen hauptsächlich die Komplexe der Atmungskette lokalisiert sind. Der

Proteingehalt der Außenmembran ist im Vergleich zur Innenmembran gering. Die Abstammung der mitochondrialen Außenmembran ist bisher nicht eindeutig zu belegen, jedoch enthält sie β -Barrel-Proteine, deren Homologe nur in Außenmembranen von Gram-negativen Bakterien und Chloroplasten vorkommen (Wimley, 2003). Zu der Gruppe der β -Barrel-Proteine gehören die Porine. Weitere in der Außenmembran identifizierte Proteine sind Untereinheiten der Proteintranslokasen, Enzyme der Lipidsynthese sowie Proteine, die für die Morphologie der Mitochondrien eine Rolle spielen.

Mitochondrien enthalten Enzyme für eine Reihe von Stoffwechselwegen, wie den Fettsäureabbau, die Pyrimidin-, Nukleotid- und Häm-Biosynthese, die Lipidsynthese, den Harnstoffzyklus und die Assemblierung von Eisen/Schwefel-Clustern (Scheffler, 2001). Zudem spielen Mitochondrien eine Rolle im zellulären Kalziumhaushalt und in Signalkaskaden des oxidativen Stresses und der Apoptose (Bernardi *et al.*, 2001; Gibson, 2005; Kuwana und Newmeyer, 2003).

Entsprechend der vielfältigen Funktionen der Mitochondrien in der Zelle werden mittlerweile viele Krankheiten mit mitochondrialen Fehlfunktionen assoziiert. Eine schwerwiegende Störung ist die mangelnde Bereitstellung von ATP, welche zu degenerativen Erkrankungen von Muskel- und Nervengewebe führen kann (DiMauro und Schon, 2003). Desweiteren wird ein Zusammenhang zwischen mitochondrialen Veränderungen und Alterung sowie Krebs diskutiert (Kang und Hamasaki, 2005). Sowohl Mutationen im Kern-Genom als auch Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) können zu mitochondrialen Erkrankungen führen.

Der größte Teil der genetischen Information der Mitochondrien wurde nach der Aufnahme des Endosymbionten in den Zellkern transferiert. Die mitochondriale DNA ist meist ringförmig wie in Bakterien, es wurden aber auch lineare DNA-Moleküle beschrieben (Nosek *et al.*, 1998). Die Replikation, die Transkription sowie die Translation der mtDNA finden in der mitochondrialen Matrix statt, obwohl fast alle der dafür benötigten Proteine im Kern kodiert sind und in die Mitochondrien importiert werden müssen. In Proteomstudien wurde gezeigt, dass Mitochondrien von *S. cerevisiae* ca. 1000 verschiedene Proteine enthalten (Prokisch *et al.*, 2004; Sickmann *et al.*, 2003). Die Kern-kodierten Proteine werden nach ihrer Translation im

Cytosol von Proteintranslokasen spezifisch erkannt und in die mitochondrialen Subkompartimente importiert.

1.2 Mitochondriale Proteintranslokasen

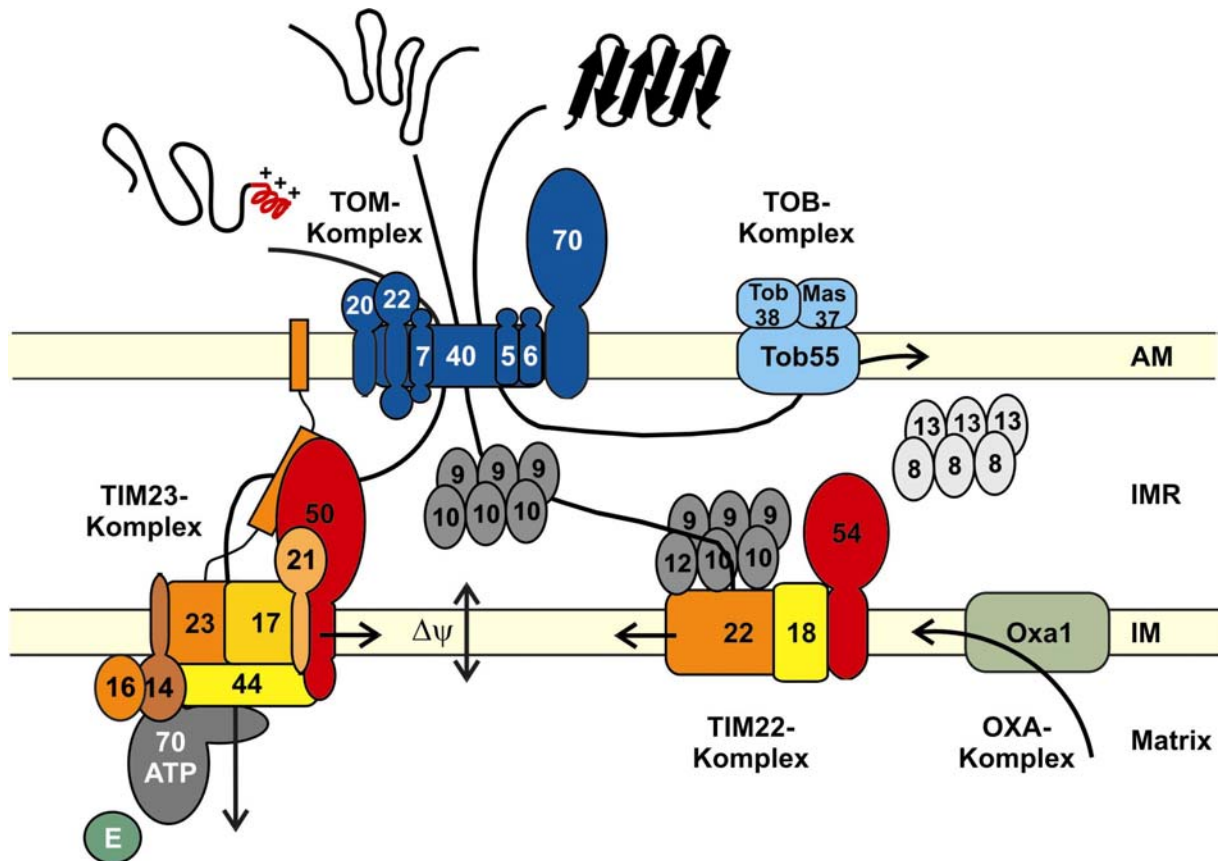


Abb. 1: Mitochondriale Proteintranslokasen

Der TOM-Komplex vermittelt die Insertion von Proteinen mit einer α -helikalen Transmembrandomäne in die Außenmembran sowie die Translokation von Proteinen in den Intermembranraum. Von hier aus werden β -Barrel-Proteine über den TOB-Komplex in die Außenmembran inseriert. Der TIM23-Komplex vermittelt die Translokation von Präproteinen mit N-terminaler Signalsequenz in die Matrix sowie die Insertion von Proteinen in die Innenmembran. Der TIM22-Komplex ermöglicht die Membranintegration von hydrophoben Innenmembranproteinen. Der Export von nukleär und mitochondrial kodierten Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran erfolgt über den OXA-Komplex. Die Ziffern der Tom- und Tim-Proteine stehen für die relativen molekularen Massen. 70, mtHsp70; AM, Außenmembran; E, Mge1; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran (erweiterte Abbildung aus Paschen und Neupert, 2001).

Die für den Import in Mitochondrien bestimmten Proteine tragen Signalsequenzen, die einen spezifischen Transport ermöglichen. Zur Verhinderung von Aggregation werden die Vorstufenproteine auf dem Weg zur Organelle von cytosolischen Chaperonen gebunden (Young *et al.*, 2004). Es sind mittlerweile fünf mitochondriale Proteintranslokasen bekannt (Abb. 1). Der TOM-Komplex (translocase of the outer

mitochondrial membrane) in der Außenmembran erkennt spezifisch alle in die Mitochondrien zu importierenden Proteine (Neupert, 1997). Desweiteren vermittelt der TOM-Komplex die Insertion von Außenmembranproteinen, die einzelne Transmembran-Helices besitzen (Waizenegger *et al.*, 2003). β -Barrel-Proteine werden zunächst über den TOM-Komplex transloziert und dann mittels des TOB-Komplexes (topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins) in die Außenmembran inseriert (Paschen *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2003). Proteine, die für die Matrix oder die Innenmembran bestimmt sind, werden über den TIM23-Komplex oder den TIM22-Komplex (translocases of the inner mitochondrial membrane) über die Innenmembran befördert oder in diese inseriert. Mitochondrial kodierte Membranproteine sowie einige im Kern kodierte Innenmembranproteine werden über den OXA-Komplex (oxidase assembly) in die Membran integriert (Hell *et al.*, 2001).

1.3 Der TOM-Komplex

Die Translokase der Außenmembran wurde bereits in mehreren Organismen untersucht. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, *S.c.*) sind sieben Tom-Untereinheiten bekannt, sechs davon weisen Homologe in *Neurospora crassa* (*N. crassa*, *N.c.*) auf (Neupert, 1997). Die TOM-Komplexe in *S. cerevisiae* und *N. crassa* besitzen eine molekulare Masse von jeweils ca. 500 kDa. Die Rezeptoruntereinheiten Tom70 und Tom20 sind nur lose mit einem sogenannten Core-Komplex bestehend aus Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 assoziiert (Neupert, 1997; Ryan *et al.*, 2000). Beide Rezeptoren exponieren hydrophile Domänen in das Cytosol. Tom70 ist für die Erkennung von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz verantwortlich. Proteine mit internem Importsignal werden von Tom20 erkannt. Die Funktion der beiden Rezeptoren scheint redundant zu sein, da erst die Deletion beider Untereinheiten letal für den Organismus ist (Ramage *et al.*, 1993). Nach der Bindung der zu importierenden Proteine an die Rezeptoruntereinheiten werden sie nach gegenwärtigem Kenntnisstand über Tom22 an die von Tom40 ausgebildete Pore weitergeleitet (van Wilpe *et al.*, 1999). Tom40 faltet in eine β -Faltblatt-Struktur, die wahrscheinlich die Translokationspore ausbildet. Die Pore selbst ist Kationen-selektiv, wobei die Selektivität allein von Tom40 bestimmt wird (Ahting *et al.*, 2001; Künkele *et al.*, 1998a). Tom6 bindet sowohl an

Tom40 als auch an Tom22 und scheint die Interaktion dieser beiden Proteine zu vermitteln (Alconada *et al.*, 1995; Dembowski *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2001). Für Tom7 konnte eine Funktion in der Assemblierung des Komplexes nachgewiesen werden (Hönlinger *et al.*, 1996; Model *et al.*, 2001). Tom5 wurde bisher nur in *S. cerevisiae* beschrieben. Es wurde eine Rezeptor-ähnliche Funktion von Tom5 bei der Weitergabe von Vorstufenproteinen von Tom22 auf Tom40 sowie eine Funktion in der Tom40-Assemblierung in den TOM-Komplex postuliert (Dietmeier *et al.*, 1997; Model *et al.*, 2001). Keine der kleinen Tom-Komponenten ist essentiell für das Wachstum von Hefe, nur die Deletion von Tom5 führt zu einem Wachstumsphänotyp (Dietmeier *et al.*, 1997; Hönlinger *et al.*, 1996).

Erste Informationen zum strukturellen Aufbau des TOM-Komplexes konnten mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie einer 3D-Rekonstitution bei einer Auflösung von 25 Å gewonnen werden. Der TOM-Komplex sowohl aus *N. crassa* als auch aus *S. cerevisiae* wies in elektronenmikroskopischen Bildern Partikel mit zwei und drei Poren auf. In einer 3-D-Rekonstitution von *N. crassa* TOM-Komplex konnte gezeigt werden, dass die mit Kontrastmittel gefüllten Poren durchgängige Kanäle darstellen. Die Poren des *Neurospora* und des Hefe TOM-Komplexes besitzen einen Durchmesser von jeweils 2,1 - 2,5 nm (Ahting *et al.*, 1999; Künkele *et al.*, 1998a; Model *et al.*, 2002). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von isoliertem Tom40 zeigten Partikel mit einer Pore (Ahting *et al.*, 2001). Die Ausbildung eines Kanals durch gereinigtes Tom40 konnte auch in elektrophysiologischen Messungen nachgewiesen werden (Ahting *et al.*, 2001).

Die Antriebskraft der Translokation von Proteinen über den TOM-Komplex ist bisher nur wenig verstanden. Nach dem *Acid-chain*-Modell, das mittlerweile zum *Binding chain*-Modell erweitert wurde, werden Präproteine zunächst mit geringer Affinität an die cytosolischen Domänen von Tom70, Tom20 und Tom22 gebunden, deren Oberfläche die *cis*-Bindungsstelle der Translokase ausbilden (Endo und Kohda, 2002; Meisinger *et al.*, 2001). Die entfalteten Proteinanteile im TOM-Kanal werden möglicherweise während der Translokation von Tom40 stabilisiert, da *in vitro* eine Chaperon-ähnliche Funktion von Tom40 nachgewiesen wurde (Esaki *et al.*, 2003; Rapaport *et al.*, 1998). Die Bindung der Präsequenz an der Innenseite des TOM-Komplexes, der *trans*-Bindungsstelle, erfolgt mit höherer Affinität als an der *cis*-Seite.

Durch das Anwachsen der Affinität der Bindungsstellen zur Präsequenz wird ein gerichteter Import des Proteins ermöglicht und eine Entfaltung des Proteins erleichtert. Sind die importierten Proteine für den Intermembranraum bestimmt, so verhindert die Faltung zur nativen Konformation sowie die Inkorporation von Co-Faktoren einen retrograden Transport (Herrmann und Neupert, 2000). Der Weitertransport in oder über die Innenmembran erfolgt durch die Interaktion der Präproteine mit den Translokasen der Innenmembran (Endo *et al.*, 2003).

1.4 Der TOB-Komplex

Der TOB-Komplex wurde in der mitochondrialen Außenmembran von *S. cerevisiae* und *N. crassa* identifiziert. Bislang wurden in Hefe drei Untereinheiten beschrieben: Tob55, Tob38 und Mas37 (Ishikawa *et al.*, 2004; Kozjak *et al.*, 2003; Milenkovic *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2003; Waizenegger *et al.*, 2004). Tob55 bildet eine β -Barrel-Struktur aus und ist über diese in der Außenmembran verankert. Eine N-terminale Domäne ist im Intermembranraum lokalisiert. Gereinigtes Tob55 bildet einen Kanal, der in elektrophysiologischen Untersuchungen eine Leitfähigkeit von 3,7 nS aufwies und sich damit vom Tom40-Kanal und der von Porin ausgebildeten Pore unterschied (Paschen *et al.*, 2003). Tob38 und Mas37 sind auf der cytosolischen Seite mit Tob55 assoziiert, aber nicht in die Membran integriert. Der TOB-Komplex besitzt eine molekulare Masse von 220-250 kDa und vermittelt die Insertion von β -Barrel-Proteinen wie Tom40, Porin, Tob55 und Mdm10 in die Außenmembran.

1.5 Assemblierung des TOM-Komplexes

Die Tom-Untereinheiten werden wie alle Kern-kodierten Proteine über den TOM-Komplex in Mitochondrien importiert. Die Rezeptoren Tom70 und Tom20 sind mit N-terminalen Transmembrandomänen in der Membran verankert und assoziieren nach ihrer Membraninsertion nur lose mit dem TOM-Core-Komplex, der eine molekulare Masse von ca. 400 kDa aufweist. Tom22, Tom6 und Tom5 besitzen hingegen C-terminale Transmembrandomänen (Dietmeier *et al.*, 1997; Rapaport, 2002). In *in vitro* Importexperimenten mit *S. cerevisiae* Mitochondrien konnten keine Assemblierungsintermediate von Tom22, Tom7 und Tom5 nachgewiesen werden. Für Tom6 wurde neben der Assemblierung in den 400 kDa-Core-Komplex die

Ausbildung eines ca. 100 kDa großen Komplexes beschrieben (Model *et al.*, 2001). Da Tom40 eine teilweise Faltung zu β -Faltblättern aufweist, wird für seine Membranintegration eine Inserterase benötigt. Nach der Translokation von Tom40 über den TOM-Komplex führt die Interaktion mit dem TOB-Komplex zur Ausbildung eines 250 kDa-Intermediates (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003). Nach der TOB-Komplex vermittelten Insertion des Tom40 in die Außenmembran wird ein weiteres Intermediat von ca. 100 kDa beobachtet. Da in der Tom5-Deletionsmutante von *S. cerevisiae* die Ausbildung des 100 kDa-Komplexes unterbleibt, wird eine Beteiligung von Tom5 an der Formierung dieses Intermediats vermutet (Model *et al.*, 2001). Im letzten Schritt wird wahrscheinlich durch Rekrutierung von Tom6, Tom7 und Tom22 in den 100 kDa-Komplex der TOM-Core-Komplex maturiert. Dieser letzte Assemblierungsschritt ist noch weitgehend unverstanden (Model *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999).

1.6 Weitere Proteintranslokasen

Einige Untereinheiten der mitochondrialen Translokasen weisen prokaryontische Homologe auf. So gehören das mitochondriale Oxa1 ebenso wie das bakterielle YidC zur Alb3/Oxa1/YidC-Familie, deren Mitglieder in Mitochondrien, Chloroplasten, Eubakterien und Archaeobakterien zu finden sind (Kuhn *et al.*, 2003). Oxa1 bildet einen homooligomeren Komplex in der Innenmembran (Nargang *et al.*, 2002), der sowohl mitochondrial kodierte als auch Kern-kodierte Innenmembranproteine inseriert. Das bakterielle YidC vermittelt zusammen mit SecYEG die Insertion und Assemblierung von Plasmamembranproteinen (Veenendaal *et al.*, 2004). SecYEG ist die bakterielle Sec-Translokase und transloziert Proteine über oder in die Plasmamembran (de Keyzer *et al.*, 2003). Die Insertion von nicht SecYEG-abhängigen Plasmamembranproteinen wird vermutlich auch von YidC vermittelt. Die Translokationspore des Sec-Komplexes wird von SecY und SecE aufgebaut, die einen trimeren Komplex mit SecG ausbilden. Peripher assoziiert ist eine ATPase SecA, die als Motorprotein fungiert. Die Sec-Translokase ist evolutionär konserviert und ihre Homologen finden sich sowohl in Archaeobakterien als auch im Endoplasmatischen Retikulum der Eukaryonten.

Für die Poren-bildende Untereinheit Tob55 des kürzlich identifizierten TOB-Komplexes in der mitochondrialen Außenmembran konnte eine Homologie zu Proteinen der Außenmembran von Gram-negativen Bakterien sowie von Chloroplasten nachgewiesen werden. Beim mitochondrialen Tob55, dem bakteriellen Omp85 und dem Chloroplasten-Protein Toc75 handelt es sich jeweils um β -Barrel-Proteine (Bos und Tommassen, 2004). Für die Untereinheiten der mitochondrialen Translokasen TOM, TIM23 und TIM22 konnten bisher keine bakteriellen Homologen identifiziert werden.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis der Proteintranslokation über und in die mitochondriale Außenmembran zu verbessern. Hierzu sollten Einsichten in den strukturellen Aufbau des TOM-Komplexes mittels Proteinkristallographie gewonnen werden. Für die Röntgenstrukturanalyse eines Proteinkomplexes ist es hilfreich, sämtliche seiner Untereinheiten zu kennen. Die TOM-Komplexe in Pilzen sind weitgehend aus homologen Komponenten aufgebaut, jedoch waren in *S. cerevisiae* fünf Untereinheiten des TOM-Core-Komplexes beschrieben worden, in *N. crassa* hingegen nur vier. Daher sollte vor Beginn der Kristallisationsexperimente nach Tom5 im *Neurospora* TOM-Komplex gesucht und dieses, falls vorhanden, charakterisiert werden. In einem weiteren Ansatz sollte das Proteom der mitochondrialen Außenmembran von *N. crassa* erstellt werden, um weitere Komponenten der Proteintranslokation und Insertion zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme, Vermehrung und Lagerung

Bakterienstamm: XL1blue

Zur Amplifikation und Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm XL1blue verwendet. Die Vermehrung und Lagerung erfolgte immer in sterilen Plastikgefäßen. Für die Langzeitlagerung wurde 1 ml einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur mit 1 ml 87%igem Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Für die Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation) müssen Bakterien einer speziellen Vorbehandlung unterzogen werden. Zunächst wurden die Bakterien in einer 5 ml-Kultur angeimpft und nach mehreren Stunden Wachstums auf 37°C in eine 500 ml Kultur überführt. Nachdem die Kultur eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,4 erreicht hatte, wurden die Bakterien in Zentrifugenbecher gefüllt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen 15 Minuten bei 4°C und 1600 xg (3000 rpm, JA10-Rotor) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden wiederum für 15 Minuten bei 4°C und 1600 xg (3000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde in 20 ml 0,1 M $CaCl_2$ aufgenommen, mit 4 ml Glycerol gemischt und nochmals 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann in 500 µl-Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.1.3 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu 1 µg Plasmid-DNA wurden 100 µl Zellen gegeben, zu 10 µl Ligationsansatz 120 µl Bakterien. Die DNA-Bakterien-Mischung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und erneut 10 Minuten auf Eis gelagert.

Danach wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 30 bis 60 Minuten auf 37°C inkubiert, damit die Antibiotikumresistenz ausgebildet werden konnte. Die transformierten Bakterien wurden dann auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.4 Analytische Präparation von DNA

Zur Analyse von Bakterienklonen nach einer Transformation wurden je 3 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit je einem Bakterienklon von der Platte angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Von diesen Kulturen wurden je 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen 30 Sekunden bei 15.000 xg (13.000 rpm) in der Tischzentrifuge pelletiert. Die Bakterien wurden in je 200 µl P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase frisch zugeben; pH 8,0 mit HCl) resuspendiert und durch Zugabe von 400 µl P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) lysiert. Nach 5 Minuten wurde die Lyse durch die Zugabe von 300 µl P3 (3,1 M KAc, pH 5,5 mit Eisessig) gestoppt. Die Zelltrümmer wurden durch zehnmütige Zentrifugation bei 15.000 xg (13.000 rpm) pelletiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 900 µl Ethanol ausgefällt. Nach erneuter zehnmütiger Zentrifugation bei 15.000 xg (13.000 rpm) wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die getrockneten DNA-Pellets wurden in je 30 µl Wasser aufgenommen. Durch geeignete Restriktionsverdau und anschließende Agarosegelelektrophorese wurde die Plasmid-DNA auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.1.5 Plasmidreinigung aus *E. coli*

Für die Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden Midi-Säulen und Lösungen (E1-E6) der Firma Genomed (JETSTAR) verwendet. Es wurden 100 ml antibiotikumhaltiges Medium mit einem Bakterienklon angeimpft, über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und am folgenden Morgen bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die Plasmidpräparation verwendet, die nach den Angaben des Herstellers erfolgte. Die DNA-Pellets wurden in sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Zur

Kontrolle wurde jeweils ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA, RNA und Oligonukleotiden wurde spektrophotometrisch durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) bestimmt. Eine optische Dichte OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von:

50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA

40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotiden.

2.1.7 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde mit Enzymen und Puffern der Firma New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Ein analytischer Verdau wurde mit 1-4 μg Plasmid in einem Gesamtvolumen von 20 μl und ein präparativer Verdau mit 10 μg Plasmid in einem Gesamtvolumen von 50 μl angesetzt. Die Inkubationszeiten betragen zwei Stunden für einen analytischen Verdau und bis zu 16 Stunden für einen präparativen Verdau bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Für den präparativen Verdau von PCR-Produkten wurde der PCR-Ansatz (100 μl) zunächst durch die Zugabe von 10 μl 3 M NaAc, pH 4,8 und 200 μl Ethanol 15 Minuten bei -80°C gefällt, anschließend abzentrifugiert und mindestens zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 μl H_2O aufgenommen und in einem Endvolumen von 30 μl verdaut.

2.1.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA und von PCR-Produkten wurden horizontale 0,8-2,5%ige TAE-Agarosegele verwendet. Zur Agaroselösung wurden pro 100 ml Gel 8 μl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE (40 mM Tris/Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.5) verwendet.

Die zu analysierenden Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm² aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker (1 kb-Ladder, NEB) aufgetragen. Über interkalierendes Ethidiumbromid konnte die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mittels einer Kamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert werden.

2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden diese nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mit Puffern und Qiaquick-Säulen (Quiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

2.1.10 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels der Polymerasekettenreaktion

DNA-Fragmente wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) amplifiziert. Ein Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 2,5 U Taq-DNA-Polymerase, je 200 µM der Desoxynukleosid-5'-Triphosphate sowie je 50 pmol der beiden Primer im vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Als Matrize dienten 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA. Zum Denaturieren der Matrize wurde der Ansatz zunächst für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde ein dreiteiliger Zyklus, bestehend aus 30 Sekunden Denaturierung der DNA bei 96°C, 30 Sekunden Anlagern der Primer (Temperatur niedriger als die Schmelztemperatur der Primer) und 1-4 Minuten Synthese der DNA bei 72°C, 25-30 mal durchlaufen. Im letzten Schritt wurde während einer 10minütigen Inkubation bei 72°C die DNA-Synthese abgeschlossen.

2.1.11 Klonierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

DNA-Fragmente aus einem Restriktionsverdau und PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Isolierung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit II (Fa. Qiagen, Hilden) in steriles Wasser aufgenommen und zur Ligation verwendet. Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA (rekombinante DNA-Fragmente bzw. PCR-Produkte) erfolgte in 20 µl Reaktionsansätzen im molaren Verhältnis von

etwa 1:3. Ein Ligationsansatz enthielt 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C. 10 µl eines solchen Ligationsansatzes wurden für die Transformation verwendet.

2.1.13 Klonierte Konstrukte

pGEM-T-Tom5; pGEM-T-Tom5MM; pGEM-4-Mim1

2.1.14 Verwendete Oligonukleotide

T5up

5'-CGCg gatccCGACTTCCATATCAAAATGTTCCGG-3'

BamHI-Schnittstelle zur Klonierung von Tom5 in pGEM-4, 33bp

T5low

5'-CCCaagcttCGAATATTTAGAGAACCTTGCTAACGGC-3'

HindIII-Schnittstelle zur Klonierung von Tom5 in pGEM-4, 37 bp

T5MMlow

5'- CCCaagcttT TACATCATGA GAACCTTGCT AACGGCGTCG ATAACGAA -3'

Anfügen von 2 Methioninen am C-Terminus für Lysat, HindIII-Schnittstelle zur Klonierung von Tom5 in pGEM-4, 48 bp.

