

Biogenese mitochondrialer Proteine mit C-terminalem Anker

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

von
Christian Kemper
aus
Gräfelfing
München
2008

Dissertation eingereicht am 20.06.2008

1. Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger
 2. Gutachter: Prof. Dr. Dario Leister
- Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Herkunft, Struktur und Funktion von Mitochondrien	1
1.2. Biogenese von Mitochondrien	2
1.2.1. Übersicht über den Proteinimport in Mitochondrien	3
1.2.2. Interaktion cytosolischer Chaperone mit Vorstufenproteinen	4
1.2.3. Cotranslationaler oder posttranslatinaler Import?	5
1.2.4. Mitochondriale Signalsequenzen	6
1.2.5. Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex)	7
1.2.6. Die Translokase der inneren Membran (TIM23 Translokase)	11
1.2.7. Die <i>Carrier</i> -Translokase der inneren Membran (TIM22 Translokase)	13
1.2.8. Die OXA1 Translokase	14
1.2.9. Der Erv1/Mia40 Importweg	15
1.3. Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine	16
1.3.1. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine	16
1.3.2. Signalsequenzen mitochondrialer Außenmembranproteine	17
1.3.3. Biogenese von β -Barrel Membranproteinen	18
1.3.4. Biogenese von Proteinen mit C-terminalem Anker (CTA-Proteine)	19
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Präparation)	22
2.1.1.2. DNA-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)	22
2.1.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.1.3. Modifikation von DNA durch Enzyme	23
2.1.3.1. Restriktionsverdau von DNA	23
2.1.3.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	23
2.1.3.3. Ligation	24
2.1.4. Reinigung und Analyse von DNA	24
2.1.4.1. Gelelektrophorese von DNA	24
2.1.4.2. Elution von DNA aus Agarosegelen	24
2.1.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.1.5. Einführung von Punktmutationen mit dem <i>QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	25
2.1.6. Präparation und Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	25
2.1.6.1 Präparation kompetenter Zellen	25
2.1.6.2. Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	26
2.1.7. Verwendete Plasmide	26
2.1.8. Klonierungsstrategien	27

2.2. Methoden der Hefegenetik	28
2.2.1. Verwendete Hefestämme	28
2.2.2. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.3. Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“)	30
2.2.4. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	30
2.2.5. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	30
2.3. Biochemische Methoden	31
2.3.1. Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	31
2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.3.3. High Tris-Harnstoff SDS-PAGE	33
2.3.4. Coomassie-Färbung von Gelen	33
2.3.5. Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen	34
2.3.6. Autoradiographie	34
2.3.7. Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.3.8. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	34
2.3.9. Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	35
2.3.10. Herstellung von Lipidvesikeln aus Phospholipiden	35
2.4. Methoden der Zellbiologie	35
2.4.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe	35
2.4.2. Isolierung von Rohmitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.4.3. Isolierung von Mitochondrien	36
2.4.3.1. Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.4.3.2. Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i>	37
2.4.4. Subfraktionierung von Hefezellen	37
2.4.5. <i>In vitro</i> Proteinimport in Mitochondrien und Lipidvesikel	38
2.4.6. <i>In vitro</i> Proteinimport in Mitochondrien, Microsomen und Lipidvesikel mit anschließender IASD-Markierung	39
2.4.7. Erzeugung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen	39
2.4.8. Carbonatextraktion	39
2.4.9. Mikroskopie	40
2.4.9.1 Fluoreszenzmikroskop	40
2.4.9.2 Konfokalmikroskop	41
2.5. Immunologische Methoden	41
2.5.1. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western Blot)	41
2.5.2. Coimmunfällung	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Die Transmembrandomäne von Proteinen mit C-terminalem Anker reicht für die Lokalisation in der Außenmembran aus	43
3.2. Entwicklung einer spezifischen Methode zur Analyse der Membraninsertion von Proteinen mit C-terminalem Anker	44
3.3. Die Insertion von Fis1 ist unabhängig von den Importrezeptoren Tom20 und Tom70	49
3.4. Die bekannten Importkomponenten der Außenmembran werden nicht für die Insertion von Fis1 benötigt	52
3.5. Fis1 kann in Lipidvesikel mit niedriger Ergosterolkonzentration integriert werden	58
3.6. Insertion von Fis1-TMC-4Q in Lipidvesikeln und Microsomen	63

4. Diskussion	65
4.1. Die Transmembrandomäne enthält die Information für die mitochondriale Lokalisation	65
4.2. Entwicklung einer spezifischen Methode für die Beobachtung der Insertion in die Membran	65
4.3. Die Insertion von Proteinen mit C-terminalem Anker ist unabhängig von den bekannten Translokationskomplexen der Außenmembran	66
4.4. Ein niedriger Ergosterolgehalt der Membran ist die Voraussetzung für die Membraninsertion	67
4.5. Mögliche Mechanismen der Membraninsertion	69
5. Zusammenfassung	73
6. Literatur	75
7. Abkürzungen	93

1. Einleitung

1.1. Herkunft, Struktur und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen, die aus zwei Membranen und vier Subkompartimenten, der äußeren Membran, dem Intermembranraum, der inneren Membran und der Matrix, bestehen. Der evolutionäre Ursprung dieser Organellen wird von der Endosymbiontentheorie beschrieben und lässt sich auf ein frei lebendes aerobes α -Proteobakterium zurückführen (Gray et al., 1999). Dies konnte durch Analyse mitochondrialer DNA (mtDNA), ihrer Gene und deren Expressionsmuster gezeigt werden. Mitochondrien weisen noch immer typisch prokaryotische Eigenschaften auf (Gray et al., 1999). Wie Prokaryoten besitzen Mitochondrien größtenteils ein ringförmiges Chromosom sowie 70S Ribosomen. Heutige eukaryotische Zellen sind also durch die Endosymbiose aerober Eubakterien und einer anaeroben Vorläuferzelle der Eukaryoten entstanden. Im Laufe der Evolution und der Anpassung an die Endosymbiose gingen einige Gene verloren. Der Großteil der Gene, die mitochondriale Proteine kodieren, wurde aber in den Zellkern transferiert. Auf dem mitochondrialen Genom ist nur noch etwa 1% der Proteine kodiert. Dies entspricht in *Saccharomyces cerevisiae* 8 Proteinen und in *H. sapiens* 13 Proteinen. Dadurch wurden Mitochondrien von ihrer Wirtszelle abhängig und können nicht mehr als autonomer Organismus existieren. Andererseits sind Mitochondrien im Laufe der Evolution essenzielle Bestandteile der eukaryotischen Zelle geworden, die eine Vielzahl wichtiger Aufgaben erfüllen.

Mitochondrien sind der Ort der Energiegewinnung für die Zelle. In ihnen finden die oxidative Phosphorylierung, wobei ATP gebildet wird, der Citrat-Zyklus, sowie die β -Oxidation statt. Außerdem erfüllen Mitochondrien viele andere Aufgaben, zu denen die Synthese von Aminosäuren, Lipiden, Häm und vieler Coenzyme gehören. Eine essenzielle Aufgabe von Mitochondrien ist die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (Lill und Kispal, 2000; Mühlhoff und Lill, 2000).

Neben wichtigen Aufgaben, die das Überleben der Zelle sichern, spielen Mitochondrien auch eine wichtige Rolle bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, welcher sich durch die Freisetzung von Cytochrom *c*, dem Apoptose Induzierenden Faktor (AIF) und anderer Proteine auszeichnet (Jiang und Wang, 2004). Ebenso spielen sie eine wichtige Rolle beim Altern des Organismus (Trifunovic et al., 2004) und bei der Ca^{2+} Homöostase (Gunter et al., 2004). Eine neu entdeckte Funktion von Mitochondrien ist die Beteiligung an der angeborenen Immunantwort auf

virale Infektionen. Diese Funktion übernimmt das Protein MAVS (mitochondriales antivirales Signaling), welches die Bildung von Interferon α und Interferon β stimuliert (Seth et al., 2005).

Defekte in mitochondrialen Genen können zu schwerwiegenden Erbkrankheiten führen. So kann eine Mutation des Gens *OPA1*, welches ein dem Dynamin ähnliches Protein exprimiert, eine autosomal dominante optische Atrophie (ADOA) auslösen (Alexander et al., 2000). Eine Mutation im Gen *FRDA*, welches das Protein Frataxin kodiert, führt zu einer Störung der Biogenese von Eisen-Schwefel-Clustern und löst das Friedreich-Syndrom, eine neurodegenerative Krankheit, aus (Puccio und Koenig, 2000).

Neuere Studien konnten Hinweise darauf finden, dass Mitochondrien auch an neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson beteiligt sind. In an Alzheimer erkrankten Nervenzellen ist das Amyloidvorstufenprotein (APP) in Mitochondrien anzutreffen. Dort verstopft es die Importporen des TOM- und des TIM23-Komplexes. Dies hat zur Folge, dass der Import von Untereinheiten der Atmungskette stark beeinträchtigt ist (Lin und Beal, 2006). Mutationen in den mitochondrialen Proteinen Dj1, Pink1 und Omi/Htra2 können bei Parkinsonpatienten beobachtet werden. Diese Mutationen haben mitochondriale Dysfunktionen und oxidativen Stress zur Folge und führen zum Zelltod (Abou-Sleiman et al., 2006).