MIMup

5'- TTT gaa ttc ACC ATG TCC GCT GAG GAG ATA TCG AAC -3'

EcoRI-Schnittstelle zur Klonierung von Mim1 in pGEM-4, Kozack-Sequenz ACC, 36 bp

MIMlow

5'- TTT aag ctt TTA CAT CAT CTC CAA GCT GGT CAG CTC ATC CAA GTG ATC
ATC CAA -3'

HindIII-Schnittstelle zur Klonierung von Mim1 in pGEM-4, 2 zusätzliche Methionine
am C-terminus, 54 bp

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Lösungen für die Neurosporazucht

Vollmedium für Nährböden

Vogels	20 ml
Glycerol	10 ml
Zucker	10 g
Vitaminlösung	5 ml
Hefeextrakt	2,5 g
Kaseinhydrolysat	1 g

wurden auf einen Liter mit Wasser aufgefüllt. In einen 300 ml Kolben wurden 50 ml
Vollmedium und eine Spatelspitze Agar gegeben und die Kolben autoklaviert. Für die
einzelnen Mutanten wurden folgende Zusätze ins Medium gegeben:

T107:	10 ml Histidin (100x; 20 g auf 1 L)
<i>tom5</i> ^{RIP} :	1 ml Nicotinsäure (1000x; 10 g auf 1 L)
<i>tom5</i> ^{RIP} HT:	1 ml Nicotinsäure (1000x; 10 g auf 1 L)
LV-10-23:	1 ml Nicotinsäure (1000x; 10 g auf 1 L)

Vogels (50-fach konzentriert, 1 L (Vogel, 1964)

Na ₃ -Citrat-2H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄	100 g
NH ₄ NO ₃	100 g

MgSO ₄	10 g
CaCl ₂	5 g
Lösung von Spurenelementen	5 ml
Biotin-Lösung	2,5 ml

Biotin-Lösung

Ethanol	100 ml
H ₂ O	100 ml
Biotin	20 mg

Vitaminlösung (1 L in H₂O)

Vitamin B1	10 mg
Vitamin B2	5 mg
Vitamin B6	5 mg
Aminobenzoesäure	5 mg
Nicotinsäureamid	5 mg
Cholin-Hydrochlorid	100 mg
Folsäure	1 mg
Inositol	100 mg
Kalzium Pantothenat	50 mg

Lösung von Spurenelementen (1 L in H₂O)

Zitronensäure	50 g
Zinksulfat	50 g
Fe((NH ₄) ₂ SO ₄)	10 g
CuSO ₄	2,5 g
MnSO ₄ -/H ₂ O	0,5 g
H ₃ BO ₃ , wasserfrei	0,5 g
Na ₂ MoO ₄	0,5 g

2.2.2 Anzucht von *Neurospora crassa*

Zur Anzucht von *Neurospora crassa* wurden einige Körnchen vom Silikatstock des Stammes auf einen Nährboden gegeben. Der A-Kolben wurde 48 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert und danach für 120 Stunden bei Raumtemperatur ans Licht gestellt. Vom A-Kolben wurden die B-Kolben angeimpft, welche wiederum 48 Stunden im Dunkeln und 120 Stunden am Licht inkubiert wurden. Die Konidien der B-Kolben wurden in sterilem Wasser aufgenommen und im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert. Falls die Konidien nicht direkt verwendet werden sollten, wurden die Kolben abgedeckt im Kühlraum gelagert.

Eine 2 L-Flüssigkultur wurde mit den Konidien eines B-Kolben angeimpft und für ca. 16 Stunden in Vogel/2% Saccharose bei 25°C unter Luftzufuhr kultiviert. Für eine 100 L-Kultur wurde zunächst für sechs Stunden eine 8 L-Kultur aus 15 B-Kolben als Vorkultur angezogen, diese dann in 100 Liter überführt und nochmals 18 Stunden am Licht kultiviert.

2.2.3 Herstellung von *Neurospora crassa* Silikatstocks

Für die Herstellung von Silikatstocks wurde ein A-Kolben des Stammes angeimpft. Auf den bewachsenen Kolben wurden 10 ml sterile 10%ige Magermilchlösung gegeben und die Konidien durch vortexen vom Nährboden gelöst. Die Konidienmilchlösung wurde durch einen sterilen Wattefilter gegeben. 300 µl des Filtrats wurden mit ca. 1 g Silikat in einem verschraubbaren Glasröhrchen gemischt und für 3 Wochen im Exikator bei Raumtemperatur getrocknet. Die Silikatstocks wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in YP-Medium (Guthrie und Fink, 1991) bzw. SD-Medium bei 30°C und 37°C.

SD-Medium: 1,7 g Hefe-Stickstoff-Base und 5 g Ammoniumsulfat wurden auf 900 ml mit Wasser aufgefüllt, nach dem Autoklavieren wurden 100 ml 20% (w/v) Glucose zugesetzt. Von den Markersubstanzen wurden je nach Selektionsbedingungen je 2

ml Tryptophan und Histidin (10 g/L), bzw. je 3 ml Leucin und Lysin (10 g/L), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (2 g/L) pro Liter Medium zugesetzt.

YP-Medium: 10 g Hefeextrakt und 20 g Bacto-Pepton wurden auf 900 ml mit Wasser aufgefüllt, nach dem Autoklavieren wurden 100 ml 30% (w/v) Glycerol (YPG) oder 100 ml 20% (w/v) Glucose (YPD) zugesetzt.

2.2.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet (Gietz *et al.*, 1995). Eine Hefekultur wurde in 50 ml YPD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0.5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 Minuten, 3.000xg, RT) geerntet, mit sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach Überführung in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden die Hefen sedimentiert, das Zellpellet in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und zu 50 µl aliquotiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde kurz zentrifugiert, das Zellpellet mit 240 µl 50% (w/v) PEG-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl hitzedenaturierter Lachsspermien-DNA (5 mg/ml) sowie 70 µl Wasser, in dem die zu transformierende DNA (1-10 µg) gelöst war, versetzt und gemischt. Die Probe wurde für 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln und anschließend für 20 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (15 s, 6.000 rpm, RT, Tischzentrifuge) pelletiert, in 150 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.6 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Für die Isolierung von Mitochondrien wurden Hyphen aus einer 2 L-Kultur abgeerntet. Je 10 g Zellen wurden mit 15 g Sand und 20 ml SET-Puffer (250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8,5) gemischt und im gekühlten Mörser aufgerieben. Der Sand wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 1600 xg (JA20-Rotor) abgetrennt, danach die Zellorganellen durch Zentrifugation bei 17.700 xg sedimentiert. Die Mitochondrien wurden in SET-Puffer aufgenommen und direkt für Importexperimente verwendet.

Für eine präparative Reinigung von Mitochondrien wurde das Mycel einer 100 L-Kultur abgeschleudert. Jeweils 500 g Mycel wurden mit kaltem 1 Liter SET-Puffer im Mixer homogenisiert, mit 500 ml Sand gemischt und zweimal in Korundmühlen aufgerieben. Der Zellextrakt wurde durch zweimaliges fünfminütiges Abzentrifugieren bei 4000 xg in der Sorvallzentrifuge (HB6000) vom Sand getrennt. Danach wurden durch einen 50minütigen Zentrifugationsschritt bei 15.900 xg (8000 rpm) im JA8-Rotor die Zellorganellen sedimentiert. Die Mitochondrien kamen dabei auf dem Pellet zu liegen, wurden abgeschabt und in ST-Puffer (250 mM Saccharose, 20 mM Tris, pH 8,5) homogenisiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um etwaige Verunreinigungen abzutrennen. Die Mitochondrien wurden in einer Proteinkonzentration von 50 mg/ml in ST-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Mitochondrien bei -20°C gelagert.

2.2.7 Isolierung von Außenmembranvesikeln aus *N. crassa*

Frisch aus einer 100 L-Kultur *Neurospora crassa* isolierte Mitochondrien wurden bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in einem hypotonen Schwellpuffer (5 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) aufgenommen und für 30 Minuten bei 4°C gerührt. Die mitochondrialen Membranen wurden durch Zentrifugation bei 15.900 xg (8000 rpm) im JA8-Rotor (Beckman) reisoliert und in Schwellpuffer resuspendiert. In einem automatischen Glass-Teflon-Homogenisator wurde für 40 Minuten bei 0°C die Außenmembran von den Mitoplasten abgeschert. 20 ml des Homogenisats wurden auf einen Saccharose-Stufengradienten aufgetragen (10 ml 0,9 M Saccharose und 9 ml 0,25 M Saccharose in jeweils 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,5 und 1 mM PMSF (ETP) und für eine Stunde bei 141.370 xg (28.000 rpm) in einem Beckmann SW28-Rotor zentrifugiert. Intakte Mitochondrien, Mitoplasten und Innenmembranfragmente wurden sedimentiert, die mitochondrialen Außenmembranen wurden in Form von Vesikeln an der Grenzschicht zwischen 0,25 M und 0,9 M Saccharose zurückgehalten. Diese Schicht wurde mit einer Pipette abgesaugt und durch Zugabe von 2 M Saccharose auf 0,9 M Saccharose eingestellt. Jeweils 15 ml der Probe wurden mit 21 ml 0,72 M Saccharose in ETP und mit 3 ml ETP (0 M Saccharose) Puffer überschichtet und 14-16 Stunden bei 141.370 xg (28.000 rpm) durch den Saccharosedichtegradienten flotiert. In diesem Schritt

sammeln sich die Außenmembranvesikel aufgrund ihrer geringen Dichte an der Grenzschicht zwischen 0,72 M Saccharose und 0 M Saccharose an. Verunreinigungen mit Innenmembranen bleiben in der Schicht zwischen 0,72 M und 0,9 M Saccharose zurück. Die Außenmembranvesikel wurden wiederum mit einer Pipette aus dem Gradienten entnommen und mit 10 mM KAc/MOPS Puffer (pH 7,2) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 257.320 xg (50.000 rpm) im Ti70 Rotor (60 Minuten) wurden die Außenmembranvesikel pelletiert, in 2 bis 3 ml 10 mM KAc/MOPS aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Die isolierten Außenmembranvesikel wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte im Wesentlichen wie von (Daum *et al.*, 1982) beschrieben. Die Anzucht der Zellen erfolgte bis zu einer OD₅₇₈ von 1,0 bis 1,5. Dazu wurde ein Hefestamm bis zu einer OD₅₇₈ von 1-1,5 kultiviert, die Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten, 4.400 xg, RT) geerntet und mit Wasser gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes der Zellen wurden diese in DTT-Puffer (100 mM Tris/H₂SO₄, 10 mM DTT, pH 9,4) in einer Konzentration von 0,5 g Feuchtgewicht/ml resuspendiert und 15 Minuten bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden reisoliert, mit 200 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen und für den enzymatischen Aufschluss der Zellwände in Zymolyase-Puffer (2 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht, 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.4) in einer Konzentration von 0,15 g Feuchtgewicht/ml aufgenommen. Die Suspension wurde unter Bewegung für 30-60 Minuten bei 30°C inkubiert und die Sphäroplastenbildung durch osmotische Lyse verfolgt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 1 ml Wasser bzw. 1,2 M Sorbitol gemischt und die OD₅₇₈ bestimmt. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD₅₇₈ des Wassergemisches 10-20% der OD₅₇₈ des Sorbitolgemisches betrug. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5 Minuten, 4.400 xg, 4°C) reisoliert, mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und für den anschließenden Zellaufschluss mittels eines Dounce-Homogenisators (Stempel B, 10 Stöße) in eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,2% (w/v) fettsäurefreies Rinderserumalbumin (BSA), 1 mM PMSF) in einer Konzentration

von 0,15 g/ml resuspendiert. Nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (5 Minuten, 4.400 xg, 4°C) abgetrennt und aus dem Überstand die Mitochondrien durch Zentrifugation (12 Minuten, 17.400 xg, 4°C) sedimentiert. Diese wurden mit 10 ml SEM-Puffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) gewaschen, erneut von ganzen Zellen und Zelltrümmern gereinigt (5 Minuten, 4.400 xg, 4°C) und reisoliert (12 Minuten, 17.400 xg, 4°C). Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer aufgenommen, auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach dem von Bradford 1976 beschriebenen Verfahren mit dem "BioRad-Proteinassay". Die Proben wurden mit einer fünfmal verdünnten Lösung des Farbstoffkonzentrates gemischt, als Proteinstandard wurde eine ImmunglobulinG-Lösung bekannter Konzentration verwendet. Die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt.

2.3.2 Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure

Proteine wurden aus wässrigen Lösungen durch die Zugabe von 72%iger Trichloressigsäure (TCA) bei einer Endkonzentration von 12% ausgefällt. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4°C und 22.000 xg für 15 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden ein- bis dreimal mit Aceton gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Sammel-, Trenn- und Bodengel hatten eine Größe von 10 x 150 x 1 mm bzw. 90 x 150 x 1 mm bzw. 5 x 150 x 1 mm. Die Acrylamidkonzentrationen betragen im Sammelgel 5%, im Trenngel zwischen 12

und 16% und im Bodengel 20 %. Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (2% SDS, 5% (v/v) β -Mercapto-Ethanol, 10% (v/v) Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8) gelöst und vor dem Auftrag für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei einer Stromstärke von 30 mA für zwei Stunden. Der Laufpuffer enthielt 0,1% SDS, 200 mM Glycin und 25 mM Tris. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose übertragen oder mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 angefärbt.

2.3.4 SDS-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur besseren Auftrennung von kleinen Proteinen (3 - 10 kDa) wurde ein Polyacrylamidgel mit höherem Vernetzungsgrad und 6 M Harnstoff verwendet. Das Trenngel hatte eine Zusammensetzung von 20% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,75 M Tris/HCl (pH 8,8) und 0,1% SDS. Das Sammelgel setzte sich aus 5% Acrylamid, 0,07% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8) und 0,1% SDS zusammen. Die Gele hatten entweder die Größe wie unter der SDS-Gelelektrophorese beschrieben oder waren 250 mm lang bei einer Stärke von 1 mm. Für die langen Gele erfolgte die Elektrophorese in vertikalen Kammern bei einer Stromstärke von 20 mA für 12 Stunden. Der Laufpuffer enthielt 0,1% SDS, 200 mM Glycin und 50 mM Tris.

2.3.5 Blau-Nativ-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen wurde die Blau-Nativ-Gelelektrophorese (Schägger und von Jagow, 1991) verwendet. Die Zusammensetzung des Gels war wie folgt:

Bodengel: 20% (w/v) Acrylamid, 0,4% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7,5

Trenngel: linearer Gradient aus 6-13% (w/v) Acrylamid, 0,15-0,3% (w/v) Bisacrylamid, 5% (w/v) Glycerol, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7,5

Sammelgel: 4% (w/v) Acrylamid, 0,12% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7,5

Kathodenpuffer: 50 mM TRICINE, 15 mM Bistris/HCl pH 7,5, 0,02% (w/v) Serva BlauG

Anodenpuffer: 50 mM Bistris/HCl pH 7,5

Probenpuffer: 5 % Coomassie, 100 mM Bis-Tris, pH 7,5, 500 mM 6-Aminocapronsäure

In Detergens solubilisierete Membranproteine aus Mitochondrien oder mitochondrialen Außenmembranen sowie isolierte Membranproteine wurden im Verhältnis 5:1 (v/v) mit Probenpuffer (5 % Serva-Blau XG, 500 mM 6-Aminocapronsäure) versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 150 V und wurde nach dem Einlaufen der Proben bei 500 V bei maximal 15 mA für zwei Stunden fortgesetzt.

2.3.6 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Die zu färbenden Gele wurden für 30-60 Minuten in Färbelösung eingelegt und dann in Entfärbelösung partiell entfärbt.

Färbelösung: 45 % Methanol, 40 % Essigsäure und 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue

Entfärbelösung: 30 % Methanol und 10 % Essigsäure

Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Blättern Folie ("Gel drying Film", Promega) in Spannrahmen getrocknet.

2.3.7 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch oder radioaktiv nachweisen zu können, wurden sie nach dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse Andersen, 1984) auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Bei der Verwendung von PVDF-Membran wurde diese zunächst in Methanol inkubiert, um anschließend eine gleichmäßige Benetzung mit Blotpuffer zu gewährleisten. Das Gel, die Membran und vier Whatman-Papiere wurden in Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,2% (w/v) SDS) getränkt und luftblasenfrei in die Blotapparatur geschichtet. Zwei Whatman-Papiere wurden auf die untere Graphit-elektrode gelegt, darauf die Membran, das Gel und zwei weitere Whatman-Papiere.

Zuletzt wurde die obere Graphitelektrode aufgelegt und mit Gewichten beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 200 mA für eine Stunde. Um die transferierten Proteine insbesondere die Markerproteine sichtbar zu machen, wurde die Membran gefärbt. Nitrozellulosemembranen wurden in Ponceau S-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA) geschwenkt und mit Wasser partiell entfärbt. PVDF-Membranen wurden mit Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt und mit Entfärbemittel (s. 2.3.6) soweit entfärbt, dass die Marker sichtbar wurden. Sollte die PVDF-Membran für den immunologischen Nachweis von Proteinen verwendet werden, wurde die Membran in 100% Methanol vollständig entfärbt und in TBS aufbewahrt.

2.3.8 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE oder Blau-Nativ-Gelelektrophorese und Westernblot autoradiographisch nachgewiesen. Dazu wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) auf eine Blotmembran aufgelegt und nach angemessener Inkubationsdauer entwickelt (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert).

2.3.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen (Westernblot)

Zum spezifischen Nachweis von Proteinbanden auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen wurden zunächst unspezifische Proteinbindungsstellen in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) bei Raumtemperatur für 30-60 Minuten abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für eine Stunde mit spezifischen Antisera, die 1:200 bis 1:10.000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran je 5 Minuten mit TBS, TBS mit 0,01% (v/v) Triton X-100 und erneut mit TBS gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte je nach Herkunftorganismus des Antikörpers durch Inkubation für eine Stunde mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Maus-IgG und Meerrettich-Peroxidase, das 1:10 000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran je 5 Minuten mit TBS, dreimal mit TBS mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 und erneut mit TBS gewaschen und schließlich mit Luminol-Reagenz (440 µg/ml Luminol und 66 µg/ml p-Cumarsäure in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 und im Verhältnis 1:1 frisch zugegebene

0,018%ige (v/v) Wasserstoffperoxidlösung in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5) benetzt. Die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion ermöglichte durch die Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilmes (Fuji NewRX) die Detektion der spezifisch mit Antikörper markierten Proteinbanden.

2.3.10 *In vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine

Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine wurde das "TNT Coupled Reticulocyte Lysate"-System von Promega verwendet, welches die gekoppelte Transkription und Translation von komplementärer DNA ermöglicht. Als Matrize wurden Derivate des pGEM4-Plasmids (Promega) verwendet, welche die kodierende Sequenz des jeweiligen Proteins unter Kontrolle eines SP6- bzw. T7- Promotors enthielten. Ein 100 µl Standardansatz bestand aus 50 µl TNT-Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 µl TNT-Reaktionspuffer, 2 µl TNT-SP6-RNA-Polymerase, 2 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 4 µl [³⁵S]Methionin (10 µCi/µl), 2 µl RNasin (40 U/µl), 4 µl Plasmid-Template (~0.5 µg/µl) und 32 µl H₂O. Nach Inkubation für 90 Minuten bei 30°C wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 µl 0,2 M Methionin beendet. Anschließend wurde das Lysat aliquotiert und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.3.11 *In vitro* Proteinimport in Mitochondrien

Für einen *in vitro* Proteinimport wurden 50 µg Mitochondrien in Importpuffer mit 2-5 µl radioaktiv markiertem Reticulozytenlysat bei 25°C inkubiert. Um die Importreaktion zu beenden, wurden die Proben mit 1 ml eiskaltem Puffer verdünnt. Für die Überprüfung des Imports mittels SDS-PAGE wurden nicht importierte Präproteine durch die Zugabe von Proteinase K (50-200 µg/ml) oder Trypsin (50-200 µg/ml) abgebaut (Inkubation für 15 Minuten auf Eis). Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF bzw. 10fachem Überschuss Trypsininhibitor (0,5-2 mg/ml) gestoppt. Die Mitochondrien wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 18.000 xg) reisoliert und in Puffer gewaschen. Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurden die Pellets in Lämmli aufgenommen. Sollten der Import und die Assemblierung mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese überprüft werden, wurden die Mitochondrien in Solubilisierungspuffer aufgenommen und für 20 Minuten im

Kühlraum schüttelnd inkubiert. Unlösliche Teile wurden abzentrifugiert und der Überstand mit Blau-Nativ-Gelelektrophoresen-Probenpuffer (s. 2.3.5) aufgenommen. Die Gele wurden auf PVDF- bzw. Nitro-zellulosemembran geblottet und durch Autoradiographie oder Immunoblot analysiert.

N. crassa Importpuffer: 250 mM Sucrose, 10 mM MOPS, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,25 % fettsäurefreies BSA, 2,5 mM ATP, 5 mM NADH, pH 7,2.

N. crassa Waschpuffer: 250 mM Sucrose, 10 mM MOPS, 2 mM EDTA, pH 7,2.

S. cerevisiae Importpuffer: 600 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM EDTA, 1 mg/ml fettsäurefreies BSA, 2,5 mM ATP, 5 mM NADH, pH 7,2.

S. cerevisiae Waschpuffer: 600 mM Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2

2.3.12 Solubilisierung von Membranproteinen

Mitochondrien wurden standardmäßig mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in 1% Detergens (Ausnahme LDAO: 3%), 50 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 10% Glycerol und 2 mM PMSF solubilisiert. War die Proteinkonzentration niedriger, wurde auch die Detergenskonzentration reduziert. Da Außenmembranvesikel im Vergleich zu Mitochondrien anteilig mehr Lipide als Proteine enthalten, wurden diese bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit 2,5% DDM bzw. 2,5% Digitonin solubilisiert.

Detergenzien:

	M	%	CMC mM
Tridecylmaltosid	524,6	0,0017	0,033
Dodecylmaltosid	510,6	0,00765	0,15
Undecylmaltosid	496,6	0,0293	0,59
Decylmaltosid	482,6	0,0772	1,6
LDAO	229,4	0,032	1,4
C12E8	539,1	0,0059	0,11
Octylglycosid	292	0,89	30,3
TritonX-100	625	0,021	0,25
Digitonin	1229,3	---	---

2.3.13 Gelfiltration

Die oligomere Stabilität von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen wurde mittels Größenausschluß-Chromatographie untersucht. Für die Gelfiltration wurden Superose6-Säulen (Amersham Biosciences) oder die TSK G-4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule (Toso-Haas) verwendet. Die Säulen wurden jeweils in sterilfiltriertem Gelfiltrationspuffer (50 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 10% Glycerol und 0,1% DDM bzw. 0,05% Digitonin) equilibriert, die solubilisierte Probe wurden über einen Loop geladen und die Säule isokratisch eluiert. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt, die Proteine TCA-präzipitiert und über SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

2.3.14 Isolierung von TOM-Core-Komplex aus *Neurospora crassa* Mitochondrien

Als Ausgangsmaterial für die präparative Reinigung des TOM-Core-Komplexes für Kristallisationsexperimente wurden 5 g *Neurospora crassa* Mitochondrien aus dem Stamm GR107 bzw. Tom5^{RIP}HT verwendet. Die Mitochondrien wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in Solubilisierungspuffer (20 mM Tris, pH 8,5, 300 mM NaCl, 20% Glycerol, 1% DDM, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF) für 30 Minuten bei 4°C gerührt. Nicht solubiliertes Material wurde bei 260.000 xg (Ti70-Rotor, Beckman) für 30 Minuten sedimentiert und der Überstand abfiltriert. Für die TOM-Isolierung wurden 20 ml regenerierte Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA; Quiagen) in eine Säule mit einem Durchmesser von 5 cm gepackt. Die Säule wurde mit Solubilisierungspuffer equilibriert. Das filtrierte Solubilisat wurde mittels einer Persistaltikpumpe bei einer Flußrate von 3 ml/min über die Säule gepumpt. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer W1 (20 mM Tris, pH 8,5, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,1% DDM, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF) und dann zur Anpassung des pH-Wertes für die anschließende Anionenaustauschchromatographie mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer W2 (50 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 10% Glycerol, 0,1% DDM, 40 mM Imidazol, 1 mM PMSF) gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 4 Säulenvolumen Elutionspuffer (50 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 10% Glycerol, 0,1% DDM, 300 mM Imidazol, 1 mM PMSF) eluiert. Im zweiten Reinigungsschritt wurde das Eluat der Ni-NTA-Säule auf eine 6 ml-ResourceQ-

Anionenaustausch-Säule (Amersham Biosciences) des ÄKTA-Chromatographie-Systems (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säule war zuvor im Puffer ResA (50 mM Kaliumacetat pH 7,5, 10% Glycerol, 0,03 % DDM) equilibriert worden. Nach dem Auftragen des Proteins wurde die Säule mit einem Säulenvolumen Puffer ResA gewaschen. Die Elution erfolgt mittels eines Gradienten aus Puffer ResA und Puffer ResB (50 mM Kaliumacetat pH 7,5, 10% Glycerol, 0,03% DDM, 1 M KCl), wobei ein zweiter Waschschrift von einem Säulenvolumen bei 20% ResB (entspricht 200 mM KCl) durchgeführt wurde. Der TOM-Komplex eluierte bei ca. 330 mM KCl von der ResourceQ-Säule. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Die TOM-Komplex enthaltenden Fraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese auf die Reinheit des Komplexes überprüft und die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt. Die TOM-Komplex enthaltenden Fraktionen konnten maximal 3 Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.3.15 Isolierung von TOM-Core-Komplex aus Außenmembranvesikeln

Für die präparative Reinigung des TOM-Core-Komplexes für Kristallisationsexperimente wurden 25-40 mg Außenmembranvesikel eingesetzt. Die Außenmembranvesikel wurden bei einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 10% Glycerol, 1% DDM, 1 mM PMSF) für 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Zur Abtrennung ungelöster Bestandteile wurde das Solubilisat für 30 Minuten bei 183.254 xg (45.000 rpm) im Ti50-Rotor (Beckman) abzentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Loop auf eine mit Puffer ResA (50 mM Kaliumacetat pH 7,5, 10% Glycerol, 0,03% DDM) equilibrierte 6 ml-ResourceQ-Säule (Amersham Biosciences) in einem ÄKTA-Chromatographie-System (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säule wurde mit fünf Säulenvolumen ResA-Puffer gewaschen und mit einem linearen Gradienten aus Puffer ResA und ResB (50 mM Kaliumacetat pH 7,5, 10% Glycerol, 0,03% DDM, 1 M KCl) eluiert. Der Gradient enthielt einen Waschschrift bei 20% Puffer B (entspricht 200 mM KCl), es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Reinheit des eluierten TOM-Komplexes wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft und die Proteinkonzentration durch Bradford bestimmt.

2.3.16 Aufbereitung des gereinigten TOM-Core-Komplexes für die Kristallisation

Die drei Hauptfraktionen einer TOM-Isolierung wurden in einen Dialyserahmen (10 kDa; PIERCE) überführt und für 12-16 Stunden gegen 2 Liter Puffer (10 mM KAc/MOPS, pH 7,2, 0,03% DDM) dialysiert. Auf diese Weise wurde die Konzentrationen von Glycerol und KCl auf 0,0075% v/v bzw. 0,225 mM gesenkt. Die dialysierte Proteinprobe wurde dem Rahmen entnommen und in einem Nanosep-Konzentrator (cut off 100 kDa; Pall) auf eine Proteinkonzentration von 15-20 mg/ml eingeeengt und bei 4°C für maximal drei Wochen gelagert.

2.3.17 Kristallisation des TOM-Core-Komplexes

Die Kristallisation des TOM-Core-Komplexes wurde mit Hilfe der Methode des hängenden Tropfen durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 10-15 mg/ml in 10 mM KAc/MOPS und 0,03% DDM. Auf einer Platte (Linbro, ICN Biomedicals) wurden 24 Ansätze pipettiert. Es wurden silanisierte Deckgläser verwendet. Die Ränder wurden mit Immersionsöl Typ B (Hampton Research) abgedichtet. Die Kristallisationsansätze wurden im Inkubationsschrank (Rumed) bei 20°C gelagert.