In der eukaryotischen Zelle bilden Mitochondrien dynamische Strukturen, die sich bewegen, sich teilen und fusionieren können. Diese Eigenschaften sind eine wichtige Anpassung an die Energiebedürfnisse der Zelle und stellen sicher, dass bei einer Zellteilung die Tochterzelle mit ausreichend Mitochondrien versorgt wird (Reichert und Neupert, 2002; Yoon und McNiven, 2001). Mitochondrien können nicht *de novo* gebildet werden und entstehen also nur durch Teilung bestehender Mitochondrien.

1.2. Biogenese von Mitochondrien

Etwa 99% der mitochondrialen Proteine werden im Zellkern kodiert, an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und in das richtige Subkompartiment der Organelle importiert (Holroyd und Erdmann, 2001; Jensen und Dunn, 2002; Koehler et al., 1999; Neupert, 1997; Pfanner und Geissler, 2001; Robinson et al., 2001; Schnell und Hebert, 2003; Soll und Schleiff, 2004). Um die Proteine an ihren Zielort zu bringen, sind mehrere Proteine, die auch Komplexe bilden, nötig.

1.2.1. Übersicht über den Proteinimport in Mitochondrien

Der Transport kernkodierter Proteine in Mitochondrien verläuft über Translokationsmaschinen, welche in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert sind (siehe Abb. 1). Vorstufenproteine werden zunächst durch einen Proteinkomplex, der aus Rezeptoren und einer Pore besteht, der Translokase der mitochondrialen Außenmembran (TOM) erkannt (Abe et al., 2000; Bolliger et al., 1995; Brix et al., 1997; Söllner et al., 1992). Durch die Importpore werden die Vorstufenproteine zumindest teilweise entfaltet transportiert, da sie nicht in der Lage sind, in gefaltetem Zustand die Importkanäle zu passieren (Eilers und Schatz, 1986; Wiedemann et al., 2001).

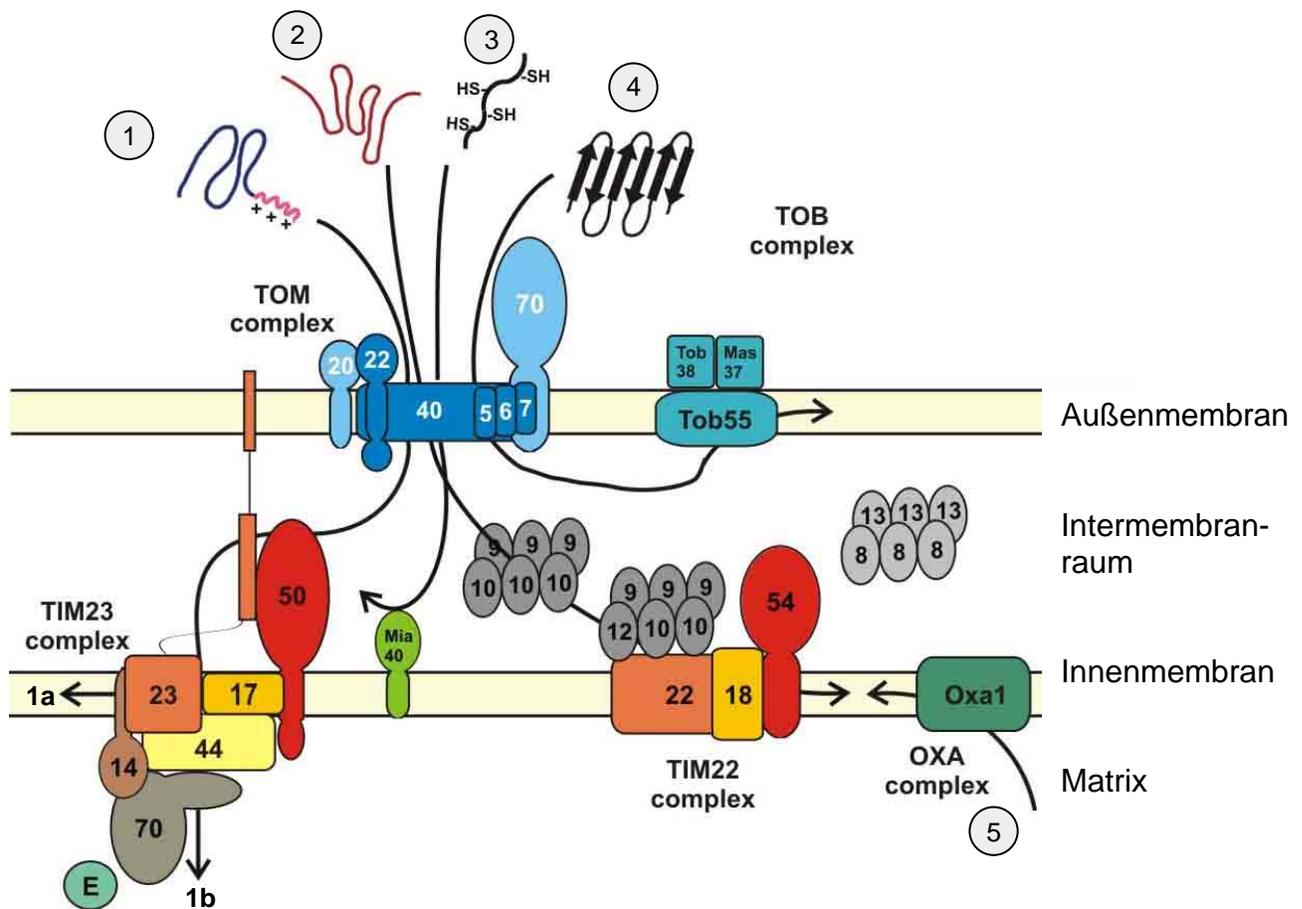


Abb.1. Mitochondriale Translokasen und Importwege. 1) Vorstufenproteine mit einer Präsequenz werden über den TOM-Komplex zur TIM23-Translokase gebracht und von ihr in die Innenmembran (1a) oder die Matrix (1b) importiert. 2) Vorstufenproteine mit internen Signalsequenzen werden über den TIM22-Komplex in die Innenmembran eingebaut. 3) Kleine Proteine, die im Intermembranraum verbleiben, diffundieren durch den TOM-Komplex und werden von Erv1/Mia40 eingefangen 4) β-Barrel Proteine werden nach Translokation durch den TOM-Komplex vom TOB-Komplex in die Außenmembran eingebaut. 5) Oxa1 baut kern- und mitochondrial kodierte Proteine von der Matrixseite in die Innenmembran ein. E = Mge1, 70 = Hsp70.

Nachdem der TOM-Komplex passiert ist, gibt es eine Trennung der Importwege, die durch individuelle oder multiple Elemente der Primärstruktur des Vorstufenproteins bestimmt werden (Jensen und Johnson, 2001; Endo et al., 2003; Koehler, 2004; Rehling et al., 2004; Wiedemann et al., 2004; Dolezal et al., 2006; Neupert und Herrmann, 2007). Proteine mit einer β -Barrel-Struktur werden vom TOM-Komplex zum TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins*), der auch SAM-Komplex (*sorting und assembly machinery*) heißt, weitergeleitet. Dieser inseriert die β -Barrel-Vorstufenproteine in die äußere Membran (Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Proteine, die in oder durch die innere Membran transportiert werden, werden vom TOM-Komplex an den TIM22- oder TIM23-Komplex geleitet, die jeweils eine andere Substratspezifität besitzen. Der TIM22-Komplex sorgt für eine spannungsabhängige Insertion multitopischer Proteine, wie z. B. Tim23, Tim17 und die Carrier-Proteinfamilie in die Innenmembran. Der TIM23 Komplex sorgt für die Translokation von Vorläuferproteinen mit einem Matrixlokalisierungssignal (Paschen und Neupert, 2001). Der Export von mitochondrial oder nukleär kodierten Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran erfolgt durch eine weitere Translokase der Innenmembran, dem OXA1-Komplex (Hell et al., 2001). Kleine Proteine mit konservierten Cysteinresten, die im Intermembranraum lokalisiert sind, gelangen durch die Importpore des TOM-Komplexes und werden auf der *trans*-Seite des Komplexes durch das MIA-ERV Disulfidbrücken-Transfer-System über Disulfidbrücken gebunden (Lutz et al., 2003). Dort erhalten sie auch ihre korrekte Faltung (Mesecke et al., 2005)