2.3.18 Kristallisation in Kapillaren

Zur Kristallisation in Kapillaren wurden Glaskapillaren (Spezialglas-Markröhrchen) der Firma Glas Technik & Konstruktion (Schönwalde/Berlin) mit einem Durchmesser von 0,3 mm verwendet. Als Agarose wurde "low melting" Agarose der Firma Amersham Biosciences als 0,5%ige Lösung in 10 mM KAc/MOPS, pH 7,2 angesetzt. Hierzu wurde die Agarose in einem Reaktionsgefäß eingewogen, in Puffer aufgenommen und in einem 95°C Heizblock erhitzt. Die gelöste Agarose wurde in einem 30°C-Heizblock bis zur Verwendung gelagert. Der gereinigte TOM-Komplex mußte in einer Konzentration von 15-18 mg/ml vorliegen und wurde ebenfalls auf 30°C erwärmt. In einem Reaktionsgefäß wurden 5,5 µl TOM-Komplex und 5,5 µl Agaroselösung gemischt und sofort in die Kapillare aufgezogen. Die Kapillare wurde dann für 15 Minuten auf einem Eis-gekühlten Metallblock gelagert, um die Polymerisation der Agarose zu beschleunigen. Das untere Ende der Kapillare wurde

mit Nagellack versiegelt und die Agarose mit 30 µl Kristallisationspuffer (100 mM Ammoniumcitrat pH 4,5; 50 mM Tris pH 7,2; 35% PEG400) überschichtet. Nach dem Verschließen des oberen Endes der Kapillare mit Bienenwachs wurde die Kapillare in einer Granada Kristallisationsbox (Hampton Research) aufgestellt und für die Kristallisation bei 20°C im Inkubator gelagert. Kristalle erschienen nach 3-7 Tagen.

2.3.19 Kristallisationsansätze mit dem Pipettierroboter

Für den aus der Tom5^{RIP} Mutante in n-Undecyl-β-D-maltosid isolierten TOM-Komplex wurden von einem Pipettierroboter Kristallisationsansätze im sitzenden Tropfen auf 96 well-Platten angesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 14 mg/ml.

2.4 Geräte

Agarosegel-Dokumentation	The Imager-Imaging-System, Appligene
Autoklav	Bioclav, Schütt
Blot-Apparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Brutschränke	Heraeus Christ
Chromatographiesysteme	ÄKTA Explorer, ÄKTA Purifier, ETTAN, ÄKTA Prime, Amersham Biosciences
Digitalkamera	Sony
Entwicklermaschine	Gevamatic 60, Agfa-Gevaert
Gelkammern	Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München
Feinwaagen	Sartorius
Kristallisationsschrank	RUMED
Kolbenhubpipetten	Abimed
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Deutschland
Peristaltik-Pumpe	P-1, Amersham Biosciences
Photometer	Eppendorf Shimadzu Quantum, Amersham Biosciences
Spannungsgeräte	Amersham Biosciences
Sterilbank	BDK
Thermocycler	Primus 25/96, MWG-Biotech
Überkopfschüttler	Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250, G. Heinemann
Vortex-Mixer	Bender und Hobein
Zentrifugen	Beckman Instruments Eppendorf Heraeus Christ Sigma

2.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agfa-Gevaert (München)	Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme
Amersham Biosciences (Freiburg)	ResourceQ, Superose6,
Behringwerke (Marburg)	Freunds inkomplettes Adjuvans
Bio-Rad (München)	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgGs aus Ziege, Proteinreagenz und Standard für

Material und Methoden

Boehringer (Mannheim)	die Proteinbestimmung ATP, Desoxyribonukleotide, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris
Calbiochem (Darmstadt)	Digitonin
Chemikalienausgabe, Fakultät Chemie	Ethanol, Methanol, Aceton, Isopropanol
DIFCO (Detroit, USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, Hefe-Stickstoff-Base
Emerald Biostructures	Wizard Screen I, Wizard Screen II
Fluka (Buchs, Schweiz)	PEG400
Fuji (Tokyo, Japan)	Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Genomed (Bad Oeyenhausen)	JETSTAR-Kit für Plasmid-DNA-Präparation
Gerbu (Gaiberg)	Acrylamid, DTT, NADH
GIBCO-BRL (Eggenstein)	Agarose, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase
Glycon Biotech (Luckenwalde)	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
Hampton Research	Crystal Screen I, Crystal Screen II, PEG Ion Screen, Natrix Screen, Immersionsöl Typ B
Jena Bioscience	JBScreen 1-10
Kodak (München)	Bio Max MR Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm
Metabion (München)	Primer
ICN Pharmaceuticals (Eschwege)	[³⁵ S]Methionin, Kristallisationsplatten Linbro
Nestle-Alete (München)	Magermilchpulver
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsenzyme
Pall Life Sciences (New York, USA)	Nanosep Centrifugal Devices
Pierce (Rockford, USA)	Slide-A-Lyzer Dialysis Unit, Sulfolink Coupling Gel
Pineda Antikörper Service (Berlin)	Tom5-Antikörper
Promega (Heidelberg)	Gel Drying Film, pGEM4-Vektor, pGEMT-Vektor, TNT Coupled Reticulocyte Lysate
Quiagen (Hilden)	Ni-NTA-Agarose, QIAquick Gel Extraction Kit
Serva (Heidelberg)	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R- 250, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED, Xylenyanol
Schleicher & Schuell (Kassel)	Protran Nitrozellulosemembran BA83, PVDF-Membran, Whatman Filterpapiere
Sigma (München)	Aminosäuren, APS, Ampicillin, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Ethidiumbromid, FCCP, Glycerol, Lachsspermien-DNA, β -Mercaptoethanol, LMW Molekulargewichts-Standard, PMSF, STI, Trichloressigsäure, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A
Stratagene (La Jolla, USA)	Seikagaku (Tokyo, Japan) Zymolyase XL1-Blue Zellen

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Funktionsanalyse von Tom5

3.1.1 Identifikation von Tom5 in *Neurospora crassa*

Für die Röntgenstrukturanalyse des TOM-Core-Komplexes sollte aus *Neurospora crassa* gereinigter Komplex verwendet werden. Dieser ist weitgehend homolog zum *S. cerevisiae* TOM-Core-Komplex aufgebaut, jedoch wurde für Hefe eine kleine Tom-Komponente Tom5 beschrieben, die in *N. crassa* nicht identifiziert wurde. Da in BLAST-Analysen mit der Aminosäuresequenz des Hefe Tom5-Proteins keine Proteine mit Sequenzähnlichkeit gefunden werden konnten, sollte der aus *N. crassa* gereinigte TOM-Core-Komplex massenspektrometrisch auf das Vorhandensein

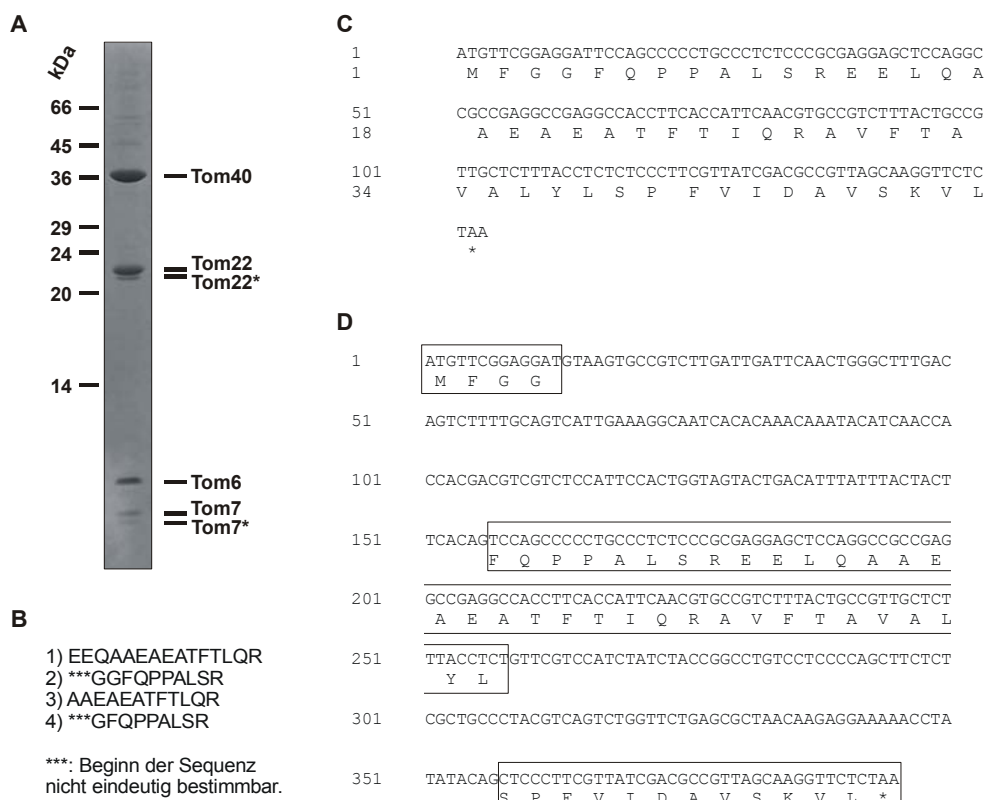


Abb. 2: Identifizierung von Tom5 in *Neurospora crassa*

(A) 150 µg gereinigter TOM-Core-Komplex wurden in einem SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Tom22* und Tom7* bezeichnen Abbaubanden von Tom22 und Tom7. Links sind die molekularen Markergrößen angegeben. (B) Die massenspektrometrische Analyse der in (A) als Tom7* bezeichneten Bande ergab vier Peptidsequenzen. (C) Die Peptidsequenzen wurden dem cDNA-Klon e4g06ne_f1 (*Neurospora crassa* Evening sequence database, Universität von Oklahoma; <http://www.genome.ou.edu/fungal.html>) zugeordnet. Dargestellt sind hier die cDNA- und die Aminosäuresequenz. (D) In der genomischen DNA ist die codierende Sequenz für Tom5 durch zwei Introns unterbrochen.

eines Tom5-Proteins überprüft werden. Hierzu wurde gereinigter TOM-Core-Komplex in einem SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 2A) und alle Proteinbanden mit geringerer Masse als 10 kDa in der Massenspektrometrie untersucht. Bei der Analyse der kleinsten Proteinbande, die zuvor einem Abbauprodukt von Tom7 (Tom7*) zugeordnet worden war, wurden vier Peptide gefunden, die nicht mit den Aminosäuresequenzen der bekannten Tom-Komponenten übereinstimmten (Abb. 2B). Durch die Suche in cDNA-Datenbanken von *Neurospora crassa* konnte ein Klon identifiziert werden, dessen cDNA für ein Protein von 5,4 kDa kodiert und dessen Aminosäuresequenz alle fraglichen Fragmente abdeckte (Abb. 2C; Klon Nummer e4g06ne_f1, *Neurospora crassa* Evening sequence database, Universität von Oklahoma; <http://www.genome.ou.edu/fungal.html>). Durch den Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen DNA von *Neurospora crassa* konnte die kodierende Sequenz identifiziert werden, die durch zwei Introns unterbrochen wird (Abb. 2D; Contig Nummer 6, Gesamtlänge 1.077.476 bp; Tom5: 1.046.812-1.047.156 bp; <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>). Ein Sequenzvergleich mit der in *S. cerevisiae* beschriebenen Tom-Komponente Tom5 ergab eine Sequenzidentität der beiden Proteine von 32% (Abb. 3).

N. crassa	MFGGFFQPPALSREELQAAAEAEATFTIQRAVFTAVALLYLSPFVIDAVSKVL	50
S. cerevisiae	MFGLPQQQ.EVSEEEKRAHQEQTTEKTLKQAAAYVAAFLVWV.SPMIWHLVKKQWK	50

Abb. 3: Sequenzvergleich Tom5 aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae*

Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren grau schattiert. Die Tom5-Proteinsequenzen aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* sind zu 32% identisch. Die hypothetischen Transmembrandomänen sind unterstrichen.

Das Hydrophobizitätsprofil der Aminosäuresequenzen ist ebenfalls sehr ähnlich und deutet bei beiden Proteinen auf eine Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich hin.

N. crassa	MFGGFFQPPALSREELQAAAEAEATFTIQRAVFTAVALLYLSPFVIDAVSKVL	50
G. zeae	MFGGFAPPQQSQHEIRALEADAFTVOGAIITAVILLYLSPFALDLYGKIL	50
B. fuckeliana	MFGGP.PPPPSAAELKAEHEEASLTVQRVITWSILLYLSPFAVKSIQNLII	49
S. cerevisiae	MFGLPQQQ.EVSEEEKRAHQEQTTEKTLKQAAAYVAAFLVWV.SPMIWHLVKKQWK	50
E. gossypii	MFGFPQQQPSEEEELKKHQEQTNSTVMTAAAYAAAFVWV.SPIVWNFIRKQWK	50
K. lactis	MFGLPQQQ.SSEEEKRLHQQQSNQTLTNAAYAAAAVWL.SPLIWHFIRKQFK	49
D. hansenii	MFGGPGSQPSEDCKKLQEKYAVDTLLKTAGFIAGALVWV.APIIFHYIKRQL	49

Abb. 4: Multipler Sequenzvergleich von Tom5-homologen Proteinen

In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, zu 75% konservierte Aminosäuren dunkelgrau schattiert, zu 50% konservierte Aminosäuren hellgrau markiert. *Neurospora crassa* (CAE76411), *Giberella zeae* (FG09545.1), *Botryotinia fuckeliana*, *Saccharomyces cerevisiae* (YPR133W-A), *Eremothecium gossypii* (AAR106Cp), *Kluyveromyces lactis* (XP_452027), *Debaryomyces hansenii* (CAG87912). In Klammern sind die Acession Nummern der Gene Bank für die einzelnen Proteine angegeben.

Über Aminosäurevergleiche konnten weitere Sequenzhomologe zu Tom5 in anderen Pilzen identifiziert werden (Abb. 4). In höheren Eukaryonten konnten keine Homologe zu Tom5 gefunden werden. Möglicherweise ist hier die Sequenzidentität zu niedrig oder der Leserahmen durch Introns unterbrochen, wodurch das Auffinden einer nur 150 Basenpaar langen Sequenz unmöglich wäre.

Ob es sich bei der neuen *N. crassa* Tom-Komponente um ein funktionelles Tom5 handelt, wurde durch einen Austausch des Hefe Tom5 durch *Neurospora* Tom5 überprüft. Ein Hefestamm, dessen *TOM5*-Gen deletiert wurde, verhält sich bei 30°C auf YPD-Medium vergleichbar zum Wildtyp-Stamm, weist allerdings bei 37°C kein Wachstum mehr auf. Dieser Wachstumsphänotyp konnte durch das Einbringen des *Neurospora tom5*-Genes aufgehoben werden, wodurch eine funktionelle Übereinstimmung der beiden Proteine nahegelegt wird (Abb. 5).

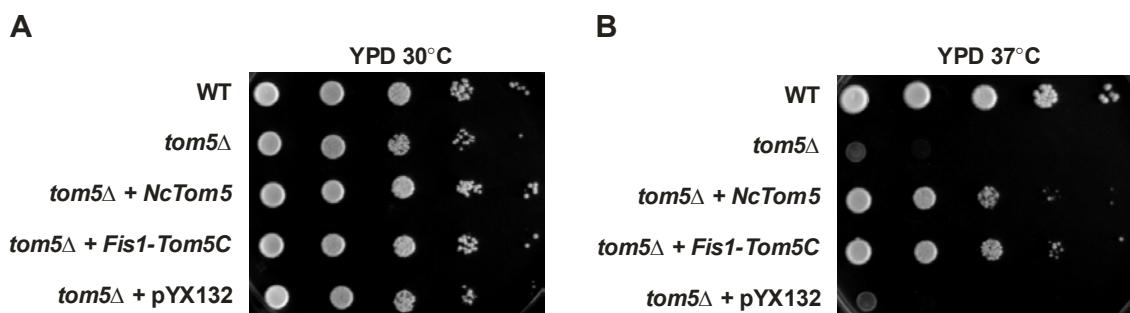


Abb. 5: *N. crassa* Tom5 ist ein funktionelles Homolog des Hefe Tom5

(A) Bei 30°C wächst ein Hefe Tom5-Deletionsstamm (*tom5Δ*) vergleichbar zum Wildtyp-Stamm (WT). (B) Bei einer Temperatur von 37°C ist kein Wachstum des *tom5Δ*-Stammes mehr zu erkennen. Wird das *Neurospora tom5*-Gen auf einem Plasmid in den Hefe Tom5-Deletionsstamm eingebracht (*tom5Δ + NcTom5*), verhält sich dieser Stamm im Wachstum bei 37°C wie der Wildtyp-Stamm. Auch die Transmembrandomäne des Hefe Tom5 fusioniert an die cytosolische Domäne von Fis1 (*tom5Δ + Fis1-Tom5C*) reicht aus, um den Hefezellen das Wachstum auf 37°C zu ermöglichen. Zur Kontrolle wurde das leere Plasmid (pYX132) in den *tom5Δ*-Stamm transformiert (*tom5Δ + pYX132*), wodurch das Wachstum bei 37°C nicht wieder hergestellt werden konnte.

Mitochondrien aus dem *S. cerevisiae tom5Δ*-Stamm zeigten einen deutlich schlechteren Import von Präproteinen aller mitochondrialen Kompartimente im Vergleich zum Import in Wildtyp-Mitochondrien (Dietmeier *et al.*, 1997). Mitochondrien, in denen Hefe Tom5 durch *Neurospora* Tom5 ersetzt wurde, sollten bei funktioneller Äquivalenz der beiden Proteine mitochondriale Präproteine in einer

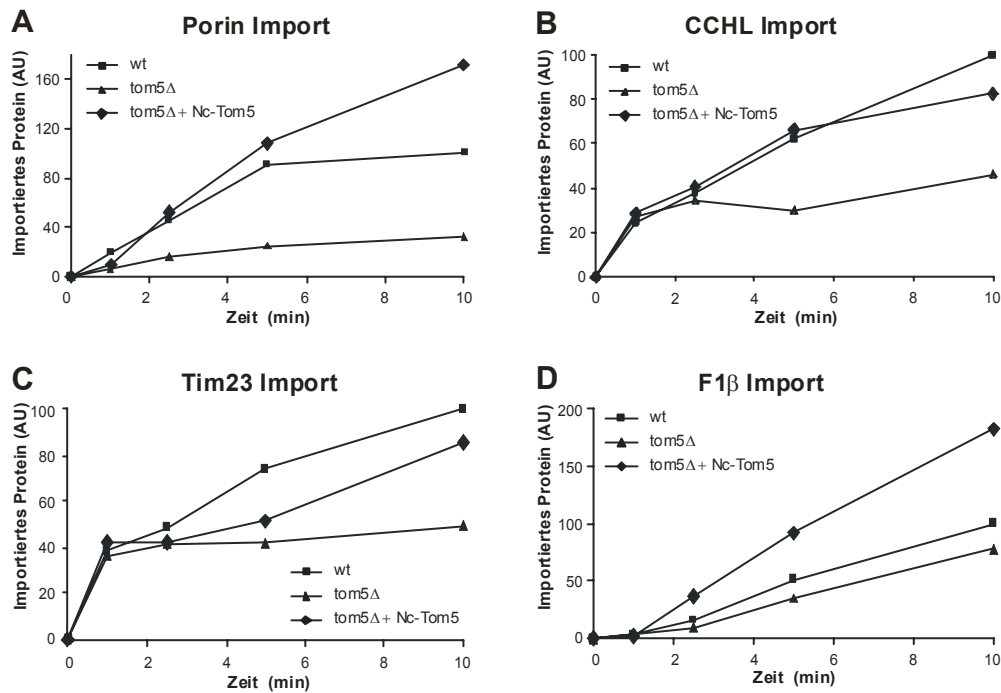


Abb. 6: Importkinetiken von *S.c.* Mitochondrien aus Wildtyp, *tom5Δ* und *tom5Δ* + *N.c.* Tom5

Isolierte Mitochondrien aus einem Wildtyp-Stamm (WT), dem Tom5-Deletionsstamm (*tom5 Δ*) und einem Tom5-Deletionsstamm (*tom5 Δ* + *N.c.*-Tom5), der das *Neurospora* Tom5 exprimiert, wurden für 1-10 Minuten (min) mit radioaktiv markierten Präproteinen (A) der Außenmembran (Porin), (B) des Intermembranraums (CCHL), (C) der Innenmembran (Tim23) und (D) der mitochondrialen Matrix (F1β) inkubiert. Nicht importiertes Material wurde durch Proteinase K verdaut, die Mitochondrien gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie quantifiziert. Der Wert für den Wildtypimport nach 10 Minuten wurde auf 100 Arbitrary Units (AU) gesetzt.

im Vergleich zum Wildtyp ähnlichen Kinetik importieren können. Um dies zu prüfen, wurden Mitochondrien aus dem Hefe Wildtyp-Stamm, dem *tom5Δ*-Stamm und dem *N.c.* Tom5 exprimierenden *tom5Δ*-Stamm isoliert. Als radioaktiv markierte Präproteine wurden Porin als Außenmembranprotein, Cytochrom c Hämlyase (CCHL) für den Intermembranraum, Tim23 als Protein der Innenmembran und die β-Untereinheit der F₁F₀-ATPase (F₁β) als Matrixprotein verwendet (Abb. 6). Die Importraten in *tom5Δ* Mitochondrien waren im Vergleich zum Wildtyp um 20-80% reduziert. Durch die Expression von *Neurospora* Tom5 wurden die Importraten wieder auf Wildtyp-Niveau gehoben oder sogar im Vergleich zum Wildtyp verbessert. Offensichtlich konnte *N.c.* Tom5 in Hefe die Funktion des endogenen Tom5-Proteins übernehmen.

3.1.2 Charakterisierung von Tom5 in *Neurospora crassa*

Um die Assemblierung von *Neurospora crassa* Tom5 in den TOM-Komplex zu verfolgen, wurde radioaktiv markiertes Tom5 in frisch isolierte Wildtyp-Mitochondrien importiert. Als Kontrollen wurden Lysate der anderen Tom-Komponenten Tom7, Tom22 und Tom40 für weitere Importexperimente verwendet. Nach dem Import wurden die Mitochondrien solubilisiert und mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese analysiert. Zwei Spuren des Gels wurden als Kontrollen mit solubilisierten Mitochondrien beladen und mit Antikörpern gegen Tom40 und Tom22 dekoriert. Tom5 assemblierte in einen ca. 400 kDa großen Komplex, in dem auch die anderen Tom-Komponenten nachgewiesen werden konnten. Es waren keine Assemblierungsintermediate zu erkennen (Abb. 7).

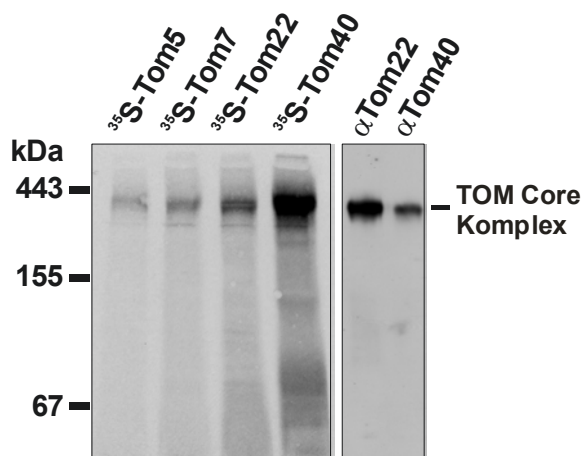


Abb. 7: *In vitro* Import von Tom5

Die mit [³⁵S]Methionin markierten Proteine Tom5, Tom7, Tom22 und Tom40 wurden für 20 min mit je 50 µg frisch isolierten Mitochondrien inkubiert. Die reisolierten Mitochondrien wurden in 20 mM Tris, 1% DDM solubilisiert. Unlösliche Teile wurden abzentrifugiert, der Überstand mit Blau-Nativ-Probenpuffer versetzt und auf ein 6-13% Blau-Nativ-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden in zwei weitere Spuren solubilisierte Mitochondrien geladen. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Autoradiographie, die Größe des internen TOM-Komplexes durch Immunoblot gegen Tom22 und Tom40 nachgewiesen. Als Größenmarker dienen Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (155 kDa) und bovines Serumalbumin (67 kDa).

Für die Untersuchung der Topologie von Tom5 wurde eine Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien durchgeführt. Dies führte zu einem Abbau der von außen zugänglichen Proteindomänen der in der Außenmembran verankerten Tom-Komponenten.

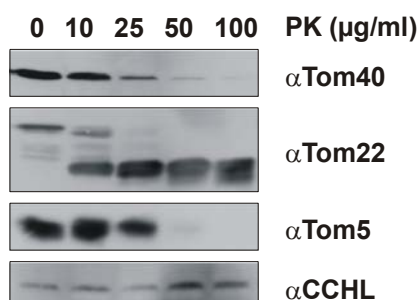


Abb. 8: Proteinase K-Behandlung

Je 50 µg Mitochondrien wurden mit 0-100 µg/ml Proteinase K (PK) für 20 min auf Eis inkubiert. Die mitochondrialen Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen Tom40, Tom22, Tom5 und Cytochrom c Häm Lyase (CCHL) dekoriert.

Tom22 wurde bereits von geringen Mengen Proteinase K angegriffen. Es konnte ein Tom22-Fragment, bestehend aus der Transmembranregion und der C-terminalen Domäne im Intermembranraum, durch Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 8). Tom40 war bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml Proteinase K stabil. Tom5 wurde erst bei höheren Konzentrationen als 25 µg/ml Proteinase K proteolytisch angegriffen. Es konnten keine Fragmente von Tom5 nachgewiesen werden. Der Antikörper wurde gegen ein N-terminales Tom5-Peptid hergestellt, so dass die Transmembrandomäne und die wenigen C-terminalen Aminosäuren im Westernblot nicht nachgewiesen werden können. Der Abbau des N-Terminus bestätigt die vorhergesagte Topologie von Tom5 (siehe 3.1.1). Mit Trypsin konnte kein Abbau von Tom5 beobachtet werden.