1.2.2. Interaktion cytosolischer Chaperone mit Vorstufenproteinen

Die meisten mitochondrialen Proteine werden cytosolisch synthetisiert und dann durch das Cytosol mit Hilfe von Chaperonen an die Mitochondrien geleitet. Die Aufgabe der Chaperone ist es dabei, die Vorstufenproteine vor Aggregation und Fehlfaltung zu bewahren. Eine Klasse dieser Chaperone stellen die 70 kDa schweren Hitzeschockproteine (Hsp70) dar, welche in Abhängigkeit von ATP frisch synthetisierte Vorstufenproteine in einer importkompetenten Konformation halten. Jedoch ist Hsp70 auch am Transport von Vorstufenproteinen in andere Zellkompartimente, zu denen der Zellkern und das Endoplasmatische Retikulum (ER) gehören, beteiligt und damit nicht spezifisch für Mitochondrien (Mihara und Omura, 1996). Das Protein Ydj1 (auch Mas5), ein Homolog zu DnaJ aus *E. coli* und Hsp40 aus Hefe, spielt eine wichtige Rolle für den Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien, indem es hilft, Komplexe aus einem Vorstufenprotein und Hsp70 an die mitochondriale Außenmembran zu geleiten (Caplan et

al, 1991; Caplan et al., 1992; Atencio et al., 1992). Am Transport mitochondrialer Vorstufenproteine ist in Säugerzellen ein weiteres Hitzeschockprotein, Hsp90, beteiligt (Young et al., 2003). Ein weiteres Chaperon, das beim Transport mitochondrialer Vorstufenproteine eine Rolle spielt, ist der Faktor MSF (*mitochondrial import stimulating factor*). Er erkennt Vorstufenproteine, unabhängig davon, ob sie eine abspaltbare Präsequenz oder nicht besitzen. Die ATPase-Aktivität dieses Chaperons wird durch Bindung an Vorstufenproteine induziert (Mihara und Omura, 1996).

1.2.3. Cotranslationaler oder posttranslatinaler Import?

Die Frage, ob der Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien *in vivo* co- oder posttranslational abläuft, ist noch nicht eindeutig geklärt. Für beide Wege gibt es Daten, die sie unterstützen. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten in Hefe unter bestimmten Bedingungen cytosolische Ribosomen gefunden werden, die mit Mitochondrien assoziiert waren. Zusammen mit biochemischen Daten wurde dies als Beweis für eine cotranslationale Translokation von Polypeptidketten in Mitochondrien angesehen (Fujiki und Verner, 1991; Fujiki und Verner, 1993; Verner, 1993). Wenn die Translationsgeschwindigkeit durch die Zugabe von Cycloheximid verlangsamt wird, kann an der Oberfläche von Mitochondrien eine Anhäufung von Ribosomen beobachtet werden. Daraus kann man folgern, dass an die Ribosomen gebundene Vorstufenproteine an der Mitochondrienoberfläche angereichert sind (Kellems et al., 1975). Daher scheinen die relativen Kinetiken von Translation und Translokation die Anreicherung von Polysomen mit mitochondrialen Vorstufenproteinen an der Oberfläche der Mitochondrien zu bestimmen (Beddoe und Lithgow, 2002). Mehrere Beobachtungen stützen die Vorstellung, dass es zumindest bei einigen Proteinen einen cotranslationalen Import geben könnte. Hierbei könnte die Lokalisation der mRNA in der Nähe von Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Mitochondrien spielen (Knox et al., 1998; Marc et al., 2002; Stein et al., 1994).

Andererseits gibt es eine beträchtliche Anzahl an Beweisen für den posttranslationalen Import. So können viele Vorstufenproteine in einem zellfreien System synthetisiert und anschließend posttranslational in isolierte Mitochondrien importiert werden (Harmey et al., 1977; Neupert, 1997). Ein weiterer Beweis ist, dass mRNAs für importierte mitochondriale Proteine sowohl in freien als auch in an Mitochondrien gebundenen Polysomen gefunden werden können (Suissa und Schatz, 1982). Außerdem gibt es Proteine, die ihre Zielsequenz am C-Terminus haben und daher komplett synthetisiert werden müssen, bevor sie zu ihrem Zielort gelangen

(Borgese et al., 2003; Fölsch et al., 1998; Suissa and Schatz, 1982). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Translation und der Import mitochondrialer Vorstufenproteine größtenteils nicht gekoppelt sind und der Großteil des Imports posttranslational abläuft.

1.2.4. Mitochondriale Signalsequenzen

Im Cytosol synthetisierte mitochondriale Vorstufenproteine enthalten die Information, die nötig und ausreichend ist, um an die Mitochondrien geleitet zu werden. Meist liegt diese Information als abspaltbare Sequenz am N-Terminus vor und wird Präsequenz genannt. Diese besteht aus 10 bis 80 Aminosäureresten, die zum Großteil positiv geladen, hydrophob oder hydroxyliert sind (von Heijne et al., 1989). Eine Fusion dieser Präsequenzen an Proteine, die nicht mitochondrial lokalisiert sind, führt zum spezifischen Import des Fusionsproteins in Mitochondrien (Horwich et al., 1985; Hurt et al., 1984). In Membranen oder membranähnlicher Umgebung bilden Präsequenzen amphipathische α -Helices mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite (Abe et al., 2000; Epanand et al., 1986; Roise et al., 1986; Roise et al., 1988). Es wurde angenommen, dass die positiven Ladungen und die amphipathische Struktur der Präsequenz die Erkennung des Proteins durch Rezeptoren begünstigt. Jedoch konnten neuere Arbeiten zeigen, dass unterschiedliche Oberflächen einer Präsequenz von verschiedenen Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt werden können. Dabei werden der hydrophobe Teil von Tom20 und der positiv geladene Teil von Tom22 erkannt (Abe et al., 2000; Brix et al., 1999). In den meisten Fällen werden die Präsequenzen nach dem Import in die Matrix durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) geschnitten (Braun et al., 1992). Einige Matrixproteine, zu denen beispielsweise Rhodanese, 3-oxo-CoA-Thiolase und Chaperonin 10 gehören, enthalten eine N-terminale Signalsequenz, die nicht abgespalten wird. Dabei sind diese Sequenzen den Signalsequenzen, die abgespalten werden sehr ähnlich (Hammen et al., 1996; Jarvis et al., 1995; Waltner und Weiner, 1995). Die DNA-Helikase Hmi1 hat, im Gegensatz zu den meisten Matrixproteinen, ihre Signalsequenz am C-Terminus. Dies führt dazu, dass dieses Protein mit dem C-Terminus zuerst in die Matrix transportiert wird. Anschließend wird das Signalpeptid abgespalten (Lee et al., 1999).

Viele Proteine, die an den Membranen und im Intermembranraum lokalisiert sind, enthalten eine interne Signalsequenz aus einer Transmembrandomäne und einem darauf folgenden positiv geladenem Segment, welches zu einem spezifischen Arrest des Vorstufenproteins in der entsprechenden Membran führt (Gärtner et al., 1995; Glick et al., 1992a; McBride et al., 1992).

Einige Proteine der inneren Membran, z.B. Cytochrom *c1*, und des Intermembranraumes, z.B. Cytochrom *b2*, werden über eine zweigeteilte Signalsequenz sortiert, welche aus einer Matrixsignalsequenz am N-Terminus und einer darauf folgenden hydrophoben Sequenz und anschließenden positiv geladenen Resten besteht. Die Signalsequenz wird an der Oberfläche der inneren Membran durch die heterodimere Innenmembranpeptidase, bestehend aus Imp1 und Imp2, prozessiert (Glick et al., 1992b).

Das Innenmembranprotein BCS1 besitzt zusätzlich noch eine dritte Domäne als Teil seiner Signalsequenz, welche hauptsächlich durch die Importrezeptoren auf der Oberfläche erkannt werden. Nach dem Transport des Vorstufenproteins in einer Schleifenstruktur durch den TOM-Komplex werden für die Sortierung in die Innenmembran alle drei Elemente der Signalsequenz benötigt. (Fölsch et al., 1996; Stan et al., 2003).

Es existieren zwei Möglichkeiten zur Translokation von Vorstufenproteinen in die Innenmembran. Ein Modell, das Stop-Transfer-Modell, besagt, dass Proteine während des Imports in der Innenmembran arretiert werden. Das andere Modell besagt, dass Proteine zunächst in die Matrix importiert werden und dann in die innere Membran geleitet werden (Fölsch et al., 1996; Hartl et al., 1987).

Metabolitentransporter der inneren Membran enthalten keine abspaltbare Signalsequenz, sondern drei bis sechs interne Signalsequenzen, die über die gesamte Länge des Präproteins verteilt sind (Endres et al., 1999; Pfanner und Neupert, 1987; Smagula und Douglas, 1988). Andere Membranproteine, wie die Komponenten der Translokase der inneren Membran, z.B. Tim23, Tim17 und Tim22, enthalten ebenfalls mehrere interne Sortierungssignale wie hydrophobe Segmente und positiv geladene Schleifen (Davis et al., 2000; Káldi et al., 1998; Paschen und Neupert, 2001).