Durch chemische Quervernetzung sollten Interaktionspartner von Tom5 im TOM-Komplex identifiziert werden. Mit dem kleinen Molekül Formaldehyd konnte Tom5 in Außenmembranvesikeln (Abb. 9A) und in gereinigtem TOM-Komplex (Abb. 9B) vollständig mit Tom40 vernetzt werden. Es konnten kein freies Tom5 und keine Quervernetzungprodukte mit anderen Tom-Komponenten nachgewiesen werden. Ein zweites Vernetzungsprodukt von Tom40 wurde bereits in anderen Arbeiten als eine

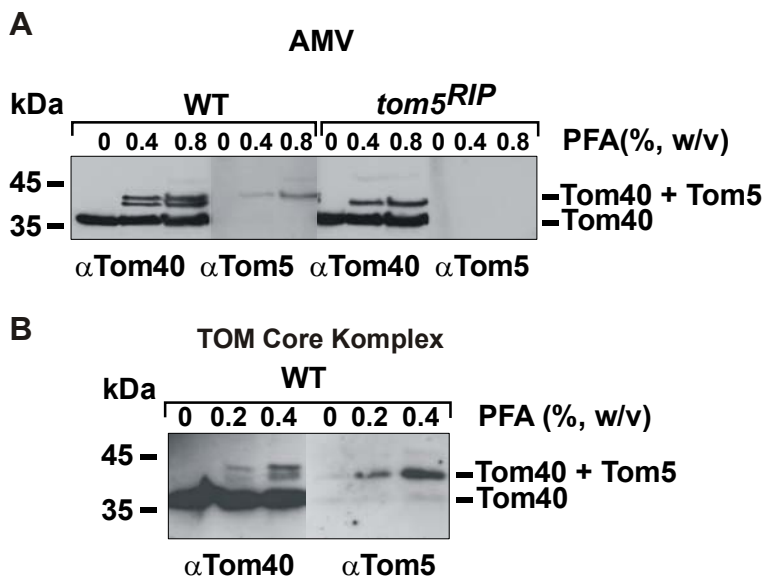


Abb. 9: Chemische Quervernetzung von Tom5 und Tom40

(A) 25 µg Außenmembranvesikel (AMV) und (B) 4 µg gereinigter TOM-Core-Komplex wurden jeweils für 20 min mit 0-0,8% Paraformaldehyd (PFA) bei 25°C inkubiert. Die Quervernetzung wurde mittels 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen und Immunoblot analysiert. Es wurden Außenmembranvesikel aus einem *Neurospora* Wildtyp (WT) und aus einem Tom5-Deletionsstamm (*tom5^{RIP}*) verwendet.

Verbindung mit Tom6 identifiziert (Dembowski *et al.*, 2001). In Außenmembranvesikeln, die aus einem *Neurospora* Tom5-Deletionsstamm (*tom5^{RIP}*, siehe 3.1.3) isoliert wurden, war nur noch ein Vernetzungsprodukt von Tom40 zu Tom6 zu sehen; die Bande, die im Immunoblot von Antikörpern gegen Tom40 als auch gegen Tom5 erkannt wurde, war nicht mehr vorhanden.

3.1.3 Deletion von Tom5 in *Neurospora crassa*

Für die weitere funktionelle Untersuchung von Tom5 in *Neurospora crassa* wurde ein Stamm mit disruptiertem *tom5*-Gen (*tom5^{RIP}*) von Frank Nargang (University of Alberta, Kanada) zur Verfügung gestellt. Im Immunoblot konnte kein Tom5-Protein mehr nachgewiesen werden, alle anderen Tom-Komponenten sowie weitere Außenmembranproteine waren in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen vorhanden (Abb. 10). Da die Deletion von Tom5 in Hefe zu einem Wachstumsphänotyp bei 37°C führt (Abb. 5), wurde der *Neurospora tom5^{RIP}*-Stamm auf sein Wachstum unter verschiedenen Bedingungen, unter anderem hohe Temperaturen (42°C), überprüft. Es konnte jedoch kein Wachstumsphänotyp des *tom5^{RIP}*-Stammes festgestellt werden.

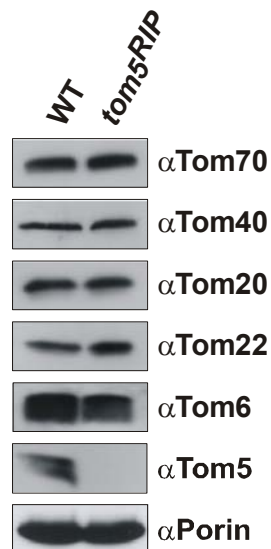


Abb. 10: Außenmembranproteine in *tom5^{RIP}*-Mitochondrien

Je 50 μ g Mitochondrien aus einem *Neurospora* Wildtyp (WT) und dem *tom5*-Deletionsstamm (*tom5^{RIP}*) wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen verschiedene Außenmembranproteine dekoriert.

Da die zwei kleinen Tom-Komponenten Tom6 und Tom7 als Faktoren für die Komplexstabilität und den Austausch von Tom-Untereinheiten beschrieben wurden (Alconada *et al.*, 1995; Dembowski *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2001), stellte sich die Frage, ob auch Tom5 für die Stabilität des TOM-Komplexes von Bedeutung ist. In

der Gelfiltration zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem Laufverhalten des TOM-Core-Komplexes und des *tom5^{RIP}*-Komplexes (Abb. 11). Daraus folgte, dass Tom5 nicht für die Assemblierung des TOM-Core-Komplexes benötigt wird. Die Deletion bewirkte keine Veränderung des äußeren Aufbaus oder der Konformation des Komplexes, die durch eine Änderung des Laufverhaltens in der Gelfiltration hätte dokumentiert werden können. Diese Beobachtung konnte zudem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Stephan Nußberger bestätigt werden. Es waren auch für den *tom5^{RIP}*-TOM-Komplex die typischen Zwei-Loch-Partikel des TOM-Core-Komplexes (Ahting *et al.*, 1999) zu erkennen.

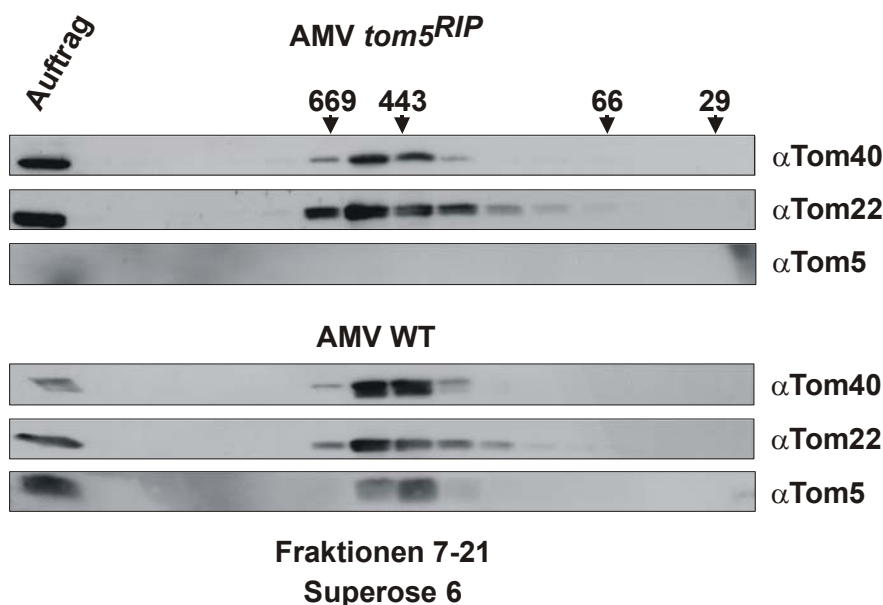


Abb. 11: Gelfiltration von Wildtyp- und *tom5^{RIP}* - Mitochondrien

Je 100 μ g Außenmembranvesikel (AMV) aus dem *tom5^{RIP}*- und einem *Neurospora* Wildtyp wurden in einem Solubilisierungspuffer mit 0,5% DDM aufgenommen und auf einer Superose6-Säule (Amersham Biosciences) aufgetrennt. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und die darin enthaltenen Proteine durch die Zugabe von TCA gefällt. Die Fractionen 7-21 wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot mit Antikörpern gegen Tom40, Tom22 und Tom5 analysiert. In einem Markerlauf wurden die Elutionsvolumen von Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), BSA (67 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) bestimmt und auf die Fractionen übertragen.

Es stellte sich die Frage, ob der TOM-Komplex ohne Tom5 in Harnstoff oder Detergens weniger stabil ist als der Wildtyp-Komplex. Es war bekannt, dass TOM-Core-Komplex noch in 4 M Harnstoff bzw. 1% Octylglycosid stabil ist. In diesem Experiment wurden Mitochondrien in 1% DDM solubilisiert und jeweils bis zu 6 M Harnstoff bzw. 3% Octylglycosid zum Solubilisierungspuffer zugesetzt (Abb. 12). Das solubilierte Material wurde mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese und Immunoblot

analysiert. Die Dekoration von Tom40 zeigte, dass der TOM-Core-Komplex wie erwartet in Gegenwart von 6 M Harnstoff bzw. 2% Octylglycosid zerfiel. Der *tom5^{RIP}*-TOM-Komplex verhielt sich wie der Wildtyp-Komplex. Die Deletion von Tom5 führt nicht zu einem Stabilitätsverlust des TOM-Komplexes.

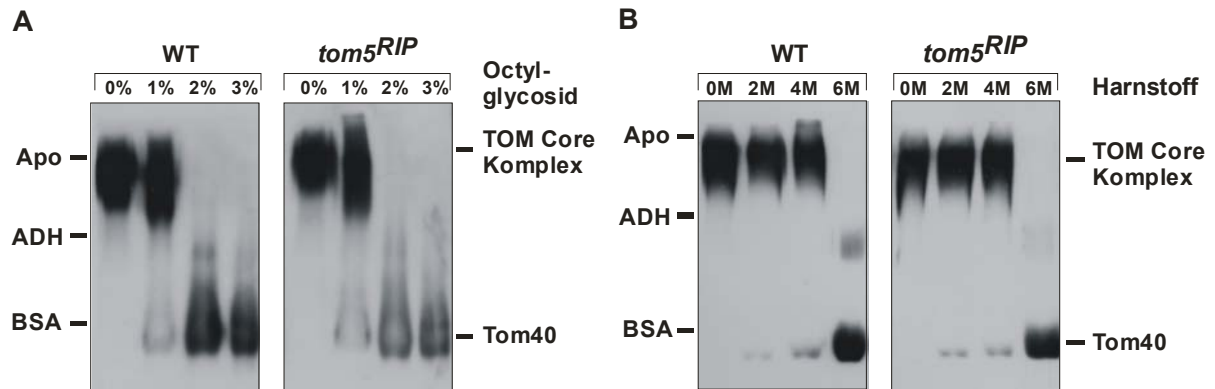


Abb. 12: Zerlegung des TOM-Core-Komplexes durch Octylglycosid und Harnstoff

Außenmembranvesikel aus dem Wildtyp (WT) bzw. dem Tom5-Deletionsstamm (*tom5^{RIP}*) wurden in Gegenwart von DDM für 20 Minuten bei 4°C solubilisiert. Dem Solubilisierungspuffer waren (A) 0-3% Octylglycosid und (B) 0-4 M Harnstoff zugesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die gelösten Proteine mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese und Immunoblot gegen Tom40 analysiert. Als Größenmarker dienen Apoferritin (Apo, 443 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH, 155 kDa) und bovines Serumalbumin (BSA, 67 kDa).

Mitochondrien aus einem Hefestamm, in dem Tom5 deletiert worden war, wiesen geringere Importraten für alle Arten von mitochondrialen Präproteinen auf (Dietmeier *et al.*, 1997). Entsprechend sollte das Importverhalten von Mitochondrien aus dem *Neurospora tom5^{RIP}*-Stamm überprüft werden. Hierfür wurden Präproteine der Außenmembran, des Intermembranraumes, der Innenmembran und der Matrix ausgewählt. Beispielhaft sind hier die Importkinetiken für Tom40, Tim9, Tim23 und Su9-DHFR gezeigt (Abb. 13). Für keines der verwendeten Präproteine konnte im Importverhalten ein Unterschied zu der Kinetik des Imports in Wildtyp-Mitochondrien festgestellt werden. Eine Rezeptor- oder Rezeptor-ähnliche Funktion des Tom5 wie für den Hefe TOM-Komplex postuliert (Dietmeier *et al.*, 1997), konnte nicht nachgewiesen werden.

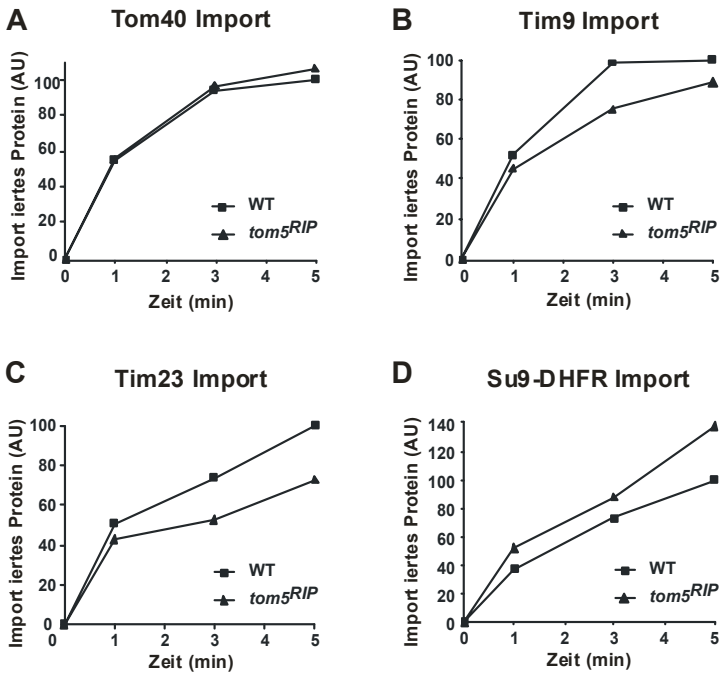


Abb. 13: Kinetiken des Imports von Präproteinen in Wildtyp- und tom5^{RIP}-Mitochondrien

Frisch isolierte Mitochondrien aus einem Wildtyp- (WT) und einem Tom5-Deletionsstamm (tom5^{RIP}) wurden für 1-5 Minuten mit radioaktiv markierten Präproteinen (A) der Außenmembran (Tom40), (B) des Intermembranraums (Tim9), (C) der Innenmembran (Tim23) und (D) der mitochondrialen Matrix (Su9-DHFR) inkubiert. Nicht importiertes Material wurde durch Proteinase K verdaut, die Mitochondrien gewaschen und in Lämmli aufgenommen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie quantifiziert. Der Wert für den Wildtypimport nach 5 Minuten wurde auf 100 Arbitrary Units (AU) gesetzt.

Es wurde beschrieben, dass die Deletion von Tom5 in Hefe die Assemblierung von Tom40 in den 400 kDa Komplex beeinträchtigt (Dietmeier *et al.*, 1997). In *Neurospora tom5^{RIP}*-Mitochondrien konnte kein solcher Defekt gezeigt werden (Abb. 14). Radioaktiv markiertes Tom40 assemblierte zunächst in einen ersten Intermediats-Komplex, der eine Interaktion von Tom40 mit dem TOB-Komplex repräsentiert (Paschen *et al.*, 2003). Danach wurde im zweiten Assemblierungsschritt ein kleinerer Komplex von Tom40 und dann die vollständige Zusammensetzung des Komplexes beobachtet. Eine Rolle von *Neurospora* Tom5 in der Assemblierung von Tom40 konnte nicht gezeigt werden.

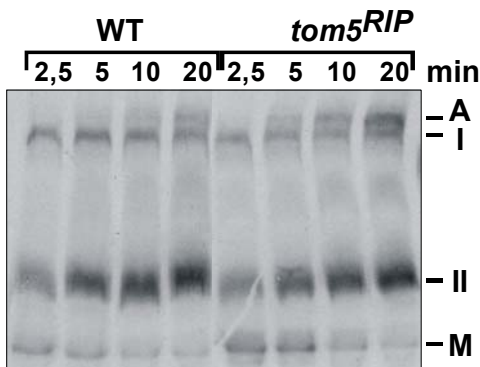


Abb. 14: Assemblierung von Tom40

Mit [³⁵S]Methionin radioaktiv markiertes Tom40 wurde für 2,5-20 min mit je 50 µg Wildtyp- oder tom5^{RIP}-Mitochondrien auf 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit SET-Puffer gewaschen und in 1% Digitonin enthaltenden Solubilisierungspuffer aufgenommen. Die löslichen Bestandteile wurden über eine Blau-Nativ-Gel-elektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und über Autoradiographie ausgewertet. M beschreibt das Tom40-Monomer, I das 1. Assemblierungsintermediat, II das 2. Assemblierungsintermediat und A den vollständig assemblierten TOM complex.

3.1.4 Vergleichende Analyse von Tom5 in *Neurospora* und Hefe

Es stellte sich die Frage, worin der Unterschied zwischen den TOM-Komplexen aus *Neurospora* und Hefe besteht, die sich aus homologen Komponenten zusammensetzen. Hierzu wurden Mitochondrien aus beiden Organismen bei 0°C, 30°C und 37°C solubilisiert und das Laufverhalten mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese verglichen (Abb. 15). Der TOM-Komplex aus *Neurospora crassa* zeigte keine Temperaturabhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität, unabhängig der Präsenz von Tom5 im Komplex. Im Gegensatz hierzu war in Hefe bei Wildtyp-Mitochondrien eine Temperaturabhängigkeit des Laufverhaltens des TOM-Komplexes in der Blau-Nativ-Gelelektrophorese zu beobachten. TOM-Komplex aus dem Hefe Tom5-Deletionsstamm zeigte einen Laufunterschied zwischen 0°C und 30°C, aber keinen zwischen 30°C und 37°C. Je höher die Temperatur war, desto größer war die Mobilität des TOM-Komplexes im Gel. Dies läßt auf eine Veränderung des Komplexes in Abhängigkeit von der Temperatur schließen.

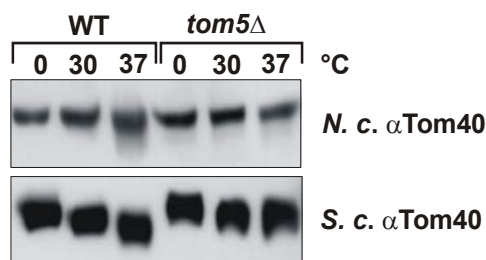


Abb. 15: Elektrophoretische Mobilität des TOM Komplexes in der BNGE

Je 50 µg Mitochondrien aus Wildtyp- (WT) und Tom5-Deletionsstämmen (*tom5Δ*) aus den Organismen *Neurospora crassa* (*N.c.*) und *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) wurden mit Digitonin bei den Temperaturen 0°C, 30°C und 37°C solubilisiert. Das Solubilisat wurde abzentrifugiert und der Überstand auf einem 6-13%igen Blau-Nativ-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Antikörpern gegen *Neurospora* Tom40 und Hefe Tom40 dekoriert.

In einem weiteren Experiment sollte die Mobilität verschiedener Hefe TOM-Komplexe in der Blau-Nativ-Gelelektrophorese verglichen werden, um einen Einfluß von Tom5 auf eine temperaturabhängige Veränderung des Hefe-Komplexes beurteilen zu können. Hierbei wurden Mitochondrien eines weiteren Stammes verwendet, in dem das Tom5 durch ein Fusionsprotein bestehend aus der N-terminalen cytosolischen Domäne des Fis1 und der C-terminalen Transmembrandomäne des Hefe-Tom5 ersetzt wurde. Eine Transformation des *tom5Δ* Hefestammes mit diesem Fusionsprotein ist ausreichend, um ein Wachstum der Zellen auf 37°C zu gewährleisten (Abb.4; Habib *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2003). In der Blau-Nativ-Gelelektrophorese konnte eine Assemblierung des Fusionsproteins in den TOM-Komplex nachgewiesen werden (Habib *et al.*, 2003). Die Mitochondrien aus vier

verschiedenen Hefe-Stämmen - Wildtyp, *tom5Δ*, *tom5Δ* + N.c. Tom5, *tom5Δ* + Fis1-Tom5C – wurden bei 37°C solubilisiert und im Blau-Nativgel aufgetrennt (Abb. 16). Es war ein deutlicher Unterschied im Laufverhalten zwischen Wildtyp- und *tom5Δ*-TOM-Komplexen zu erkennen. Desweiteren verhielt sich der TOM-Komplex, in dem das Hefe-Tom5 durch das *Neurospora* Homolog ersetzt wurde, betreffend der Mobilität wie der Wildtyp-Komplex. Hefe TOM-Komplex, der das Fis1-Tom5C Fusionsprotein anstelle von Tom5 enthält, verhielt sich in der Blau-Nativ-Gel-Analyse ebenfalls wie der Wildtyp-Komplex.

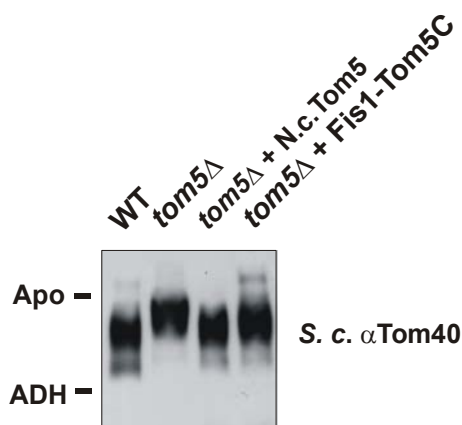


Abb. 16: Vergleich des elektrophoretischen Laufverhaltens verschiedener TOM-Komplexe in *S. cerevisiae*

Je 50 µg Mitochondrien aus den vier verschiedenen Hefe-Stämmen Wildtyp (WT), Tom5-Deletion (*tom5Δ*), Tom5-Deletion mit *Neurospora* Tom5 auf Plasmid (*tom5Δ* + N.c. Tom5) und Tom5-Deletion mit einem Fusionsprotein aus dem N-Terminus von Fis1 und der C-Terminale Transmembrandomäne von Hefe Tom5 auf Plasmid (*tom5Δ* + Fis1-Tom5C) wurden bei 37°C mit Digitonin solubilisiert und mittels BNGE analysiert. Im Immunoblot wurde ein Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tom40 (*S.c.* αTom40) verwendet.

Die unterschiedliche Mobilität der Hefe TOM-Komplexe bestätigte die Annahme, dass die Hefe und *Neurospora* TOM-Komplexe sich hinsichtlich ihrer temperaturabhängigen Anpassungsfähigkeit unterscheiden. Für den *Neurospora* TOM-Komplex war im Gegensatz zum Hefe TOM-Komplex keine Veränderung des Laufverhaltens in Abhängigkeit von Tom5 und der Temperatur zu erkennen.

Es stellte sich die Frage, ob Tom5 für die Stabilität des Hefe TOM-Komplexes eine Rolle spielt. TOM-Komplex aus Hefe lässt sich in DDM zerlegen, ähnlich dem *Neurospora* TOM-Komplex, der in geringen Konzentrationen von Octylglycosid zerfällt. Die Zugabe von 0,2% DDM zum Solubilisierungspuffer der Mitochondrien war bereits ausreichend, um im Wildtyp-Komplex die Bildung eines ca. 100 kDa großen, Tom40 enthaltenden, Zerfallsproduktes zu beobachten (Abb. 17A). In Abwesenheit von Tom5 war eine deutlich geringere Menge des 100 kDa Komplexes zu erkennen. Vermutlich ist das Tom40 Protein aggregiert, auch das *Neurospora* Tom40 tendiert nach seiner Aufreinigung zur Aggregation (Ahting *et al.*, 2001).

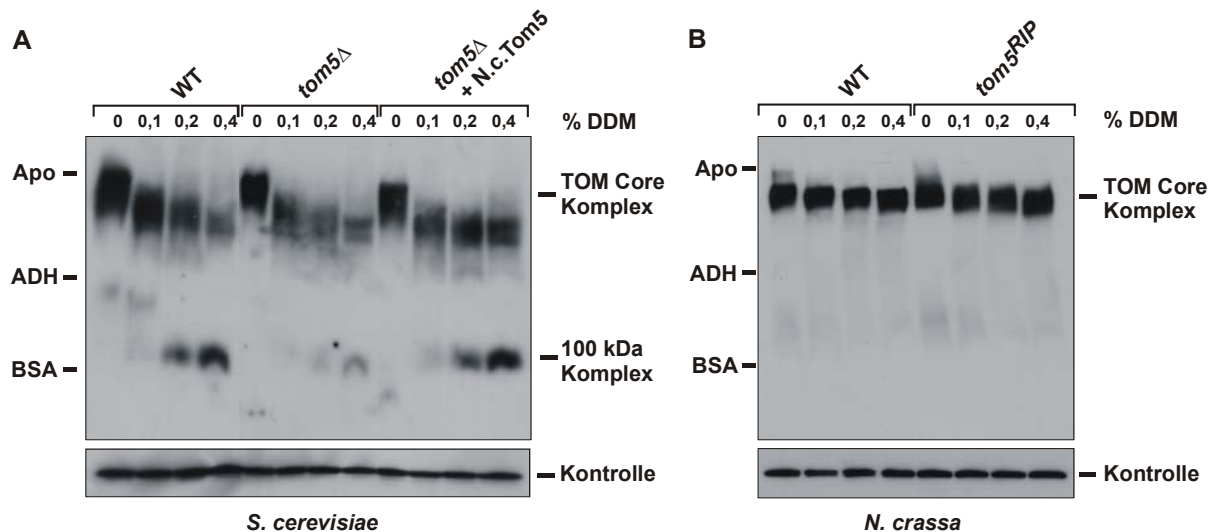


Abb. 17: Ein Vergleich der Stabilität der TOM-Core-Komplexe von *S. cerevisiae* und *N. crassa*

(A) *S. cerevisiae* Mitochondrien aus einem Wildtyp (WT), einem Tom5-Deletionsstamm (*tom5* Δ) und einem Stamm, in dem das Hefe Tom5 durch das *Neurospora* Tom5 ersetzt wurde (*tom5* Δ + N.c. Tom5), wurden bei 37°C in Digitonin solubilisiert. Dem Solubilisierungspuffer waren 0-0,4% n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) zugesetzt. Ein Teil des solubilisierten Materials wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot gegen Tom40 analysiert, um die verwendeten Proteinmengen standardisieren zu können (Kontrolle). Das restliche solubilisierte Material wurde abzentrifugiert und gleiche Mengen des Überstandes in einem Blau-Nativ-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper gegen Hefe Tom40 dekoriert. (B) Das gleiche Experiment wie in (A) beschrieben wurde mit *N. crassa* Mitochondrien aus einem Wildtyp (WT) und einem Tom5-Deletionsstamm (*tom5*^{RIP}) unter Verwendung eines Antikörpers gegen *N. crassa* Tom40 durchgeführt. Als Marker wurden Apoferritin (Apo; 443 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH; 155 kDa) und bovines Serumalbumin verwendet (BSA; 67 kDa).

Wurde das Hefe Tom5-Protein durch sein *Neurospora* Homolog ersetzt, konnte wie bei Wildtyp-Mitochondrien die Bildung eines 100 kDa Komplexes beobachtet werden. Das gleiche Experiment wurde zur Kontrolle auch mit *Neurospora* Mitochondrien aus dem Wildtyp- und dem *tom5*^{RIP}-Stamm durchgeführt (Abb. 17B). In *Neurospora* Mitochondrien konnte weder der TOM-Core-Komplex noch der *tom5*^{RIP}-Komplex in DDM zerlegt werden. Dies zeigte, dass der *Neurospora* TOM-Komplex eine deutlich höhere Stabilität als der Hefe TOM-Komplex aufweist. Im Hefe TOM-Komplex scheint hingegen die Präsenz von Tom5 eine Voraussetzung für die Stabilität des Komplexes und damit für die Aufrechterhaltung der Importfunktion zu sein.

3.2 Kristallisation des TOM-Komplexes

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den TOM-Komplex zu kristallisieren und mittels Röntgenbeugung Informationen über die Struktur des Komplexes zu erhalten. Der TOM-Holo-Komplex, der neben der Core-Struktur bestehend aus Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 auch die Rezeptoruntereinheiten Tom70 und Tom20 enthält, konnte aus *Neurospora crassa* nur in Digitonin aufgereinigt werden. Digitonin ist in wässriger Lösung nicht stabil und fällt nach 3-7 Tagen in kristalliner Form aus. Der TOM-Holo-Komplex war daher für die Proteinkristallisation ungeeignet. Der TOM-Core-Komplex konnte hingegen mindestens 95% rein in n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) aus *Neurospora crassa* Mitochondrien gereinigt werden (Ahting *et al.*, 1999). Der nach bereits etabliertem Protokoll isolierte Komplex (Abb. 18) wurde dialysiert und aufkonzentriert. So wurden 2-8 mg TOM-Core-Komplex erhalten und für Kristallisationsexperimente verwendet.

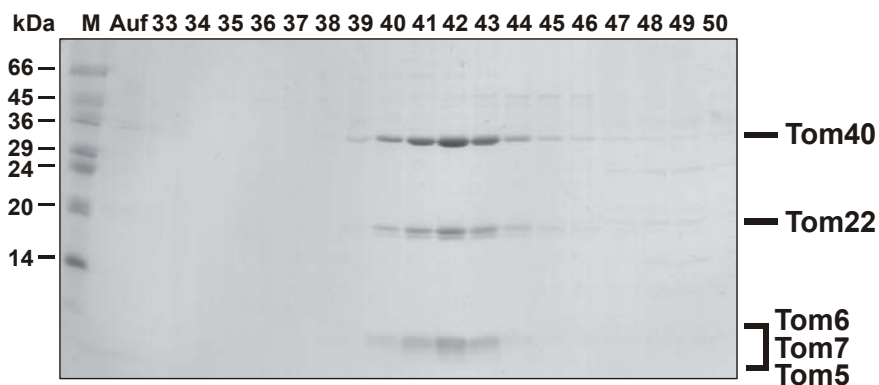


Abb. 18: Reinigung des TOM-Core-Komplexes aus *Neurospora crassa* Mitochondrien

Aus *Neurospora crassa* isolierte Mitochondrien wurden in DDM solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Nach einem Waschschrift mit 40 mM Imidazol wurde der TOM-Core-Komplex mit 300 mM Imidazol eluiert. Der TOM-Komplex in Imidazol wurde auf eine ResourceQ-Säule (6 ml) aufgetragen (Auf, 20 μ l). Mittels eines linearen Salzgradienten (0-600 mM KCl) wurden Verunreinigungen abgetrennt. Der TOM-Core-Komplex eluierte bei ca. 330 mM KCl, das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Jeweils 5 μ l der Fraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde die Reinheit des Komplexes in der Coomassie-Färbung überprüft. In den Fraktionen 39-44 ist der gereinigte TOM-Core-Komplex zu sehen.

Initiale Kristallisationsparameter des TOM-Core-Komplexes wurden über die von Hampton Research erhältlichen Pufferzusammensetzungen (Crystal Screen I und II, MembFac Screen) bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml und einer Inkubationstemperatur von 20°C im hängenden Tropfen gefunden. Unter der Bedingung 0,2 M Magnesiumchlorid, 0,1 M HEPES pH 7,5, 30% v/v Polyethylenglykol 400 wuchsen innerhalb von zwei Tagen kleine Kristalle (Abb. 19),

die im silbergefärbten Polyacrylamidgel als TOM-Core-Komplex enthaltende Kristalle charakterisiert wurden (Abb. 20).

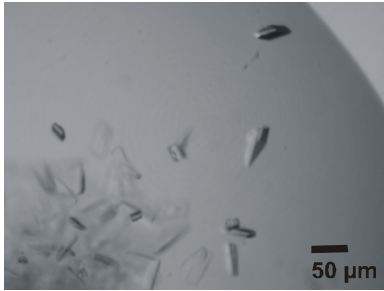


Abb. 19: Kristallisation des TOM-Core-Komplexes

Der über eine ResourceQ-Säule gereinigte TOM-Core-Komplex wurde gegen 10 mM KAc/MOPS, 0,03% DDM dialysiert. Das dialysierte Material kristallisierte bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in 0,2 M Magnesiumchlorid, 0,1 M HEPES Na pH 7,5, 30% v/v Polyethylenglykol 400

Die Kristalle enthielten alle Komponenten des TOM-Core-Komplexes: Tom40, Tom22, Tom6, Tom7 und Tom5. Auffällig war, dass das Abbauprodukt von Tom6 im Kristall im Vergleich zum gereinigten TOM-Komplex abgereichert wurde. Dies deutete auf eine Selektion der Kristalle auf intaktes Tom6 hin.

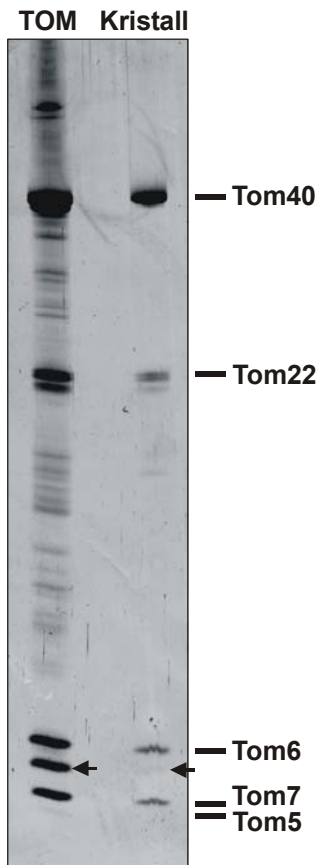


Abb. 20: Auftrennung von TOM-Kristallen mittels SDS-PAGE

Kristalle wurden dem Kristallisationstropfen entnommen, dreimal in Mutterlauge gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgelöst. Zur Kontrolle wurde ein nicht auskristallierter Tropfen vollständig in Probenpuffer aufgenommen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem langen Harnstoff-SDS-Gel. Die Färbung des Gels wurde für den Nachweis geringer Proteinmengen mit Silber durchgeführt. Im Kristall sind alle Komponenten des TOM-Core-Komplexes vertreten: Tom40, Tom22, Tom6, Tom7 und Tom5. Mit den Pfeilen ist ein Abbauprodukt von Tom6 gekennzeichnet, das in den Kristallen abgereichert ist. Tom5 ist in der Silberfärbung nur schlecht angefärbt.

In weiterführenden Kristallisationsansätzen wurden die Proteinkonzentration, die Pufferbedingung sowie der pH-Wert und der Salzgehalt optimiert. Große, wenig verwachsene Kristalle wurden in einem Kristallisationspuffer zusammengesetzt aus 100 mM Ammoniumcitrat pH 4,5, 50 mM Tris pH 7,2 und 22-28% PEG400 bei einer Proteinkonzentration von 10-15 mg/ml erhalten (Abb. 21). Die Tropfen setzten sich

aus je 1,5 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoirolösung zusammen. Die PEG400-Konzentration war der entscheidende Parameter für das Kristallisationsverhalten des Komplexes und mußte für jede TOM-Isolierung neu bestimmt werden. Hierfür wurde die PEG400-Konzentration in den Kristallisationsansätzen zunächst in 1%-Schritten angehoben und nach der Bestimmung der Kristallisationskonzentration in einem zweiten Ansatz in 0,25%-Stufen optimiert. Problematisch war, dass jeweils 1%-Unterschiede in der PEG400-Konzentration zu deutlich unterschiedlichem Proteinverhalten wie Untersättigung, Kristallisation, Mikrokristallisation und Präzipitatbildung führte. Für PEG300 war das Kristallisationsfenster ähnlich klein, mit höher molekularen Polyethylenglykolen (PEG600 - PEG8000) konnten keine Kristalle erhalten werden.

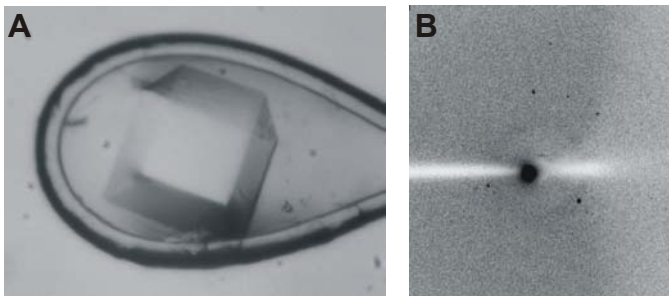


Abb. 21: Beugungsmuster eines TOM-Core-Komplex Kristalles

(A) Ein dreidimensionaler Kristall (400 µm Kantenlänge) wurde im Loop auf das Lazerussystem der Firma Proteros (Martinsried) montiert. Über dieses System wurden die Feuchte und die Temperatur des Kristalls konstant gehalten. Die Messung im Röntgenstrahl erfolgte bei 20°C. (B) Beugungsreflexe waren bis zu einer Auflösung von maximal 14 Å zu erkennen.

Die erhaltenen TOM-Core-Komplex Kristalle beugten bis zu einer maximalen Auflösung von 8 Å und erlaubten keine Bestimmung der Raumgruppe.

3.2.1 Optimierung der Kristallordnung

Zunächst wurde versucht, die Ordnung und damit das Beugungsverhalten der TOM-Core-Komplex Kristalle durch die Zugabe von Additiven zum Kristallisationstropfen zu verbessern. Die Zugabe von Glycerin führte nicht zu einer Verbesserung der Röntgenbeugung. In Additiv-Screens (Hampton Research) wurden dagegen Substanzen gefunden, die zunächst das Kristallwachstum verbesserten. Benzamidin (2-4%) bewirkte glattere Oberflächen und schärfere Kanten der Kristalle. Hexantriol, ein häufig verwendetes Additiv bei der Kristallisation von Membranproteinen, zeigte

keine solche Wirkung. Die Zugabe von 2% Natriumiodid verzögerte das Kristallwachstum um fünf bis sieben Tage, die Kristalle wurden größer und wiesen eine andere Morphologie auf (Abb. 22). Methanol (5-10%) zugesetzt zur Proteinlösung führte ebenfalls zu größeren Kristallen. Keines der Additive verbesserte jedoch das Beugungsverhalten der Kristalle.

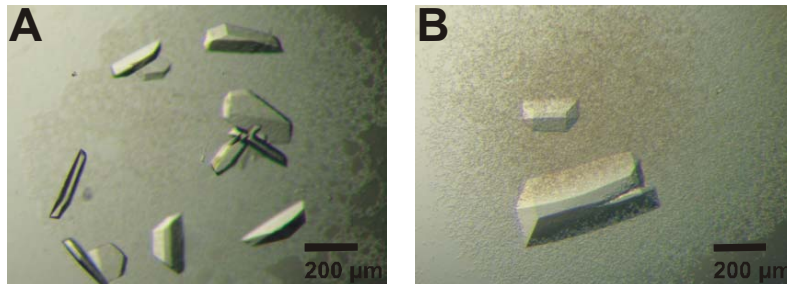


Abb. 22 Kristallisation des TOM-Core-Komplexes mit Additiven

Der dialysierte und aufkonzentrierte TOM-Core-Komplex wurde bei einer Proteinkonzentration von 10-15 mg/ml im hängenden Tropfen kristallisiert. (A) Kristalle wurden erreicht bei 22-28% PEG400, 100 mM Ammoniumcitrat pH 4,5 und 50 mM Tris pH 7,2. (B) Die Zugabe von 2% Natriumiodid zum Tropfen bewirkte eine verlangsamte Kristallisation, wodurch größere Kristalle erzielt werden konnten.

3.2.2 Verbesserung der Homogenität des TOM-Core-Komplexes

Der gereinigte TOM-Core-Komplex enthielt neben den bekannten Komponenten Abbauprodukte von Tom22 und Tom6. Die Selektion der Kristalle auf vollständiges Tom6 (Abb. 20) legte die Vermutung nahe, dass die Abbauprodukte zu einer Fehlordnung innerhalb der Kristalle führen könnten. Zudem war der Abbau von Tom22 bei den jeweiligen TOM-Isolierungen unterschiedlich stark ausgeprägt. Durch N-terminale Sequenzierung des Abbauproduktes von Tom22 wurde ein Fehlen der ersten vier N-terminalen Aminosäuren festgestellt. Möglicherweise war die Verunreinigung der Mitochondrien mit Proteasen unterschiedlich hoch oder die Stärke des Abbaus hing von äußeren, variablen Faktoren wie pH-Wert und Temperatur ab. Unterschiedliche getestete Pufferbedingungen ergaben, dass bei pH 8,5 kein Abbau von Tom22 mehr auftrat (Abb. 23). Vermutlich wurde der Abbau von vakuolären Proteasen verursacht, die bei basischem pH-Wert inaktiv sind. Da die vakuolären Verunreinigungen bereits während der Mitochondrien-Präparation bestehen, wurden alle weiteren Mitochondrien- und Außenmembranreinigungen mit 20 mM Tris pH 8,5 statt 20 mM MOPS pH 7,2 als Puffersubstanz durchgeführt. Die

Reinigung des TOM-Core-Komplexes über eine Ni-NTA-Säule wurde ebenfalls von KAc/MOPS-Puffer, pH 7,2 auf Tris-Puffer, pH 8,5 umgestellt. Die anschließende Reinigung und Konzentrierung des TOM-Core-Komplexes über eine ResourceQ-Säule wurde weiterhin bei pH 7,2 durchgeführt, da bei diesem pH-Wert die beste Abtrennung von Verunreinigungen erreicht wurde. Das Beugungsverhalten der aus Abbau-freien TOM-Komplexen erhaltenen Kristalle zeigte keine Verbesserung im Vergleich zu den zuvor erhaltenen Beugungsdaten.

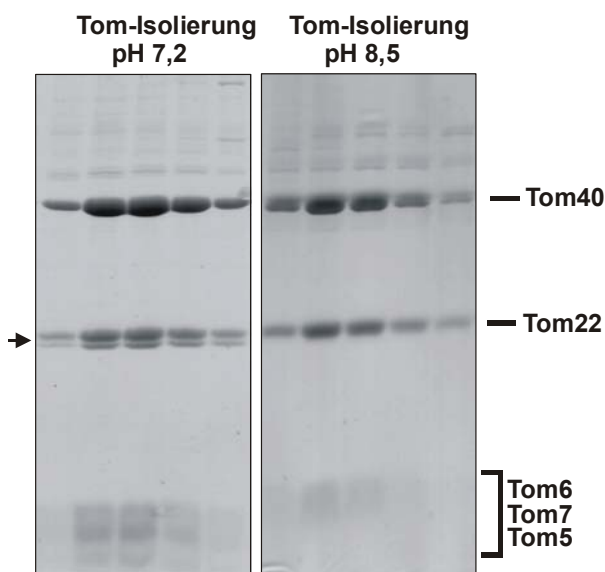


Abb. 23: Einfluß des pH-Wertes auf den Tom22-Abbau.

Die in MOPS-Puffer pH 7,2 isolierten Mitochondrien wurden in KAc/MOPS-Puffer pH 7,2 und Detergens solubilisiert. Die Ni-NTA- und ResQ-Säulenläufe erfolgten ebenfalls in KAc/MOPS-Puffer pH 7,2 (siehe Abb. 18). Die Hauptfraktionen der ResQ-Säule bei pH 7,2 sind links abgebildet, ein Pfeil markiert das Abbau-Produkt von Tom22. In der rechten Hälfte sind die Hauptfraktionen einer TOM-Isolierung bei pH 8,5 zu sehen. Hier wurden bereits die Mitochondrien in Tris pH 8,5 isoliert. Die Solubilisierung erfolgte in Tris-Puffer pH 8,5. Die Reinigung über Ni-NTA wurde mit Tris-Puffer pH 8,5 durchgeführt, allerdings wurde in einem zweiten Waschschrift und im Elutions-puffer KAc/MOPS pH 7,2 verwendet. Die weitere Reinigung verlief wie unter Abb. 18 beschrieben.

Eine weitere mögliche Ursache für unzureichende Kristallordnung stellt der Histidyltag am C-Terminus des Tom22 dar. Daher wurde ein Verfahren etabliert, den TOM-Core-Komplex nativ aus *Neurospora crassa* Wildtyp-Mitochondrien zu reinigen. Hierfür wurden zunächst Außenmembranvesikel aus Wildtyp-Mitochondrien gewonnen. Der TOM-Komplex konnte so im Vergleich zu anderen mitochondrialen Proteinen aufkonzentriert werden (siehe 3.3.1). Zudem wurde für die Etablierung des Reinigungsverfahren das Wissen verwendet, dass TOM-Core-Komplex sehr affin an ResourceQ-Säulenmaterial bindet (Elution mit ca. 330 mM KCl, Abb. 18).

Außenmembranvesikel wurden in DDM solubilisiert und die gelösten Proteine über eine ResourceQ-Säule gegeben. Der Hauptanteil der Proteinmenge, das mitochondriale Porin, band nicht an das ResourceQ-Material und befand sich im Durchlauf (Abb. 24). Der Großteil der gebundenen Proteine konnte mit 200 mM KCl von der Säule eluiert werden und befand sich in den frühen Fraktionen der Elution.

TOM-Core-Komplex ohne His-tag eluierte mit ca. 330 mM KCl und war zu ca. 90% rein. Das Material kristallisierte unter den gleichen Bedingungen wie TOM-Core-Komplex mit His-tag, allerdings konnte auch mit diesen Kristallen in Beugungsexperimenten keine Verbesserung der Auflösung erzielt werden.

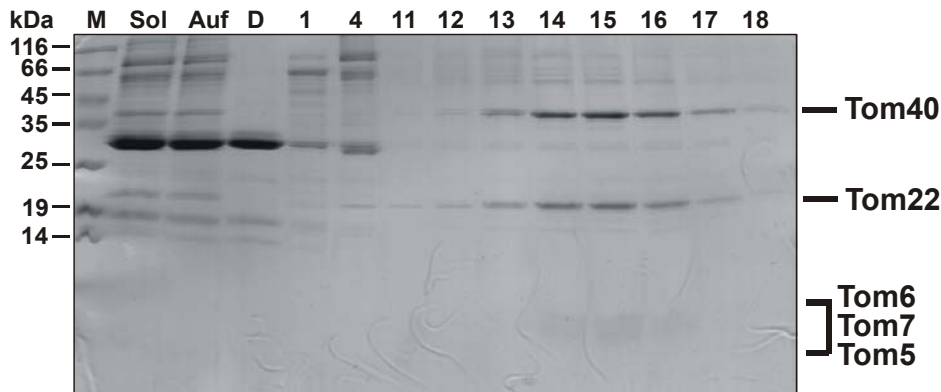


Abb. 24: Isolierung von TOM-Core-Komplex aus Außenmembranvesikeln

40 mg *Neurospora crassa* Wildtyp-Außenmembranvesikel wurden in DDM solubilisiert (Sol), die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand auf eine ResourceQ-Säule aufgetragen (Auf). Im Durchlauf befanden sich hauptsächlich Porin und zwei weitere Proteine. Die meisten gebundenen Außenmembranproteine ließen sich mit 200 mM KCl von der Säule eluieren (Fraktionen 1 und 4), der TOM-Core-Komplex eluierte erst mit ca. 330 mM KCl (Fraktionen 13-17). Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt.

In einem weiteren Ansatz sollten ungeordnete Proteinanteile des TOM-Core-Komplexes, die Protein-Protein-Kontakte im Kristall stören könnten, durch den partiellen Abbau mit Proteasen entfernt werden. Durch die Verwendung von Trypsin konnten im Gegensatz zu den Proteasen Papain und Chymotrypsin definierte Proteinfragmente der Tom-Komponenten erhalten werden. Nach einem präparativen Trypsinverdau wurde die Probe auf eine TSK G-4000PW_{XL}- Gelfiltrationssäule (Toso-Haas) geladen, um den TOM-Komplex vom Trypsin abzutrennen. Zur Kontrolle wurde unbehandelter TOM-Komplex unter gleichen Bedingungen über eine Gelfiltration gereinigt (Abb. 25A). Der Trypsinverdau führte bei Tom22 zu einem spezifischen Fragment von ca. 17 kDa. Bei Tom40 wurden hingegen nur wenige Aminosäuren abverdaut. Ein proteolytischer Abbau von Tom6 und Tom7 durch Trypsin konnte nicht nachgewiesen werden. Tom5 wurde nicht von Trypsin angegriffen (siehe 3.1.2).

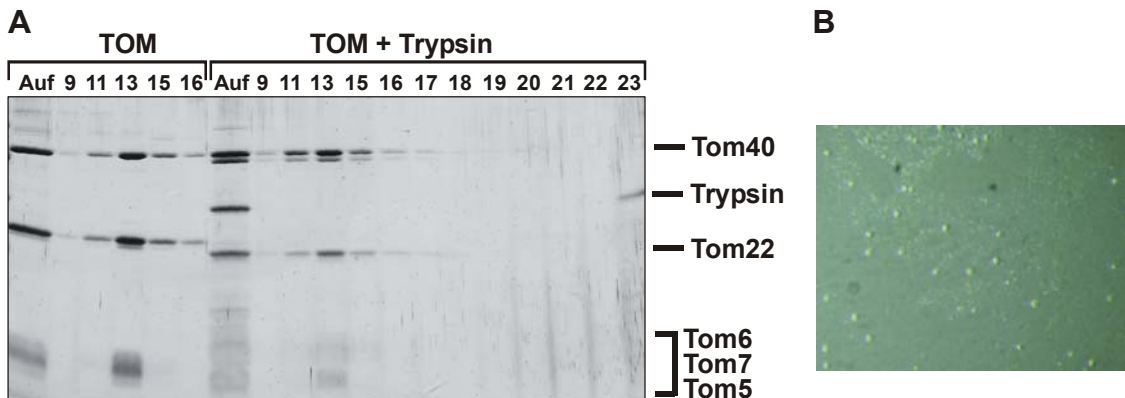


Abb. 25: Präparativer Trypsinverdau des TOM-Core-Komplexes

(A) 1 mg gereinigter TOM-Core-Komplex wurde mit 6 µg Trypsin in einem Volumen von 100 µl für 20 min auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt und die Probe direkt auf die Gelfiltrationssäule geladen (Auf, Auftrag). Es wurden 300 µl Fraktionen der Elution gesammelt. Der TOM-Komplex eluierte in den Fraktionen 9-16, Trypsin in Fraktion 23. Zum Vergleich wurde auch unbehandelter TOM-Core-Komplex über die TSK G-4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule gereinigt. Jeweils 5 µl des Auftrags und 20 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und nach der Auftrennung mit Silber gefärbt. Die Hauptfraktionen beider Gelfiltrationen wurden jeweils aufkonzentriert und für Kristallisationsexperimente unter Standardbedingungen verwendet. (B) Der mit Trypsin behandelte TOM-Core-Komplex zeigte noch eine Tendenz zur Kristallisation.

Die Hauptfraktionen der Elution (11-15) wurden aufkonzentriert und für Kristallisationsexperimente verwendet. Unter Standardbedingungen wurden nur kleine Kristalle erhalten (Abb 25B). Mit dem unverdauten Komplex wurden ebenfalls nur kleine Kristalle erzielt, vermutlich war die Detergentskonzentration (0,1% DDM) zu hoch. Bei niedrigerer DDM-Konzentration aggregierte jedoch das Protein auf der Säule und konnte nicht mehr für Kristallisationsansätze verwendet werden. Auch dieser Ansatz war nicht geeignet, geordnete Kristalle des TOM-Core-Komplexes für Röntgenbeugungsexperimente zu erhalten.

3.2.3 Kristallisation in Kapillaren

Gereinigter TOM-Core-Komplex wies eine deutliche Neigung zur Kristallisation auf. Daher wurde mit einer anderen Methode als der Kristallisation im hängenden Tropfen experimentiert. Bei der Kristallisation in Kapillaren wird das geordnete Kristallisationswachstum von einer Agarose-Matrix begünstigt (Ng *et al.*, 2003). Die Proteinlösung muss mit einer flüssigen Agaroselösung gemischt und in einer Kapillare aufgezogen werden. Nach der Polymerisation der Agarose wird mit Präzipitantz enthaltendem Kristallisationspuffer überschichtet. Der Puffer diffundiert in

die Agarose-Matrix ein und bildet einen Konzentrationsgradienten aus. Die Kristallisation erfolgt über eine langsame Zunahme der Präzipitantkonzentration entlang der Kapillare.

Für die Kristallisation in Kapillaren mußte zunächst die Hitzestabilität des TOM-Core-Komplexes überprüft werden. In kleinen Proben, die für je 10 Minuten auf 30°C, 40°C und 50°C erhitzt wurden, konnte keine Präzipitation des Komplexes nachgewiesen werden. Erst nach einer Erhitzung auf 60°C befand sich das Protein nach einem Zentrifugationsschritt (20 min, 110.000 xg) vollständig im Pellet. Die hohe Temperaturstabilität des Komplexes war eine gute Voraussetzung für die Kristallisation in Kapillaren, da die Protein-Agarosemischung für ca. 10 Minuten auf einer Temperatur von 30°C gehalten werden mußte. Mit dieser Methode wurden Kristalle des TOM-Core-Komplexes mit einer maximalen Kantenlänge von 300 µm erhalten, die direkt für Beugungsexperimente eingesetzt wurden (Abb. 26). Keiner dieser Kristalle zeigte eine Beugung des Röntgenstrahls.

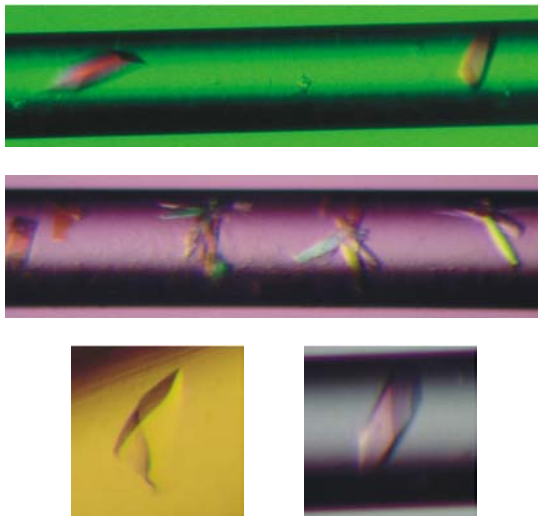


Abb. 26: Kristallisation in Kapillaren

Für die Kristallisation in Kapillaren wurde der TOM-Core-Komplex bei einer Konzentration von 15 mg/ml im Verhältnis 1:1 mit einer 0,5%igen Agaroselösung ("low melting" Agarose, Amersham) bei 30°C gemischt und in eine Glaskapillare aufgezogen. Nach Aushärten der Agarose wurde das untere Ende der Kapillare mit Nagellack versiegelt und das obere Ende mit 30 µl Puffer (100 mM Ammoniumcitrat pH 4,5; 50 mM Tris pH 7,2; 35% PEG400) überschichtet. Die Kapillaren wurden hängend bei 20°C gelagert. Kristalle traten nach 3-7 Tagen auf.

3.2.4 Austausch von Detergenzien

Membranproteine können nur durch die Anwesenheit von Detergenzien in Lösung gebracht bzw. in Lösung gehalten werden. Die Kristallisation von Membranproteinen und Membranproteinkomplexen wird jedoch durch die Anwesenheit von Detergens erschwert. Die Detergenzmizelle schirmt einen großen Proteinanteil ab und verhindert so die Ausbildung von Proteinkontakten im Kristall. Zudem neigen manche Detergenzien selbst zur Kristallisation.