Die Signalsequenzen der Proteine der Außenmembran werden im Kapitel Signalsequenzen mitochondrialer Außenmembranproteine detailliert diskutiert (siehe 1.3.2.).

1.2.5. Die Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex)

Der TOM-Komplex ist die Translokase der Außenmembran und für den Import nahezu aller mitochondrialer Proteine zuständig. Er erkennt Vorstufenproteine im Cytosol, erleichtert die Freisetzung cytosolischer Faktoren, die an Vorstufenproteinen binden, entfaltet cytosolische Proteindomänen und transferiert die Polypeptide durch die Poren der Außenmembran. Der TOM-Komplex wurde in verschiedenen Organismen untersucht, wobei die meisten Studien in den

Pilzen *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt wurden. In diesen beiden Organismen konnten nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden. Auch in Tieren und Pflanzen sind Struktur und Funktion vergleichbar (Hoogenraad et al., 2002; Braun et al., 1999; Mori et al., 1998).

Der Multiproteinkomplex hat eine molekulare Masse von etwa 490 bis 600 kDa (Ahting et al., 1999; Künkele et al., 1998) und besteht aus sieben Untereinheiten: Tom70, Tom40, Tom22, Tom20, Tom7, Tom6 und Tom5 (Neupert, 1997; Pfanner und Geissler, 2001). Tom20, Tom22 und Tom70 verfügen über Domänen, die in das Cytosol ragen und sind die Hauptrezeptoren des Komplexes (Hines et al., 1990; Hines und Schatz, 1993; Kiebler et al., 1993; Moczko et al., 1992; Söllner et al., 1989). Die beiden Rezeptoren Tom20 und Tom70 sind über Tom22 lose mit dem TOM-Kernkomplex, bestehend aus Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5, assoziiert. Der TOM-Kernkomplex wird auch als generelle Import-/Insertionspore (GIP) bezeichnet (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998; Künkele et al., 1998). Tom20 und Tom22 sind an der Translokation der meisten Vorstufenproteine, vor allem derer mit N-terminaler Signalsequenz, beteiligt (Harkness et al., 1994; Lithgow et al., 1995). Tom20 ist aber auch in der Lage, Proteine ohne Signalsequenz zu erkennen, wie die Außenmembranproteine Porin (Schleiff et al., 1999), Tom40 (Rapaport und Neupert, 1999) und die Cytochrom *c* Häm-Lyase (Diekert et al., 1999). Mitochondriale Vorstufenproteine mit interner Signalsequenz, wie die Familie der Metabolitentransporter binden an Tom70 (Brix et al., 1999; Schlossmann et al., 1994).

Die Rezeptoren Tom20 und Tom70 unterscheiden sich zwar in ihrer Substratspezifität, überlappen aber in ihrer Funktion und können sich teilweise ersetzen. Dies wird auch dadurch deutlich, dass die gleichzeitige Deletion beider Rezeptoren letal ist (Ramage et al., 1993), die Deletion eines der beiden Rezeptoren jedoch nicht. Tom70 tendiert dazu, Dimere zu bilden. Dabei spielt die Transmembrandomäne eine wichtige Rolle (Millar und Shore, 1994; Söllner et al., 1992). Tom20 und Tom70 besitzen beide ein Motiv aus 34 Aminosäuren, welches Tetratricopeptid- Wiederholung (TPR) genannt wird. Während Tom20 eine TPR-Domäne besitzt (Haucke et al., 1996), besitzt Tom70 elf dieser Domänen (Wu und Sha, 2006; Chan et al., 2006). Dieses Motiv befindet sich in den cytosolischen Domänen der beiden Rezeptoren und dient sowohl der Protein-Protein-Interaktion mit Vorstufenproteinen als auch der Interaktion mit cytosolischen Chaperonen (Haucke et al., 1996; Young et al., 2003). In *S. cerevisiae* interagiert Tom70 mit Hsp70. In Säugern sind Tom70-abhängige Vorstufenproteine mit Hsp70 und Hsp90 assoziiert und bilden einen Multichaperonkomplex. Die Bindung erfolgt dabei über eine

spezialisierte TPR-Domäne des Rezeptors (Young et al., 2003). Tom20 interagiert in Säugern mit den TPR-Motiven des Arylhydrocarbonrezeptor-interagierenden Proteins (AIP) und könnte ähnlich wie Tom70 mit präproteinbindenden Chaperonen interagieren (Yano et al., 2003).