Es stellte sich die Frage, ob n-Dodecyl- β -D-Maltosid das geeignete Detergens zur Kristallisation des TOM-Komplexes ist. Frühere Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass der TOM-Core-Komplex in n-Octyl- β -D-Glycosid, einem häufig in Kristallisationsansätzen von Membranproteinen verwendeten Detergens, in seine Untereinheiten zerfällt (Ahting *et al.*, 2001; siehe auch Abb. 12). In Triton X100 war der Komplex ebenfalls nicht stabil. Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) mußte in hohen Mengen eingesetzt werden, um den Komplex in Lösung zu halten, dies widersprach dem Ansatz, so wenig Detergens wie möglich in Kristallisationsansätzen zu verwenden. Statt dessen wurden Detergenzien mit anderen Kettenlängen als Konjugate der Maltosid-Kopfgruppe verwendet. Der TOM-Core-Komplex konnte in n-Decyl- β -D-maltosid, n-Undecyl- β -D-maltosid und n-Tridecyl- β -D-maltosid nach dem gleichen Protokoll gereinigt werden wie in n-Dodecyl- β -D-maltosid. Die Kristallisation des TOM Komplexes erfolgte in n-Undecyl- β -D-maltosid vergleichbar zu n-Dodecyl- β -D-maltosid. Eine Verbesserung der Beugung konnte nicht beobachtet werden. In n-Decyl- β -D-maltosid waren die Kristalle kaum reproduzierbar und in n-Tridecyl- β -D-maltosid konnte der TOM-Core-Komplex nicht zur Kristallisation gebracht werden.

In einem weiteren Experiment sollte bei dem bereits gereinigten TOM-Core-Komplex das n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) gegen andere Detergenzien ausgetauscht und die Stabilität des Komplexes überprüft werden. Dazu wurden analytische Mengen von gereinigtem und dialysiertem Komplex an eine ResourceQ-Säule (Volumen 1 ml) gebunden. Nach einem Waschschrift mit 50 Säulenvolumen ResA-Puffer mit dem zu testenden Detergens wurde die Säule mit einem linearen Gradienten aus den Puffern ResA und ResB in ebenfalls neuem Detergens eluiert. Durch eine Auftrennung der eluierten TOM-Komponenten im SDS-PAGE konnte für das Detergens C12E8 (H-(OCH₂CH₂)₈OCH₂(CH₂)₁₀CH₃) ein stabiler TOM-Komplex nachgewiesen werden. Die Untereinheiten Tom40, Tom22 und Tom6 waren in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen vorhanden. Die kleinen Tom-Komponenten Tom5 und Tom7 wurden hingegen mit dem Detergens C12E8 aus dem Komplex ausgewaschen (Abb. 27).

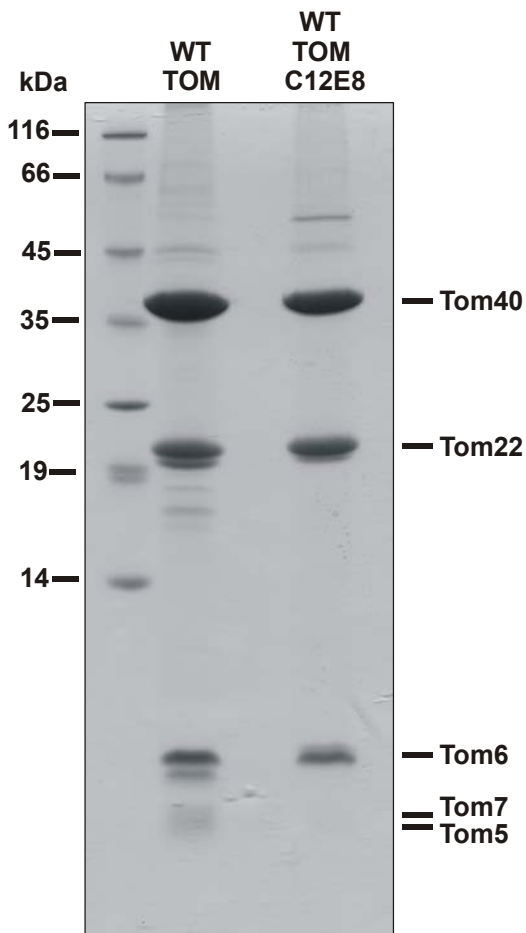


Abb. 27: Austausch von Detergens

400 µg gereinigter und dialysierter TOM-Core-Komplex wurde auf eine 1 ml ResourceQ-Säule geladen. Die Säule wurden mit 50 ml Puffer ResA (10% Glycerol, 50 mM KAc/MOPS pH 7,2, 0,1% C12E8) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit einem linearen Gradienten aus den Puffern ResA und ResB (ResA + 1 M KCl) eluiert. Jeweils 200 µg unbehandelter TOM-Core-Komplex und 200 µg des in C12E8 eluierten TOM-Komplexes wurden mit TCA gefällt und auf einem langen Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

3.2.5 Reinigung von TOM-Core-Komplex Mutanten

Bei dem Versuch des Detergens-Austausches konnte mit C12E8 ein Auswaschen der kleinen Tom-Komponenten Tom5 und Tom7 aus dem TOM-Komplex beobachtet werden. Möglicherweise gehen diese Komponenten auch während der Isolierung des TOM-Core-Komplexes in n-Dodecyl-β-D-maltosid teilweise verloren, wodurch substöchiometrisch aufgebaute TOM-Komplexe isoliert würden. Diese wären aufgrund ihrer Inhomogenität nicht in der Lage, geordnete, beugende Kristalle auszubilden. Frank Nargang (University of Alberta, Kanada) konstruierte daraufhin einen *Neurospora crassa* Stamm, der einen His-tag am Tom22 sowie eine Deletion des *tom5*-Gens (*tom5^{RIP}HT*) beinhaltet. Desweiteren wurde von ihm eine Doppelmutante *tom5^{RIP}Δtom7* hergestellt (LV-10-23). Diese Mutante war jedoch in Kombination mit einer Hexahistidyl-erweiterung des Tom22-Proteins nicht lebensfähig. Sowohl der *tom5^{RIP}HT*-Stamm als auch LV-10-23-Stamm wiesen keinen Wachstumsphänotyp auf. Die Komplexe konnten im blauen Nativgel als stabil nachgewiesen werden (Frank Nargang, persönliche Mitteilung).

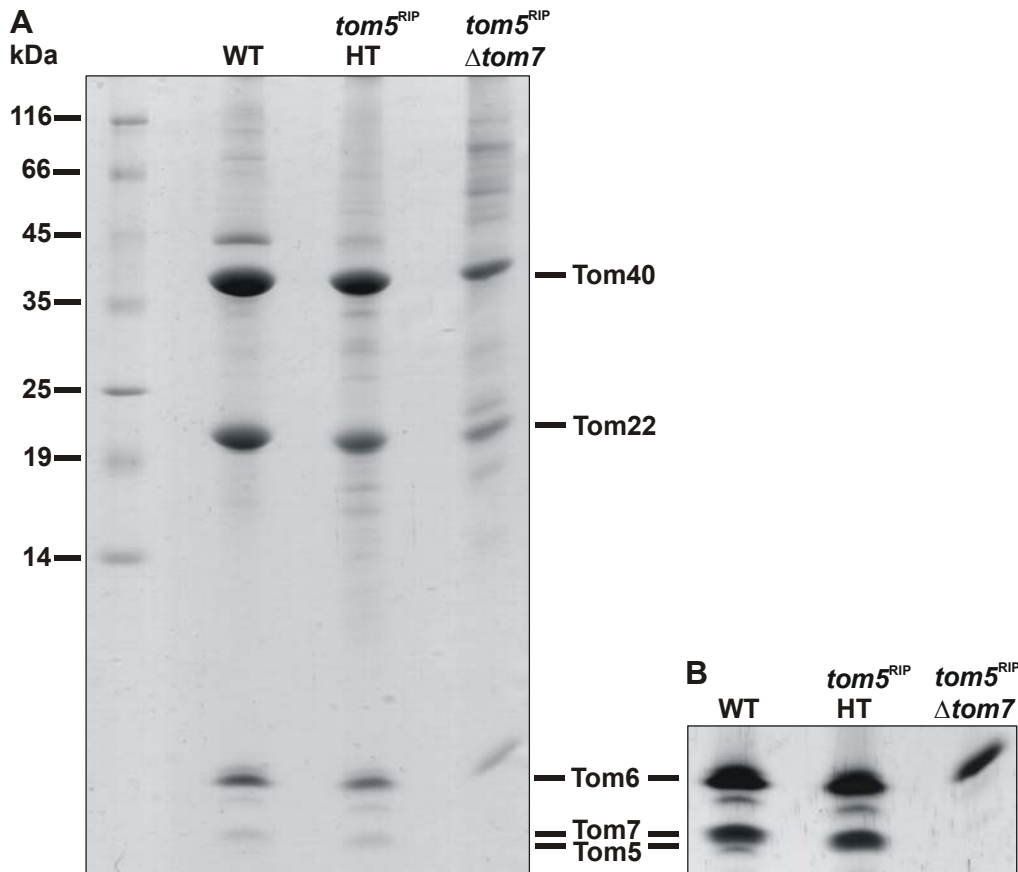


Abb. 28: Reinigung des TOM-Komplexes aus *tom5^{RIP} HT* und *tom5^{RIP} Δtom7* -Stämmen

(A) In einem Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel wurden je 150 µg der TOM-Komplex-Präparation aus den Stämmen GR107 (WT), *tom5^{RIP} HT* und LV-10-23 (*tom5^{RIP} Δtom7*) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Da die Färbung der kleinen Tom-Komponenten nur schwach war, wurde das Gel zudem in Silber gefärbt. (B) Der Ausschnitt des unteren Teil des Gels zeigt die kleinen Tom-Komponenten. Tom5 läßt sich mit Silber nur schwach anfärben.

Der *tom5^{RIP}*-TOM-Komplex konnte nach gleichem Protokoll wie der TOM-Core-Komplex über den His-tag in 0,1% n-Undecyl- oder 0,03% n-Dodecyl-β-D-maltosid gereinigt werden (Abb. 28). Mit einem Pipettierroboter wurden mit dieser *tom5^{RIP}*-TOM-Präparation und verschiedenen Pufferzusammenstellungen Kristallisationsansätze im Verfahren des sitzenden Tropfen mit einer Proteinkonzentration von 14 mg/ml und einer Tropfengröße von 0,4 µl angesetzt. Mit in n-Undecyl-β-D-maltosid gereinigtem *tom5^{RIP}*-TOM-Komplex wurden Kristalle durch Präzipitation mit PEG10.000 und PEG20.000 (Jena Screen 5) erhalten. Diese Kristalle konnten im hängenden Tropfen bisher nicht reproduziert werden.

Der TOM-Komplex aus der *tom5^{RIP} Δtom7*-Doppelmutante wurde aus Außenmembranvesikeln gereinigt. In ersten Experimenten konnten nur geringe Proteinmengen des *tom5^{RIP} Δtom7*-TOM-Komplexes in n-Dodecyl-β-D-maltosid

erhalten werden (Abb. 28). In initialen Screens (Jena Screen 1 und 5) mit einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml wurde das Wachstum von sehr kleinen Kristallen in ähnlichen Bedingungen erhalten, in denen auch der TOM-Core-Komplex kristallisiert (Jena Screen 1; A3: 15 % w/v PEG 400, 100 mM HEPES pH 7,5, 200 mM Magnesiumchlorid; A5: 25 % w/v PEG 400, 100 mM Natriumacetat pH 4,6, 100 mM Magnesiumchlorid). Diese Kristalle müssen mit einer neuen Reinigung des *tom5*^{RIP} Δ *tom7*-TOM-Komplexes reproduziert werden. Durch die Verwendung höherer Proteinkonzentrationen könnten dann größere Kristalle erzielt und deren Beugungseigenschaften untersucht werden.

3.3 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der mitochondrialen Außenmembran von *Neurospora crassa*

Zur Identifizierung weiterer bisher unbekannter Außenmembranproteine in Mitochondrien von *Neurospora crassa*, sollten Außenmembranvesikel möglichst rein isoliert werden und die Proteine einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen werden.

3.3.1 Reinheit mitochondrialer Außenmembranvesikel

Um möglichst wenige verunreinigende Proteine in der Außenmembranvesikelfraktion durch die sensitive Methode der Massenspektrometrie zu identifizieren, wurde zunächst die Kontamination der Außenmembranvesikel durch andere Zellorganellen und mitochondriale Innenmembranen untersucht. Je 50 µg Proteinmenge des Zellextrakts, der Mitochondrien und der Außenmembranvesikeln wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert (Abb. 29). Im Vergleich zum Zellextrakt wurden in der mitochondrialen Fraktion Mitochondrien, erkennbar an den Markerproteinen Tom40 und Tom22, aber auch Peroxisomen, nachgewiesen durch das Markerprotein Pex14, angereichert (Abb. 29A) Das cytosolisch lokalisierte Protein Nkin und Sec61, ein Protein des endoplasmatischen Retikulums, konnten in der mitochondrialen Fraktion im Gegensatz zum Gesamtzellextrakt nicht mehr nachgewiesen werden. Nach der Aufreinigung der Außenmembranvesikel (AMV) war die peroxisomale Verunreinigung nicht mehr vorhanden und die Markerproteine der Außenmembran Tom40 und Tom22 waren

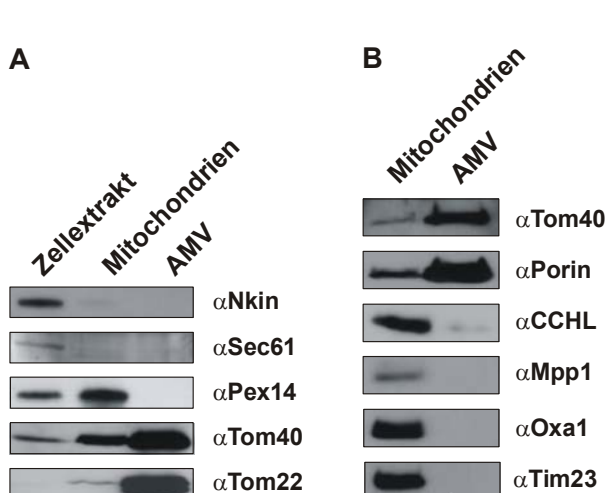


Abb. 29: Reinheit der Außenmembranvesikel

(A) Je 50 µg Zellextrakt, Mitochondrien und Außenmembranvesikel (AMV) wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen ein cytosolisches Protein (Nkin), ein ER-Protein (Sec61), Pex14 (peroxisomal), und die mitochondrialen Marker Tom40 und Tom22. (B) Je 50 µg Mitochondrien und AMV wurden wie in (A) behandelt und die Membran mit Antikörpern gegen Tom40 und Porin (Außenmembran), die Cytochrom C Häm Lyase (CCHL, Intermembranraum), die Matrix Processing Peptidase (MPP, Matrix), und die Innenmembranproteine Oxa1 und Tim23 dekoriert.

stark angereichert. Bei einer genaueren Untersuchung der Zusammensetzung der Außenmembranfraktion (Abb. 29B) konnten die Innenmembranproteine Oxa1 und Tim23 nicht nachgewiesen werden. Ebenso verhielt es sich mit einem Matrixprotein, der "Matrix Processing Peptidase" (MPP). Für Cytochrom C Häm Lyase (CCHL), ein Protein des Intermembranraumes, konnte ein sehr geringes Signal im Immunoblot detektiert werden. Insgesamt ist die Reinheit der Außenmembranvesikel sehr hoch, es konnte keine Kontamination durch Zellorganellen oder Innenmembranen und nur eine minimale Verunreinigung durch Intermembranraumproteine festgestellt werden. Die derart charakterisierten Außenmembranvesikel wurden für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet.

3.3.2 Massenspektrometrische Analyse der Proteine aus Außenmembranvesikeln

Im ersten Ansatz wurde eine Proteinmenge von 100 µg Außenmembranvesikeln mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein langes SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die gesamte Gelspur wurde in schmalen Banden ausgeschnitten und die Proben im Zentrallabor für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts mit Trypsin im Gel verdaut und die Peptide mittels

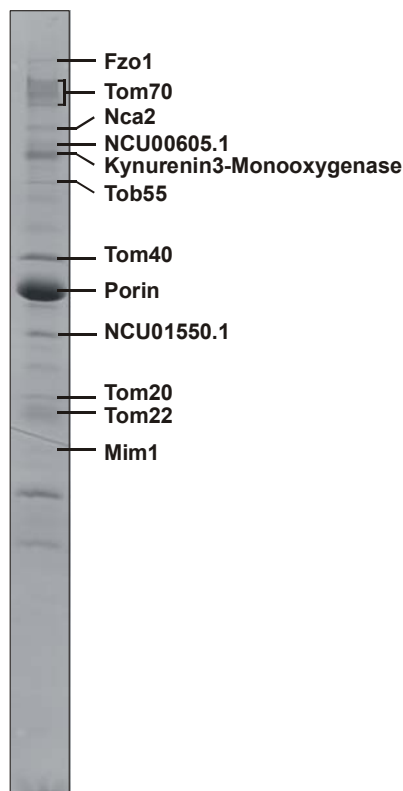


Abb. 30: Zuordnung der Außenmembranproteine

100 µg Außenmembranvesikel wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem langen Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Färbung mit Coomassie wurden schmale Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Nach der massenspektrometrischen Analyse der Banden durch das Zentrallabor für Proteinanalytik wurden die identifizierten Proteine den Banden im Gel zugeordnet.

MALDI analysiert wie beschrieben (Bonaldi *et al.*, 2004). Die erhaltenen Spektren wurden mittels des Mascot Programm (Matrix Science) mit der *N. crassa* Genom-Datenbank (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) abgeglichen. Die Auswertung ist in Abbildung 30 dargestellt.

Das am häufigsten vorkommende Protein in der mitochondrialen Außenmembran von *N. crassa* ist das mitochondriale Porin. Um nur in geringen Mengen vorhandene Proteine zu identifizieren und Zugang zu Proteinen zu erhalten, die von Porin im SDS-Polyacrylamidgel verdeckt werden, wurde in einer zweiten Analyse vor der Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Hierfür wurden 6 mg Außenmembranvesikel

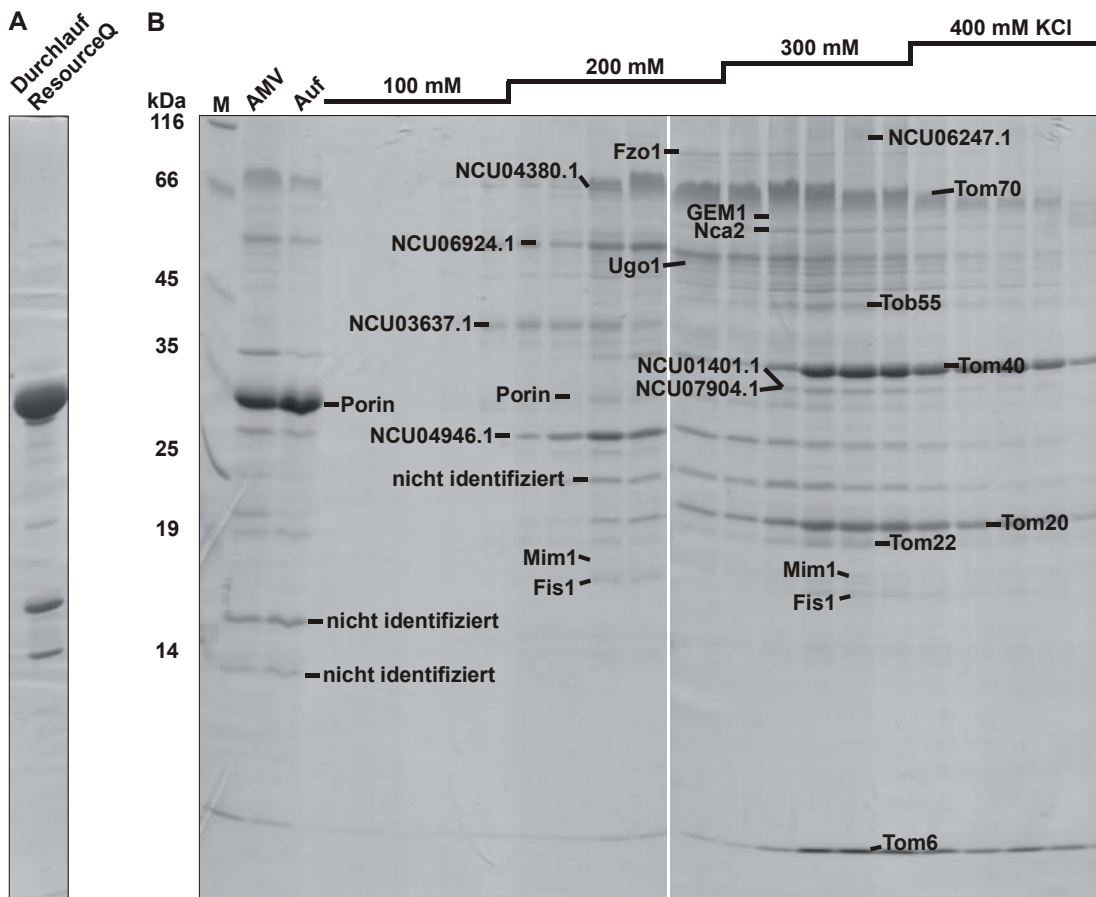


Abb. 31: Zuordnung der Außenmembranproteine nach der Auftrennung über ResourceQ

6 mg Außenmembranvesikel wurden mit DDM solubilisiert (AMV). Das Material wurde abzentrifugiert und die gelösten Bestandteile auf eine ResourceQ-Säule geladen (Auf). Der Durchlauf wurde gesammelt (A), die gebundenen Proteine über einen Stufengradienten eluiert (100-400 mM KCl). Die Elution wurde fraktioniert gesammelt, die Proteine TCA gefällt und auf einem langen Harnstoffgel aufgetrennt. Die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden wurden analysiert und die identifizierten Proteine den Banden im Gel zugeordnet.

solubilisiert und die in DDM gelösten Proteine und Proteinkomplexe auf eine ResourceQ-Säule (Anionen-Austauscher) geladen. Porin bindet nicht an das ResourceQ-Material und befand sich im Durchlauf mit zwei weiteren Proteinen, die nicht identifiziert werden konnten (Abb. 31A). Die gebundenen Proteine wurden mit einem Stufengradienten eluiert. Hierzu wurde die Säule mit 100 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM KCl gewaschen und die eluierten Proteine fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit TCA gefällt und die Proteine in einem SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 31B).

In insgesamt drei unabhängigen massenspektrometrischen Untersuchungen wurden 92 unterschiedliche Proteine identifiziert. Um Verunreinigungen auszuschließen, wurden nur die Proteine der Außenmembran zugeordnet, die in mindestens zwei der drei Analysen gefunden wurden. So wurden 36 Proteine der mitochondrialen Außenmembran zugeschrieben (Tabelle 1). Zwei dieser 36 Proteine sind in *Neurospora crassa* als im Intermembranraum bzw. an der Matrixseite der Innenmembran lokalisiert bekannt (Tim10 und F₁β). Allerdings wurde bei der F₁β-Untereinheit der ATPase zum Teil auch ein Peptid aus der Präsequenz gefunden. Möglicherweise handelte es sich um ein Protein im Importprozess, das mit der Außenmembran ko-isoliert wurde (siehe auch Sickmann *et al.*, 2003). Bei Tim10 handelt sich um ein kleines Intermembranraum-Chaperon, das hydrophobe Proteine vom TOM- zum TIM22-Komplex geleitet. Andere Proteine, die bereits als Außenmembranproteine beschrieben wurden, wurden nicht gefunden: Dnm1, Mdm10, Mmm1, Tom7 und Tom5 (Dembowski *et al.*, 2001; Prokisch *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2005). Von diesen Proteinen wurde allerdings Tom7 einmal in drei Analysen gefunden und Tom5, wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, im isolierten TOM-Komplex identifiziert.

Für alle 36 Proteine wurde über ein Transmembranvorhersageprogramm (TMPredict, http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) die Wahrscheinlichkeit einer hydrophoben Transmembrandomäne geprüft. Für 11 Proteine konnte keine Vorhersage für eine Transmembrandomäne getroffen werden, wobei es sich bei Tom40 und Porin um β-Barrel-Proteine handelt. Auch für F₁β und Tim10, die als lösliche Proteine bekannt sind, wurde kein ausreichend hydrophober Anteil in der Aminosäuresequenz identifiziert.

Ergebnisse

Tabelle 1: Auflistung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine in der mitochondrialen Außenmembran von *Neurospora crassa*

36 Proteine konnten der mitochondrialen Außenmembran von *N. crassa* zugeordnet werden. Sie sind mit ihrer "Locus tag" Nummer NCU und ihrer Masse verzeichnet. Falls bekannt sind ihre Namen angegeben. Homologe in *S. cerevisiae* und deren Funktion sind zum Vergleich aufgeführt. Mittels eines Transmembranvorhersageprogrammes (TMPredict) wurden die hypothetischen Transmembrandomänen bestimmt.

NCU#	Name	Masse	Hefe Homolog	Funktion des Homologs	TM
06247.1	hypothetisches Protein	144234			1298-1318 1323-1340
00436.1	Fzo1	101258	Fzo1/YBR179C	Integrales Außenmembranprotein, involviert in der mitochondrialen Fusion und der Erhaltung des mitochondrialen Genoms. Enthält am N-Terminus eine GTPase-Domäne.	750-768 789-807
04380.1	Faa1	76509	Faa1/YOR317w	Biosynthese von Fettsäuren.	291-310 451-471
06403.1	hypothetisches Protein	75251	Nca2/YPR155C	Regulation der Expression von Atp6p and Atp8p, Kern-kodierten Untereinheiten der mitochondrialen ATPase.	372-394 548-566
03966.1	hypothetisches Protein	70203	Gem1/Yal048c	Mitochondriales Rho-Protein mit 2 GTPase-Domänen,	601-621
04245.1	Tom70	69297	Tom70/YNL121C	Rezeptorprotein der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran	40-60
00905.1	hypothetisches Protein	66240			30-51 270-294 492-508 526-545
08356.1	hypothetisches Protein	64049			475-491
03188.1	hypothetisches Protein	62561	Alo1/YML086c	D-Arabinono-1,4-Lacton Oxidase	105-126 196-212
04013.1	hypothetisches Protein	59465	Ymr110cp	Hypothetische Aldehyde Dehydrogenase	136-153 510-530
06924.1	hypothetisches Protein	57852	Bna4/YBL098w	Kynurenine 3-Monooxygenase, Biosynthesis von Nicotinsäure und Tryptophan über den Kynurenine-Stoffwechselweg.	8-26 241-267 322-340 465-482
07793.1	Ugo1	57158	Ugo1/YDR470C	Mitochondriales Außenmembranprotein, benötigt für die Fusion von Mitochondrien.	275-292 320-346 365-384 503-521
00605.1	hypothetisches Protein	56154	Ykl027wp	Molybdopterin-umsetzenden Faktor chlN aus <i>E. coli</i>	16-34 119-138 330-351
05430.1	ATPase, β -Untereinheit	55602	Atp2/YJR121W	β -Untereinheit des F_1 -Segmentes der mitochondrialen F_1F_0 -ATP-Synthase.	
08354.1	hypothetisches Protein	55388		Homolog zu SPBC106.03 in Spalthefe; hypothetisches Protein, eine vorhergesagte Transmembrandomäne.	84-104 245-264 429-458

05593.1	Tob55	54692	Tob55/YNL026W	Essenzielle Komponente des TOB-Komplexes in der mitochondrialen Außenmembran.	β-Barrel
03637.1	Zink-Metalloprotease	50238	Ste24/YJR117W	Zink-Metalloprotease, die den ersten Schritt der N-terminalen Prozessierung des Hefe α-Faktors vermittelt.	2-18 99-123 150-168 179-202 290-315 318-338
02564.1	hypothetisches Protein	49823	Ygr012w	Cystein-Synthase, Schwefel-Abbau	9-29 267-289 384-405
03158.1	hypothetisches Protein	45570			12-30 99-118 268-188
03006.1	Delta(24)-Sterol C-Methyltransferase	42430	Erg6/YML008C	Delta(24)-Sterol C-Methyltransferase, Ergosterol Biosynthese, ER?	
01179.1	Tom40	38127	Tom40/YMR203W	Protein der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran	β-Barrel
01401.1	hypothetisches Protein	37333	SPAC589.04	Homolog zu SPAC589.04 in Spalthefe; Membranprotein, Homolog zum Säugetier Metaxin 2	
07904.1	hypothetisches Protein	33375	Ayr1/YIL124W	NADPH-abhängige 1-Acyl-Dihydroxyacetonphosphatreductase, gefunden in Lipidpartikeln und ER; beteiligt an der Phosphorsäure-Biosynthese.	133-152 256-280
01550.1	Adenylatkinase	30267	Adk1p,YDR226W	Adenylatkinase; Biosynthese von Purinen; gefunden im Cytosol und im mitochondrialen Intermembranraum.	
04304.1	Porin	29981	Por1/YNL055C	Mitochondriales Porin (voltage-dependent anion channel; VDAC), Außenmembranprotein, bildet einen Kanal, benötigt für die osmotische Stabilität und Membranpermeabilität.	β-Barrel
08477.1	Ypt1	26693	Ypt1/YFL038C	Vesikelformierung; gefunden in Golgi und ER, aber auch im mitochondrialem Proteom aus Hefe (Sickmann <i>et al.</i> , 2003).	
06410.1	hypothetisches Protein	25045	Vps21/YOR089C	Rab5-ähnliche GTPase, beteiligt an vacuolärer Proteinsortierung und an Endozytose; Geranylgeranylierung für die Membranassoziation; gefunden im Endosome und im mitochondrialen Proteom aus Hefe (Sickmann <i>et al.</i> , 2003).	
00895.1	hypothetisches Protein	23935	Vps21/YOR089C	Rab5-ähnliche GTPase, beteiligt an vacuolärer Proteinsortierung und an Endozytose; Geranylgeranylierung für die Membranassoziation; gefunden im Endosome und im mitochondrialen Proteom aus Hefe (Sickmann <i>et al.</i> , 2003).	
03711.1	hypothetisches Protein	23113	Ypt7/YML001w	GTPase, vakuoläres Protein	
04946.1	hypothetisches Protein	21480			135-152 171-189
06632.1	Tom20	20216	Tom20/YGR082W	Protein der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran	5-26

Ergebnisse

05313.1	Fis1	16913	Fis1/YIL065c	Benötigt für die Lokalisation von Dnm1p und Mdv1p während der Mitochondrierteilung.	127-146
00431.1	Tom22	16806	Tom22/YNL131W	Protein der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran	85-105
01101.1	hypothetisches Protein	14226	Mim1/Yol026c	Assemblierung des TOM-Komplexes	53-69
00930.1	hypothetisches Protein	9917	Tim10/YHR005C-A	Mitochondrialer Import	
05772.1	Tom6	6459	Tom6/YOR045W	Protein der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran	35-54

3.3.3 Identifikation von Mim1

In den Außenmembranvesikeln von *N. crassa* wurde ein Protein (Accession XP_326594) identifiziert, das in der GenBank (NIH genetic sequence database) bisher als hypothetisches Protein beschrieben war. Das dazu homologe Protein Yol026c in *S. cerevisiae* (Abb32) war in keinem der publizierten mitochondrialen Proteome (Prokisch *et al.*, 2004; Sickmann *et al.*, 2003) gefunden worden. In einer Arbeit über die Charakterisierung essentieller Proteinfunktionen in Hefe wurde Yol026c/Mim1 als Faktor für den mitochondrialen Import beschrieben (Mnaimneh *et al.*, 2004). Es handelt sich bei Mim1 (**Mitochondrial Import**) um ein Protein mit einer Masse von 12,8 kDa. In Abwesenheit von Mim1 akkumulierte das Präprotein der ATPase Untereinheit F₁β im Gesamtzellextrakt. Homologe zu Mim1 finden sich in Pilzen und die Konservierung der Aminosäuresequenz beschränkt sich weitgehend auf die vorhergesagte Transmembrandomäne.

```

S.c. .... MTEVVGFWESVSDDESEDKDCMEVQNTVSADESPLVQSLVS. 41
N.c. MSAEEISNPLAESGVTISS..D.SEQ.....YSAPEASASPQSPSS 38

S.c. .... FVGSCTINLLLPFLNGMMLGFGELFAHELCWRFNWF 77
N.c. SPAVVLYQPPTVWSLFRSAVINLFLPFLNGMMLGFGELFAHEAAFRLGWS 88

S.c. NHRNKGYSKVPESRK...TAAALKEISS.PGTRGRVASKFL..... 113
N.c. NT.....KVFPVSRRDARFLGPGVEVVERP..RRRVLDLDDHDELTSLE 130

```

Abb. 32: Sequenzvergleich Mim1 aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae*

Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren grau schattiert. Die vorhergesagte Transmembrandomäne ist unterstrichen.

Mim1 stellt ein gutes Beispiel dar, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse der massenspektrometrischen Auswertung zu überprüfen. In Importexperimenten mit *Neurospora* Mitochondrien sollte sowohl eine mitochondriale Lokalisation als auch die submitochondriale Sortierung von Mim1 in die Außenmembran nachgewiesen werden. Das *Neurospora crassa* Gen für Mim1 wurde kloniert und radioaktiv markiertes Protein hergestellt. Abbildung 33 zeigt, dass Mim1 nach Inkubation mit Mitochondrien teilweise vor dem Abbau durch Trypsin geschützt war. Es entstanden drei Fragmente, die mit drei Trypsinschnittstellen im C-terminalen Bereich des Proteins erklärt werden können. Im N-terminalen Bereich vor der vorhergesagten Transmembrandomäne gibt es nur eine potentielle Schnittstelle für Trypsin, die vermutlich nicht zugänglich ist. Das Innenmembranprotein AAC wurde nicht von Trypsin angegriffen, woraus folgt, dass die Außenmembran in diesem Experiment intakt war. Der Import von Mim1 erfolgte unabhängig von einem Membranpotenzial der Innenmembran. Dies führt zu dem Schluß, dass Mim1 in die Außenmembran integriert und der C-Terminus von cytosolischer Seite zugänglich ist. Bei einem Import mit anschließendem Verdau mit ProteinaseK konnte kein stabiles Fragment von Mim1 nachgewiesen werden (Abb. 33). Dies stimmt mit Ergebnissen zum nativen *S. cerevisiae* Mim1 überein (Waizenegger *et al.*, 2005). Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, dass Mim1 mittels eines Loops in die Membran integriert und sowohl N- als auch C-Terminus ins Cytosol ragen.

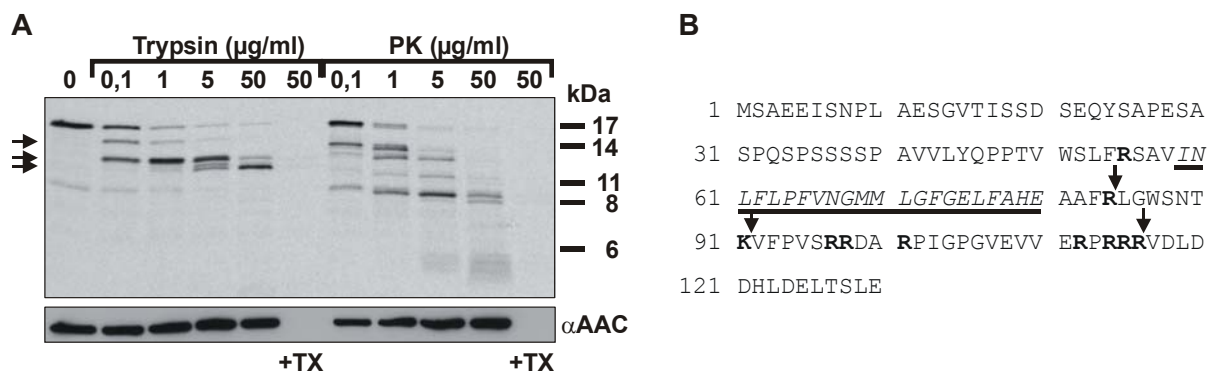


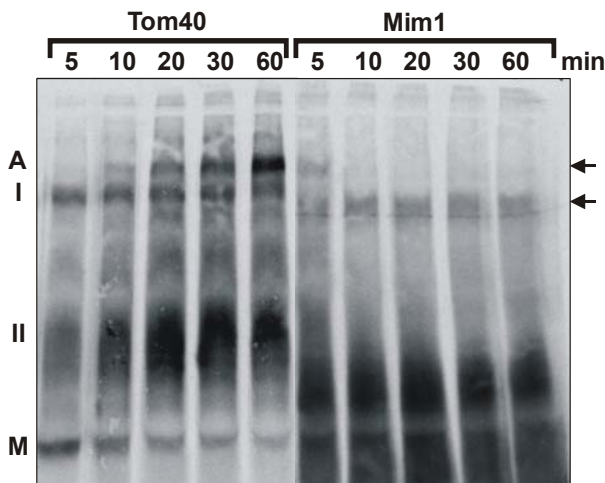
Abb. 33: Proteolytischer Verdau des *in vitro* in *N. crassa* Mitochondrien importierten Mim1

(A) Je 50 µg *Neurospora* Mitochondrien wurden für 20 min auf 25°C mit radioaktiv markiertem Mim1 (mit zwei zusätzlichen Methionine am C-Terminus) inkubiert. Nach Abstoppen der Importreaktion wurden die Ansätze mit 0,1-50 µg/ml Trypsin bzw. Proteinase K (PK) inkubiert. Als Kontrollen wurde jeweils ein Ansatz mit 50 µg/ml Proteinase in der Gegenwart von TritonX100 (TX) behandelt. Die Importansätze wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, auf einem Harnstoffgel aufgetrennt, geblottet und mittels Autoradiographie ausgewertet. Die drei Pfeile markieren drei durch Trypsin-Verdau entstehenden Fragmente. Im unteren Teil ist eine Dekoration der gleichen Membran mit αAAC-Antikörper zu sehen. In (B) sind die für die Generierung der drei Fragmente in Betracht kommenden Trypsin-Schnittstellen in der Aminosäuresequenz von *N.c.* Mim1 ebenfalls durch Pfeile gekennzeichnet.

3.3.4 Assemblierung von Mim1 in die Außenmembran

Eine weitere interessante Frage, die dem Wissen über die Außenmembranproteine folgt, ist, welche dieser Proteine in einem Komplex vorliegen und wie sie miteinander interagieren. Eine Assemblierung des neu als Außenmembranprotein identifizierten Mim1 in einen oligomeren Komplex sollte überprüft werden. Hierzu wurde ein Importexperiment mit radioaktiv markiertem Protein in *Neurospora* Mitochondrien durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Importreaktion wurde die Oligomerisierung mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 34). Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit Tom40-Lysat durchgeführt. Tom40 bindet zunächst an den TOB-Komplex (Intermediat I), bildet danach ein zweites, kleineres Intermediat (Intermediat II) und assembliert dann in den vollständigen TOM-Komplex mit einer Größe von ca. 400 kDa. Für Mim1 war nach 5 Minuten ein Intermediat in der Größe des voll assemblierten TOM-Komplexes zu erkennen, möglicherweise handelt es sich um eine Interaktion von Mim1 mit dem TOM-Komplex zur Integration von Mim1 in die Membran. Danach ist die Bildung eines ca. 300 kDa großen Komplexes zu erkennen, der nicht mit einem der Tom40-Intermediate übereinstimmt. Bei einer molekularen Masse des Monomers von 14,2 kDa, könnten danach ca. 20 Mim1-Proteine einen homo-oligomeren Komplex bilden. Als zweite Möglichkeit könnte es weitere Interaktionspartner des Mim1 in der Außenmembran geben, die in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden können. Dies muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

Abb. 34: Assemblierung von Mim1 im Vergleich zur Assemblierung von Tom40



Die mit [³⁵S]Methionin radioaktiv markierten Proteine Tom40 und Mim1 wurde für 5-60 min mit je 50 µg Wildtyp-Mitochondrien auf 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit SET-Puffer gewaschen und in 1% DDM enthaltenden Solubilisierungspuffer aufgenommen. Die löslichen Bestandteile wurden in einer Blau-Nativ-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und über Autoradiographie ausgewertet. M beschreibt das Tom40-Monomer, I das 1. Assemblierungsintermediat, II das 2. Assemblierungsintermediat und A den vollständig assemblierten TOM-Komplex. Auf der rechten Seite sind ein Intermediat des Mim1 und eine assemblierte Form mit zwei Pfeilen gekennzeichnet.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für eine röntgenkristallographische Strukturbestimmung der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran erarbeitet. Die Reinheit und Homogenität des aus *Neurospora crassa* isolierten TOM-Komplexes wurde hierfür optimiert. Dabei wurde Tom5 als eine neue Komponente des TOM-Komplexes von *N. crassa* identifiziert und seine Funktion mit Tom5 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verglichen. Desweiteren wurde ein Proteom der Außenmembran von *N. crassa* erstellt, um weitere neue Komponenten der Proteintranslokation und Membraninsertion in der mitochondrialen Außenmembran aufzufinden. So wurde Mim1 als mitochondriales Außenmembranprotein mit einer Funktion in der Assemblierung des TOM-Komplexes identifiziert.

4.1 Identifizierung von Tom5 in *Neurospora crassa*

Eine Voraussetzung für ein molekulares Verständnis des Mechanismus der Proteintranslokation über den TOM-Komplex in Mitochondrien sind strukturelle Informationen zu dessen Aufbau und Stöchiometrie. Daher sollte der TOM-Core-Komplex aus *N. crassa* für die Proteinkristallographie verwendet werden. In diesem Komplex waren die Untereinheiten Tom40, Tom22, Tom6 und Tom7 gefunden worden, nicht aber eine in Hefe beschriebene Komponente Tom5. Obwohl *N. crassa* Gendatenbanken vorhanden waren, konnte durch eine BLAST-Suche mit der *S. cerevisiae* Tom5-Sequenz kein homologes Protein identifiziert werden. Bei der daraufhin erfolgten massenspektrometrischen Untersuchung des aus *N. crassa* Mitochondrien aufgereinigten TOM-Core-Komplexes wurde ein Protein identifiziert, das eine Identität von 32% mit dem Tom5 in Hefe aufwies. Durch die BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz des *N. crassa* Tom5 konnten fünf weitere homologe Proteine in Pilzen gefunden werden, jedoch keine zu Tom5 ähnlichen Proteine in höheren Organismen. Möglicherweise ist der offene Leserahmen zu klein, um als hypothetisches Protein erkannt zu werden oder durch mehrere Introns unterbrochen und somit nicht als codierende Sequenz zu erkennen. In *N. crassa* sind die für Tom5 codierenden 153 Basenpaare auf drei Exons verteilt.

Dennoch enthalten auch die Proteintranslokasen der mitochondrialen Außenmembran von höheren Organismen kleine Tom-Komponenten. So wurden in Mitochondrien aus Rattenleber über Ko-Immüfällung neben Tom40, Tom22 und Tom20 drei kleine Komponenten OM10, OM7,5 und OM5 identifiziert. Diese kleinen Komponenten wurden jedoch nicht näher analysiert (Suzuki *et al.*, 2000). Bei der Untersuchung des TOM-Komplexes in *Arabidopsis thaliana* wurden Homologe zu Tom40, Tom20 und Tom7 gefunden. Zwei weitere Komponenten des Komplexes mit apparenten molekularen Massen von acht und sechs kDa wurden nicht weiter beschrieben (Werhahn *et al.*, 2001).

Zur Charakterisierung von Tom5 in *N. crassa* wurde die Assemblierung in den TOM-Komplex untersucht. Radioaktiv markiertes Tom5 assemblierte in *in vitro* Importexperimenten direkt in den TOM-Komplex, ohne erkennbare Intermediate auszubilden. Auch in *S. cerevisiae* war eine direkte Assemblierung von Tom5 in den Komplex beobachtet worden. Dies spricht für die Theorie, dass der TOM-Komplex eine dynamische Struktur ist und neue Komponenten direkt in bestehende Komplexe integrieren kann (Model *et al.*, 2001; Rapaport *et al.*, 2001). Eine zweite Möglichkeit wäre das Vorhandensein von teil-assemblierten Tom-Komponenten in der mitochondrialen Außenmembran, die allerdings nur in geringen Mengen vorhanden sein könnten, da sie bisher nicht nachgewiesen wurden.

4.2 Funktion von Tom5

Die Deletion von Tom5 führte in *S. cerevisiae* zu einem Wachstumsdefekt bei 37°C. Zudem wiesen aus dem *S. cerevisiae* Δ tom5-Stamm isolierte Mitochondrien einen verminderten Import von Präproteinen aller mitochondrialen Subkompartimente und eine Beeinträchtigung der Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Tom5 eine wichtige Funktion im Importprozeß zugeschrieben (Dietmeier *et al.*, 1997). Im Gegensatz hierzu konnten nach der Deletion von Tom5 in *N. crassa* keine Auswirkungen auf das Wachstum des Organismus, den Proteinimport oder die Assemblierung des TOM-Komplexes nachgewiesen werden. Dies wirft die Frage auf, in welcher Form Tom5 am Import mitochondrialer Präproteine beteiligt ist. Da die Expression des *N. crassa* Tom5-

Proteins im Δ tom5-Stamm von Hefe zu einer Aufhebung des Wachstums- und Importdefektes führte, kann man auf eine übereinstimmende Funktion der beiden Proteine schließen. Dennoch führt die Deletion von Tom5 im jeweiligen Organismus nicht zum gleichen Phänotyp.

Worin liegen die Unterschiede zwischen den TOM-Komplexen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae*? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Stabilität der TOM-Komplexe von *S. cerevisiae* und *N. crassa* verglichen. Der TOM-Komplex aus Hefe konnte durch die Zugabe von geringen Konzentrationen des milden Detergens n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) zerlegt werden. Dabei entstand ein ca. 100 kDa großer Komplex, der Tom40 enthält. Dieser Komplex erinnert in seiner Größe an den 100 kDa-Komplex, der bei der *in vitro* Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex als ein Intermediat gebildet wird. Bei der Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex konnte zunächst die Interaktion des Tom40-Präproteins mit dem TOB-Komplex als 250 kDa-Intermediat nachgewiesen werden (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003). Danach folgte die Ausbildung eines ca. 100 kDa großen Komplexes (Model *et al.*, 2001) und anschließend die Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex. Nach der Deletion von Tom5 in Hefe war bei der *in vitro* Assemblierung von Tom40 keine Ausbildung des 100 kDa-Komplexes mehr zu beobachten. Dies führte zu der These, dass Tom5 an der Ausbildung dieses Komplexes beteiligt ist (Model *et al.*, 2001).

Bei der Zerlegung des Tom5-depletierten TOM-Komplexes in Hefe durch die Zugabe von Detergens war die Ausbildung des 100 kDa-Komplexes deutlich reduziert. Tom40 konnte nur in geringen löslichen Mengen nachgewiesen werden und war vermutlich weitgehend aggregiert. Möglicherweise wird Tom40 in der Membran durch Tom5 stabilisiert und kann nur in Interaktion mit Tom5 einen 100 kDa-Komplex ausbilden. Tom5 konnte bisher jedoch weder bei der Tom40-Assemblierung noch bei der TOM-Komplex-Zerlegung im 100 kDa-Komplex nachgewiesen werden. Auch wurde nicht gezeigt, dass es sich bei Assemblierung und Zerlegung um den gleichen 100 kDa-Komplex handelt.

Im Gegensatz zum TOM-Komplex der Hefe ist der TOM-Komplex von *N. crassa* in DDM stabil, dieser Komplex dissoziiert erst bei hohen Konzentrationen eines

kürzerkettigen Detergens in seine Untereinheiten. Es konnte keine Abhängigkeit der Stabilität des *N. crassa* TOM-Komplexes von Tom5 nachgewiesen werden. Vermutlich fand sich deshalb kein Wachstumsphänotyp nach der Deletion von Tom5 in *Neurospora crassa*.

Interessanterweise wachsen Tom5-depletierte Hefezellen bei 30°C vergleichbar wie Wildtyp-Zellen. Der Wachstumsphänotyp zeigt sich erst bei einer Temperatur von 37°C. Möglicherweise ist die Stabilität des TOM-Komplexes in Hefe temperaturabhängig. Einen Hinweis auf eine stabilisierende Funktion von Tom5 in Abhängigkeit von der Temperatur gibt die Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der auf 37°C solubilisierten Hefe TOM-Komplexe. Hier konnte eine Veränderung des Laufverhaltens nur im Fall des Tom5-depletierten TOM-Komplexes festgestellt werden. Sowohl der durch das *N. crassa* Tom5 als auch der durch Fis1-Tom5C ergänzte Δ tom5-TOM-Komplex verhielten sich wie der Wildtyp TOM-Komplex. Bei Fis1-Tom5C handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus der cytosolischen Domäne des Fis1 am N-Terminus und der C-terminalen Transmembrandomäne des Hefe-Tom5. Für die Expression von Fis1-Tom5C im *tom5* Δ -Stamm wurde eine Assemblierung dieses Proteins in den TOM-Komplex und ein Wachstum der Hefezellen bei 37°C gezeigt (Habib *et al.*, 2003).

Das Einbringen des Fusionsproteins Fis1-Tom5C in den *tom5* Δ -Stamm zeigt, dass die Transmembrandomäne des Tom5-Proteins für eine Assemblierung in den TOM-Komplex sowie ein Wachstum der Zellen auf 37°C ausreichend ist. Daher kann man von einer Lokalisation der Funktion von Tom5 in der Transmembrandomäne ausgehen. Die Sekundärstruktur des Tom40-Proteins ist als eine Mischung aus einer β -Faltblatt-Struktur und einer α -helikalen Struktur vorhergesagt (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998). Vermutlich ist Tom40 weitgehend innerhalb der Membran lokalisiert. Eine stabilisierende Funktion von Tom5 sollte daher von der Transmembrandomäne ausgeübt werden.

In einer Arbeit von Horie *et al.* (2003) wurde ein Fusionsprotein bestehend aus einer N-terminalen GFP-Domäne und der C-terminalen Transmembrandomäne des Hefe-Tom5 untersucht. Mittels Deletions- und Mutationsstudien der Transmembrandomäne des Hefe-Tom5 wurde eine minimale Aminosäuresequenz

der Transmembrandomäne definiert, die für ein Wachstum des *tom5Δ*-Stammes von *S. cerevisiae* auf 37°C ausreichend ist. Alle Aminosäurenreste des Transmembranbereiches konnten gegen Leucin- oder Alaninreste ausgetauscht werden mit Ausnahme eines zentralen Motivs bestehend aus den Aminosäureresten Serin, Prolin und Methionin. Das Prolin in der Transmembrandomäne ist in allen identifizierten Tom5-Proteinen konserviert. Auch für Tom7 wurde gezeigt, dass alle bisher bekannten Tom7-homologen Tom-Untereinheiten ein Prolin in der Transmembrandomäne besitzen (Allen *et al.*, 2002). Das Prolin führt vermutlich zu einem Knick in der α -Helix des Transmembransegmentes. Möglicherweise handelt es sich hier um eine notwendige strukturelle Begebenheit der kleinen Tom-Komponenten Tom5 und Tom7, um in der Membran eine Interaktion mit der β -Barrel-Struktur des Tom40-Proteins herzustellen. In der dritten kleinen Tom-Komponente Tom6 besteht allerdings keine Konservierung eines Prolin-Restes in der Transmembrandomäne.

Aufgrund des Importdefektes der Tom5-Deletionsmutante wurde für Tom5 in Hefe eine Funktion als Importrezeptor postuliert (Dietmeier *et al.*, 1997). Die zu importierenden Präproteine sollten nach der Erkennung an den Rezeptoren von Tom22 über Tom5 in die von Tom40 gebildete Pore geleitet werden. Alle bisherigen Daten sprechen jedoch für eine Lokalisation der Funktion in der Transmembrandomäne von Tom5, weshalb eine Rolle als Importrezeptor unwahrscheinlich erscheint.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Hauptaufgabe von Tom5 die Stabilisierung des TOM-Komplexes. Die Deletion von Tom5 übt bei zunehmender Temperatur zumindest in *S. cerevisiae* einen destabilisierenden Effekt auf den TOM-Komplex aus. Vermutlich wird dann in einem Sekundäreffekt das Importverhalten der Mitochondrien aufgrund der Destabilisierung des TOM-Komplexes negativ beeinflusst.

4.3 Kristallisation des TOM-Core-Komplexes

Zu Beginn dieser Arbeit war keine Röntgenstruktur einer Proteintranslokase bekannt. Da der TOM-Core-Komplex aus *Neurospora crassa* Mitochondrien in ausreichenden

Mengen für die Proteinkristallographie gereinigt werden konnte, stellte dieser TOM-Komplex einen geeigneten Kandidaten für Kristallisationsversuche dar. Von Kristallen des TOM-Core-Komplexes wurden Informationen über die Struktur der Proteintranslokase und den Mechanismus der Proteintranslokation erwartet.

Durch den Gebrauch von kommerziell angebotenen Kristallisationspuffern wurden Kristallisationsparameter für den TOM-Core-Komplex gefunden und verfeinert. Wenngleich die von diesen Kristallen erhaltenen Beugungsdaten für eine Bestimmung der Raumgruppe nicht ausreichend waren, stellten sie einen Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung der Kristalle dar. Jedoch konnte auch durch die Zugabe von Additiven zum Kristallisationsansatz keine Verbesserung des Beugungsverhaltens der Kristalle erreicht werden. Eine mangelhafte Ordnung von Proteinkristallen kann durch Inhomogenität der Proteinpräparation wie Abbauprodukte, ungeordnete Proteinbereiche oder Substöchiometrie des Komplexes verursacht werden. Es konnte allerdings auch durch eine Optimierung der Proteinhomogenität der TOM-Core-Komplex-Präparation keine Verbesserung der Röntgenbeugung der Kristalle erzielt werden.

Bei der Kristallisation von Membranproteinen tritt im Vergleich zu löslichen Proteinen ein weiterer, optimierbarer Faktor auf: Die Wahl des Detergens kann wie die Wahl des Puffersystems oder der Salzkonzentration ausschlaggebend für die erfolgreiche Kristallisation des Membranproteins sein. Neben der Verwendung von n-Dodecyl- β -D-maltosid war die Reinigung des *N. crassa* TOM-Komplexes mit Digitonin etabliert. Der in Digitonin gereinigte sogenannte TOM-Holo-Komplex enthält zusätzlich zu den Komponenten des TOM-Core-Komplexes noch die Rezeptor-Untereinheiten Tom70 und Tom20. Da Digitonin selbst nach drei bis sieben Tagen in wässriger Lösung kristallin ausfällt, war dieser Komplex für die Kristallisation nicht geeignet. Daher wurde die Stabilität des TOM-Core-Komplexes in anderen Detergenzien überprüft. Mit C12E8 wurde ein Detergens gefunden, das die kleinen Tom-Komponenten Tom5 und Tom7 aus dem TOM-Komplex auslöst.

Da nicht nachgewiesen werden konnte, dass die Auswaschung von Tom5 und Tom7 durch C12E8 vollständig erfolgte und dieser Komplex daher nicht für die Kristallisation geeignet war, wurden von Frank Nargang (University of Alberta,

Kanada) Deletionmutanten in *Neurospora crassa* hergestellt. Mit den Isolierungen des *tom5*^{FRIP}-TOM-Komplexes und des *tom5*^{FRIP} Δ *tom7*-TOM-Komplexes konnten erste Kristalle erhalten werden, die noch weiter optimiert werden müssen, um Beugungsexperimente im Röntgenstrahl durchführen zu können.

Eine weitere Überlegung ist, die Untereinheiten des Komplexes noch weiter zu reduzieren und nur die porenbildende Untereinheit Tom40 für Kristallisationsexperimente zu verwenden. Für Tom40 wurde eine teilweise Faltung in β -Faltblättern vorhergesagt (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998). Bisher sind Strukturen von 29 verschiedenen prokaryontischen β -Barrel-Proteinen gelöst worden. Es gibt jedoch keine Struktur eines eukaryontischen β -Barrel-Proteins (<http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>). Möglicherweise sind die eukaryontischen β -Barrel-Strukturen instabiler im Vergleich zu den prokaryontischen Proteinen, so ist das mitochondriale Tom40 nur in hohen Konzentrationen von Detergens für zwei bis drei Tage in Lösung zu halten (Ahting *et al.*, 2001). Für die Kristallisation von Tom40 wäre nach der Überexpression in *E. coli* eine Rückfaltung des Proteins notwendig, da es aufgrund seiner hohen Hydrophobizität nicht löslich ist. Die korrekte Faltung des Proteins könnte nicht überprüft werden. Zudem müsste die Kristallisation des Tom40 in hohen Konzentrationen von Detergens durchgeführt werden. Aus diesen Gründen scheint ein Kristallisationsversuch von Tom40 nicht sinnvoll.

Die Überlegung, den TOM-Komplex aus Mitochondrien eines anderen Organismus als *N. crassa* zu reinigen und zu kristallisieren wurde verworfen. Der TOM-Komplex aus *S. cerevisiae* kann bisher ausschließlich in Digitonin gereinigt werden und ist aufgrund der bereits beschriebenen Eigenschaften von Digitonin nicht für die Kristallisation geeignet. In anderen Organismen ist der TOM-Komplex bisher kaum untersucht worden. Es müssten zunächst die Komponenten identifiziert und charakterisiert werden. Ein weiterer Vorteil der Arbeit mit *N. crassa* ist, dass große Mengen an Material gewonnen werden. So können aus einer 100 Liter *N. crassa*-Kultur ca. 4 mg sauberer TOM-Core-Komplex isoliert werden. Mit Hefe- oder Zellkultur wären solche Kulturmaßstäbe nur mit aufwändigen Fermentieranlagen zu erreichen.

Führen die *N. crassa* Deletionsmutanten nicht zum Ziel der Strukturanalyse des TOM-Komplexes, gibt es eine weitere, erfolgversprechende Methode, geordnete Kristalle zu erreichen. Mittlerweile gibt es vier Kristallstrukturen von Membranproteinkomplexen, die durch Ko-Kristallisation mit monoklonalen Antikörpern erhalten wurden: die bakterielle Cytochrom *c* Oxidase (Ostermeier *et al.*, 1995), der Hefe Cytochrom *bc*₁ Komplex (Hunte *et al.*, 2000), der KcsA K⁺-Kanal (Zhou *et al.*, 2001) und der ClC-Kanal aus *E. coli* (Dutzler *et al.*, 2003). Ein Problem bei der Kristallisation von Membranproteinen stellen große Detergensmizellen dar, die die hydrophoben Anteile der Membranproteine ringförmig umschließen. So kann bei sehr hydrophoben Proteinen der Aufbau von Proteinkontakten stark eingeschränkt werden. Die Mizellen selbst bilden selten feste Kristallkontakte aus. Über Antikörperfragmente, die spezifisch an die hydrophilen Bereiche der Membranproteine binden, kann die polare Oberfläche der zu kristallisierenden Proteine über die Mizelle hinaus vergrößert und so die Ausbildung von stabilen Proteinkontakten im Kristall erreicht werden (Hunte und Michel, 2002).

Während diese Arbeit entstand, wurde die erste Struktur einer Proteintranslokase mit einer Auflösung von 3,2 Å gelöst (Van den Berg *et al.*, 2004). Der SecY-Komplex aus *Methanococcus jannaschii* kann verglichen werden mit dem SecYEG-Komplex aus Bakterien und dem Sec61-Komplex im endoplasmatischen Retikulum der Eukaryonten. Der Kanal wird von SecY gebildet und besitzt in geschlossenem Zustand einen Durchmesser von 5-8 Å. Die Daten des SecY-Komplexes lassen sich nicht auf den TOM-Komplex übertragen, da der SecY-Komplex allein aus α -Helices und der TOM-Komplex zumindest teilweise aus einer β -Faltblattstruktur aufgebaut wird.

Das Verhältnis der Komponenten Tom40, Tom22, Tom6, Tom7 und Tom5 im TOM-Core-Komplex wurde als 1:1:1:1:1 bestimmt (Schmitt *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Stöchiometrie und der molekularen Masse des TOM-Core-Komplexes von ca. 400 kDa kann man von einem Aufbau des Komplexes aus jeweils vier bis sechs Untereinheiten ausgehen. Da in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des TOM-Core-Komplexes Partikel mit zwei Poren beobachtet wurden (Ahting *et al.*, 1999), wird zudem eine Symmetrie des TOM-Komplexes angenommen. An der Ausbildung

jeder der beiden Poren müssen daher mindestens zwei Tom40-Moleküle beteiligt sein.

Mit der Strukturanalyse von TolC wurde erstmals ein aus mehreren Untereinheiten aufgebauter β -Barrel beschrieben, wohingegen die meisten transmembranen β -Barrels von jeweils nur einer Untereinheit ausgebildet werden. TolC fungiert in der Außenmembran von Gram-negativen Bakterien als ein Membrankanal, der für den Export von antibakteriellen Stoffen und toxischen Proteinen verwendet wird. Der Kanal ist aus drei TolC-Untereinheiten zusammengesetzt. Jeweils vier β -Faltblätter pro Molekül fügen sich in der Membran zu einem β -Barrel mit 12 β -Faltblättern zusammen. Die zweite im Periplasma lokalisierte Domäne des Exportkanals wird durch ein α -Barrel bestehend aus 12 α -Helices ausgebildet (Koronakis *et al.*, 2000). Für den TOM-Komplex ist keine große Domäne im mitochondrialen Intermembranraum nachzuweisen, daher läßt sich auch die Struktur von TolC nicht auf den TOM-Komplex übertragen.

4.4 Proteine der mitochondrialen Außenmembran

Um einen Überblick über die Gesamtheit der Proteine in der mitochondrialen Außenmembran zu gewinnen und mögliche weitere Komponenten der Proteintranslokation und Membraninsertion zu identifizieren, wurden massenspektrometrische Proteinanalysen mit isolierten Außenmembranen durchgeführt. Insgesamt konnten 36 Proteine der mitochondrialen Außenmembran zugeordnet werden.

Von den 36 identifizierten Proteinen besitzen 29 ein Ortholog in *S. cerevisiae*. Von den Orthologen in Hefe wurden 24 Proteine in mitochondrialen Proteom-Analysen in demselben Organismus identifiziert (Prokisch *et al.*, 2004; Sickmann *et al.*, 2003). Die fünf mitochondrialen Außenmembranproteine von *N. crassa*, die nicht in den beiden Proteomen aus Hefe gefunden wurden, sind Ste24, Adk1, Ypt7, Gem1 und Mim1. Ste24 wurde als im endoplasmatischen Retikulum (Schmidt *et al.*, 1998) und Adk1 als im Cytosol und im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert beschrieben (Klier *et al.*, 1996). Möglicherweise handelt es sich bei diesen beiden

Proteinen um Verunreinigungen der mitochondrialen Außenmembranfraktion. Gem1 wurde zwar nicht in den beiden mitochondrialen Proteomen aus *S. cerevisiae* identifiziert, konnte jedoch experimentell als GTPase der mitochondrialen Außenmembran nachgewiesen werden (Frederick *et al.*, 2004).

Ypt7 wurde als vakuoläre GTPase beschrieben (Wichmann *et al.*, 1992). Ypt1 hingegen, eine kleine Ras-ähnliche GTPase des sekretorischen Weges vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Bacon *et al.*, 1989), wurde in beiden mitochondrialen Proteomen in Hefe identifiziert. Möglicherweise handelt es sich um eine duale Lokalisation von Ypt7 und Ypt1 mit einer noch unbekannt Funktion in der mitochondrialen Außenmembran. Es wurden bereits Proteine mit einer möglichen Funktion im Vesikeltransport wie eine alternative Splice-Form des Vesikel-assoziierten Membranproteins VAMP-1 in Säuger-Mitochondrien identifiziert (Isenmann *et al.*, 1998).

Weitere Beispiele für eine mögliche duale Lokalisation sind Faa1 und Ayr1, die in *S. cerevisiae* sowohl in den beiden mitochondrialen Proteomen als auch in Lipidpartikeln gefunden wurden (Athenstaedt und Daum, 2000; Athenstaedt *et al.*, 1999). Die Lokalisation von Mim1 war unbekannt, jedoch wurde Mim1 eine Funktion im mitochondrialen Proteinimport zugeschrieben (Mnaimneh *et al.*, 2004) und daraufhin in dieser Arbeit näher untersucht.

Die Sensitivität des Nachweises der Außenmembranproteine von *N. crassa* kann durch einen Abgleich der gefundenen Proteine mit der Menge der erwarteten Proteine bestimmt werden. Hierzu wurde in der *N. crassa*-Datenbank nach Orthologen zu bekanntermaßen in der mitochondrialen Außenmembran lokalisierten Hefe-Proteinen gesucht. Auf diese Weise wurden 18 Proteine als potenzielle *N. crassa* Außenmembranproteine beschrieben, von denen im Proteom der *N. crassa* Außenmembran 13 Proteine identifiziert wurden. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität des Nachweises von 72%. Die fünf nicht nachgewiesenen Proteine sind Tom5, Tom7, Mmm1, Dnm1 und Mdm10. Nur für die ersten drei dieser Proteine gibt es experimentelle Daten, die ihre tatsächliche Expression in *N. crassa* belegen (Dembowski *et al.*, 2001; Künkele *et al.*, 1998b; Prokisch *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2005).

Die in der mitochondrialen Außenmembran von *N. crassa* identifizierten Proteine können in fünf Klassen gruppiert werden (Tabelle 2). Von zehn Proteinen gibt es keine Klassifizierung, da ihre Funktion unbekannt ist.

Tabelle 2: Klassifizierung der in der mitochondrialen Außenmembran identifizierten Proteine.

Proteinimport und Insertion	Transporter	Mitochondriale Morphologie	Enzyme	GTPasen	unbekannte Funktion
Tom70	Porin	Fzo1	Faa1	Gem1	NCU06247.1
Tom40		Ugo1	Alo1	Ypt1	NCU00905.1
Tom22		Fis1	Bna4	Vsp21	NCU08356.1
Tom20			Ste24	Ypt7	NCU04013.1
Tom6			Erg6		NCU00605.1
Tob55			Ayr1		NCU08354.1
Metaxin2			Adk1		NCU02564.1
Mim1					NCU03158.1
					NCU01401.1
					NCU04946.1

Zur Klasse der Translokasen und Transporter gehören neun Proteine, von den Morphologie-bestimmenden Proteinen wurden Fzo1, Ugo1 und Fis1 identifiziert. Zur Gruppe der Enzyme wurden Enzyme des Lipid-Stoffwechsels (Faa1, Erg6), des Aminosäure-Stoffwechsels (Bna4), der Phosphorsäure-Biosynthese (Ayr1), der Ascorbat-Biosynthese (Alo1), des Purin-Stoffwechsels (Adk1) und eine Protease (Ste24) zugeordnet. In die Gruppe der GTPasen wurde das Mitochondrien-spezifische Gem1 eingegliedert, wobei die anderen GTPasen bisher nur dem Vesikel-Transport zugeschrieben wurden. Allerdings wurden Ypt1 und Vsp21 auch in einem mitochondrialen Proteom in *S. cerevisiae* identifiziert (Sickmann *et al.*, 2003).

4.5 Charakterisierung von Mim1

Von den in der mitochondrialen Außenmembran neu identifizierten Proteinen sollte die Lokalisation anhand eines Beispiels auch biochemisch nachgewiesen werden. Für Mim1 war direkt nach der Identifikation im *N. crassa* Proteom der mitochondrialen Außenmembran nur bekannt, dass die Herunterregulation der Expression des Hefe-Homologs Yol026c/Mim1 zu einer Akkumulation des

Präproteins von F₁β im Cytosol führte (Mnaimneh *et al.*, 2004). Da vermutet wurde, dass es sich um einen Faktor des mitochondrialen Imports handelt, wurde es Mim1 (**M**itochondrial **I**mport) benannt. In *N. crassa* konnte eine Lokalisierung von Mim1 in der mitochondrialen Außenmembran nachgewiesen werden. Desweiteren wurde eine Assemblierung von Mim1 in einen 300 kDa Komplex gezeigt. Ob es sich hierbei um einen homo-oligomeren Komplex handelt oder Mim1 mit weiteren Proteinen der Außenmembran interagiert, konnte bisher nicht geklärt werden.

Nach der eindeutigen Zuordnung von Mim1 zur mitochondrialen Außenmembran wurde die Funktion des Mim1 in *S. cerevisiae* untersucht. Nach der Herunterregulation des Mim1 konnte ein schwerer Defekt in der Assemblierung des Tom40 in den TOM-Komplex festgestellt werden (Ishikawa *et al.*, 2004; Waizenegger *et al.*, 2005). Die Interaktion des Tom40 mit dem TOB-Komplex erfolgte vergleichbar zum Import in Wildtyp-Mitochondrien, die Bildung weiterer Assemblierungsintermediate war kaum zu beobachten und die Assemblierung von Tom40 in den 400 kDa TOM-Core-Komplex unterblieb. Vermutlich handelt es sich bei Mim1 um einen Assemblierungsfaktor des TOM-Komplexes. Mim1 ist jedoch keine Komponente des TOM- oder TOB-Komplexes, sondern liegt in der Außenmembran von *S. cerevisiae* in einem ebenfalls ca. 300 kDa großen Komplex vor.

Welche Funktion Mim1 in der Assemblierung des TOM-Komplexes erfüllt, ist bisher nicht verstanden. Jedoch ist auffällig, dass die Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen von allen in Pilzen identifizierten Mim1-Proteinen hoch konserviert ist. Dies deutet auf Lokalisation der Funktion im Bereich der Transmembrandomäne von Mim1 hin. Möglicherweise gehört Mim1 zu einer neuen Familie von Chaperonen, die ihre Faltungsassistenz innerhalb einer Membran ausüben können.

5. Zusammenfassung

Die Translokase der mitochondrialen Außenmembran TOM-Komplex erkennt alle in Mitochondrien zu importierenden Proteine und vermittelt den Transfer in oder über die Membran. Der Mechanismus der Translokation ist allerdings bisher nur teilweise verstanden. Strukturelle Informationen über den TOM-Komplex können Fragen nach den Detailschritten beantworten helfen.

Aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* wurde der TOM-Komplex so aufgereinigt, dass Ausbeute und Reinheit strukturelle Untersuchungen mittels Proteinkristallographie ermöglichten. Kristalle des TOM-Komplexes wurden gewonnen und Beugungsexperimente durchgeführt. Die Auflösung der erhaltenen Kristalle des TOM-Komplexes war nicht ausreichend, um Aussagen über die Raumgruppe oder den strukturellen Aufbau des Komplexes treffen zu können. Deshalb wurde das Reinigungsverfahren weiter optimiert sowie eine Reihe von Mutanten des TOM-Komplexes untersucht. Bisher konnte jedoch keine Verbesserung der Beugungsdaten erreicht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren vier Untereinheiten des TOM-Core-Komplexes von *N. crassa* bekannt: Tom40, Tom22, Tom7 und Tom6. Im ansonsten vergleichbar aufgebauten TOM-Core-Komplex von *S. cerevisiae* war noch eine weitere Komponente Tom5 beschrieben worden. Daher wurde im Vorfeld der Kristallisationsexperimente die Zusammensetzung des *N. crassa* TOM-Komplexes massenspektrometrisch analysiert, wobei Tom5 als eine weitere Tom-Untereinheit in *N. crassa* identifiziert werden konnte. Aufgrund von Experimenten mit *S. cerevisiae* wurde eine Rolle des Tom5 im Proteinimport in Mitochondrien postuliert. Im Gegensatz hierzu hatte Tom5 in *N. crassa* keinen Einfluß auf den Proteinimport. Auch auf die Assemblierung des TOM-Komplexes und das Wachstum der Zellen wirkte sich eine Deletion von Tom5 in *N. crassa* nicht negativ aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen allerdings eine solche Funktion auch in Hefe als fraglich erscheinen. Vielmehr deuten die hier vorgelegten Befunde auf eine strukturelle Funktion von Tom5 bei der Stabilisierung des TOM-Komplexes hin.

Um weitere neue Komponenten des Import- und Assemblierungsapparates der mitochondrialen Außenmembran zu finden, wurde eine massenspektrometrische Analyse der Proteine von isolierten Außenmembranvesikeln aus *N. crassa* durchgeführt. Hierbei wurde Mim1 als bisher unbekanntes Außenmembranprotein identifiziert. Mim1 liegt in einem 300 kDa-Komplex vor und es wurde eine essentielle Funktion von Mim1 bei der Assemblierung des TOM-Komplexes nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

- 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.
- Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1995) The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/lsp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol.*, **15**, 6196-6205 issn: 0270-7306.
- 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.
- Athenstaedt, K. und Daum, G. (2000) 1-Acyldihydroxyacetone-phosphate reductase (Ayr1p) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the open reading frame YIL124w is a major component of lipid particles. *J Biol Chem.*, **275**, 235-240.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D. und Daum, G. (1999) Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.*, **181**, 6441-6448.
- Bacon, R.A., Salminen, A., Ruohola, H., Novick, P. und Ferro-Novick, S. (1989) The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J Cell Biol.*, **109**, 1015-1022.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F. und Forte, M. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci.*, **26**, 112-117.
- Bonaldi, T., Imhof, A. und Regula, J.T. (2004) A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications. *Proteomics*, **4**, 1382-1396.
- Bos, M.P. und Tommassen, J. (2004) Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol.*, **7**, 610-616.
- 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 issn: 10021-19258.
- de Keyzer, J., van der Does, C. und Driessen, A.J. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci.*, **60**, 2034-2052.
- Dembowski, M., Kunkele, 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.
- Dietmeier, K., Honlinger, 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.
- DiMauro, S. und Schon, E.A. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.*, **348**, 2656-2668.
- Dutzler, R., Campbell, E.B. und MacKinnon, R. (2003) Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science*, **300**, 108-112.
- 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.
- Esaki, M., Kanamori, T., Nishikawa, S., Shin, I., Schultz, P.G. und Endo, T. (2003) Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation. *Nat Struct Biol*, **10**, 988-994.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K. und Shaw, J.M. (2004) Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol*, **167**, 87-98.
- Gibson, B.W. (2005) The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 927-934.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. und Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Guthrie, C. und Fink, G.R.e. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hönlinger, 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 issn: 0261-4189.
- 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.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T. und Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure Fold Des*, **8**, 669-684.
- Hunte, C. und Michel, H. (2002) Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 503-508.
- 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.

- Kang, D. und Hamasaki, N. (2005) Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem*, **12**, 429-441.
- Klier, H., Magdolen, V., Schricker, R., Strobel, G., Lottspeich, F. und Bandlow, W. (1996) Cytoplasmic and mitochondrial forms of yeast adenylate kinase 2 are N-acetylated. *Biochim Biophys Acta*, **1280**, 251-256.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. und Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **405**, 914-919.
- 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.
- 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. (1998a) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019 issn: 0092-8674.
- Künkele, K.P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F.E., Henry, J.P., Neupert, W., Lill, R. und Thieffry, M. (1998b) The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem*, **273**, 31032-31039.
- Kuwana, T. und Newmeyer, D.D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 691-699.
- Kyhse Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J-Biochem-Biophys-Methods*, **10**, 203-209 issn: 0165-0022x.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 issn: 0028-0836.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Müller, 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.
- 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.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., Trocheset, M., Morse, D., Krogan, N.J., Hiley, S.L., Li, Z., Morris, Q., Grigull, J., Mitsakakis, N., Roberts, C.J., Greenblatt, J.F., Boone, C., Kaiser, C.A., Andrews, B.J. und Hughes, T.R. (2004) Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell*, **118**, 31-44.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K., Pfanner, N. und Ryan, M. (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.
- 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.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **66**, 863-917.
- Ng, J.D., Gaviraa, J.A. und García-Ruíz, J.M. (2003) Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination. *J. Struct. Biol.*, **142**, 218-231.
- Nosek, J., Tomaska, L., Fukuhara, H., Suyama, Y. und Kovac, L. (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet*, **14**, 184-188.
- Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B. und Michel, H. (1995) Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. *Nat Struct Biol*, **2**, 842-846.
- Paschen, S.A. und Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life*, **52**, 101-112.
- 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.
- Prokisch, H., Neupert, W. und Westermann, B. (2000) Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*, **11**, 2961-2971.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D. und Steinmetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*, **2**, e160.
- 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.*, **27**, 191-197.
- Rapaport, D., Mayer, A., Neupert, W. und Lill, R. (1998) cis and trans sites of the TOM complex of mitochondria 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., Kaser, 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.
- Ryan, M.T., Wagner, R. und Pfanner, N. (2000) The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 13-21.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231 issn: 0003-2697.
- Scheffler, I.E. (2001) Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev*, **49**, 3-26.
- Schmidt, W.K., Tam, A., Fujimura-Kamada, K. und Michaelis, S. (1998) Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11175-11180.

- 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.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- 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.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C. und Rapoport, T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36-44.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
- Veenendaal, A.K., van der Does, C. und Driessen, A.J. (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 81-95.
- Vogel, H.J. (1964) Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The Americ. Nat.*, **98**.
- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W. und Rapoport, 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 Rapoport, 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 Rapoport, D. (2003) Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem*, **278**, 42064-42071.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V.V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (2001) Purification and Characterization of the Preprotein translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from *Arabidopsis*. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol*, **125**, 943-954.
- Wichmann, H., Hengst, L. und Gallwitz, D. (1992) Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). *Cell*, **71**, 1131-1142.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, 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.
- Wimley, W.C. (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 404-411.
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K. und Hartl, F.U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 781-791.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. und MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**, 43-48.

Im Rahmen dieser Dissertation entstandene Publikationen:

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.

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.

Schmitt, S., Prokisch, H., Schlunck, T., Camp II, D.G., 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 Vorbereitung).

Lebenslauf

Simone Schmitt

Persönliche Daten

Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	30.09.1975
Geburtsort	Weinheim/Bergstraße

Ausbildung

06/1995	Abitur an der Martin-Luther-Schule in Rimbach/Odenwald
10/1995-07/2000	Studium an der Philipps-Universität in Marburg im Fachbereich Medizin. Studienfach Humanbiologie mit Hauptfach Molekularbiologie.
08/1999-07/2000	Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. Rolf Müller am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung. Thema der Arbeit: Entwicklung dualspezifischer Expressionssysteme für die Gentherapie von Tumoren.
07/2000	Abschluß des Studiums als Diplom-Humanbiologin.
10/2000	Beginn der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Institut für Physiologische Chemie der LMU München.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Gruppe zu arbeiten, bedanken. Ohne sein fortwährendes Interesse sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer, der diese Arbeit gegenüber der Fakultät für Chemie vertritt.

Danke auch an meine "Chefchen" Prof. Dr. Stephan Nußberger, Dr. Michael Groll und Dr. Doron Rapaport die auch im Durcheinander meiner vielen Projekte immer versuchten, den Überblick zu behalten und mir mit vielen Diskussionen und Anregungen hilfreich zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Uwe Ahting und Markus Dembowski, die mich am Anfang meiner Doktorarbeit in die Geheimnisse des biochemischen Arbeitens eingeweiht haben. Ohne ihre unermüdlichen Erklärungen könnte ich heute vermutlich weder eine ÄKTA noch eine UZ bedienen.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei Frau Braun bedanken, die mich in der Kultivierung von *Neurospora crassa* und der Methode der Isolierung von Außenmembranvesikeln unterwiesen hat. Beides hatte großen Anteil am Erfolg dieser Arbeit. Gleicher Dank gilt auch Dr. Frank Nargang. Ohne die von ihm hergestellten *Neurospora crassa* Stämme wäre die Kristallisation des TOM-Komplexes unmöglich.

Dass das wissenschaftliche Arbeiten nie ins Stocken gerät, dafür muß in diesem Labor vielen Menschen gedankt werden: Frau Köber, Frau Lapschansky und Frau Reisenauer, die zuverlässig für gespülte Utensilien, gesteckte Spitzen, autoklavierte Puffer, so viele andere Kleinigkeiten und nicht zu vergessen, den "Reisenauer-Kaffee" gesorgt haben. Die Werkstatt: Willi, Gerd und Peter, die immer Zeit und Rat hatten, wenn etwas nicht so funktionierte, wie es sollte. Frau Döge, Frau Farsen und Frau Hauck, die trotz aller Bürokratie immer einen Ausweg fanden. Kiki, der für alle Computerprobleme eine Lösung wußte. Und natürlich Zdenka: ohne ihre hervorragende Organisation der Neurosporazucht und unzählige Isolierungen von Mitochondrien und Außenmembranvesikeln hätten sehr viele Experimente sehr viel mehr Zeit und Nerven gekostet.

Dank auch an alle Gruppenmitglieder Uwe, Ute, Melissa, Ljudmila, Christian, Patrick, Jutta, Igor und Ravi für die gute Zusammenarbeit. Dabei möchte ich auch allen "Nicht-Gruppenmitgliedern" für das gute Arbeitsklima danken, besonders: Christian, Stefan, Flo, Marc, Thomas, Carsten, Christiane, Alex, Annette, Anja, Tanja, Patricia und Agathe.

Zum Schluß möchte ich meinen Eltern danken, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit immer umfassend unterstützt haben.