Ein weiterer Rezeptor, der nur in *S. cerevisiae* vorkommt, ist Tom71. Tom71 und Tom70 besitzen 53% Sequenzidentität und 70% Ähnlichkeit zueinander und könnten möglicherweise durch Genduplikation entsandt sein. Das könnte erklären, dass Tom71 nur in Hefe gefunden werden kann. Sie besitzen aber nicht dieselben Funktionen. Tom71 wird nur in geringen Mengen exprimiert und ist mit dem TOM-Komplex lose assoziiert. Die Deletion von Tom71 beeinflusst den Import Tom70-abhängiger Vorstufenproteine nur minimal, unabhängig davon, ob Tom70 vorhanden ist oder nicht. Bis heute ist die Funktion von Tom71 noch weitestgehend unklar (Schlossmann et al., 1996).

Nach dem Binden der Vorstufenproteine an Tom20 oder Tom70 werden sie zur GIP transferiert. Dabei spielt Tom22 eine entscheidende Rolle. Die cytosolische Domäne von Tom22 kann mit der hydrophilen Seite der Präsequenzen interagieren und dient als weiterer Rezeptor (Brix et al., 1997). Tom22 ist ein integraler Bestandteil der GIP (van Wilpe et al., 1999) und sorgt für die Insertion der Polypeptidkette in den TOM-Kanal (Dietmeier et al., 1997).

Der TOM-Kanal ist aus mehreren Tom40-Molekülen aufgebaut, die möglicherweise Dimere als Grundstruktur bilden (Rapaport et al., 1998). Tom40 ist eine essenzielle Tom-Komponente und durchspannt die Außenmembran mit mehreren β -Faltblättern, die eine β -Barrelstruktur ausbilden (Hill et al., 1998; Künkele et al., 1998). Aufgereinigtes Tom40 konnte in Liposomen rekonstituiert werden, in denen es alleine in der Lage war, einen kationenselektiven spannungsgesteuerten Kanal, ähnlich dem des TOM-Komplexes zu bilden (Ahting et al., 2001; Hill et al., 1998; Stan et al., 2000). Pro GIP sind ungefähr sechs Kopien von Tom40 vorhanden. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen konnte ermittelt werden, dass der GIP-Komplex aus zwei bis drei Kanälen besteht (Ahting et al., 1999; Künkele et al., 1998; Model et al., 2002). Ein Kanal besitzt einen Porendurchmesser von etwa 22 Å (Hill et al., 1998; Schwartz und Matouschek, 1999). Diese Größe reicht aus, um bis zu zwei α -helikale Segmente hindurch zu lassen. Gefaltete Domänen können jedoch nicht durch die Pore gelangen.

Die Translokation von Vorstufenproteinen ist unabhängig von ATP und benötigt auch nicht das Membranpotential über die Innenmembran, aber die treibende Kraft dafür ist noch weitgehend unbekannt. Die „*Binding-chain*“-Hypothese ist ein Erklärungsversuch dafür. Dabei binden Vorstufenproteine mit Präsequenz an Bindestellen mit steigender Affinität, wobei zuerst

eine Interaktion mit der cytosolischen *cis*-Bindungsstelle des TOM-Komplexes, gebildet von den cytosolischen Domänen von Tom20 und Tom22, erfolgt. Der Transport der Präsequenz zur Innenseite der Außenmembran führt zu einer Bindung an die *trans*-Bindungsstelle, die aus Tom40, der C-terminalen Domäne von Tom22 und Tom7 besteht (Bolliger et al., 1995; Endo und Kohda, 2002; Esaki et al., 2004; Meisinger et al., 2001; Moczko et al., 1997; Rapaport et al., 1998a; Schatz, 1997). Die Affinität für eine Bindung ist an der *trans*-Bindungsstelle höher als an der *cis*-Bindungsstelle (Mayer et al., 1995b; Rapaport et al., 1998; Stan et al., 2000), wofür ionische und hydrophobe Wechselwirkungen wichtig sind. An der *trans*-Bindungsstelle übernimmt dann der TIM23-Komplex die gebundenen Vorstufenproteine (Endo et al., 2003).

Die Funktion der kleinen Tom-Komponenten ist nur teilweise verstanden. Tom5 ist eng mit Tom40 assoziiert und könnte eine Verbindung zwischen den Importrezeptoren und der GIP darstellen. Das Protein ist für die Insertion von Polypeptiden in die Translokationspore wichtig. Mehrere teils widersprüchliche Studien konnten die Funktionen von Tom5 weiter entschlüsseln. Es wird angenommen, dass Tom5 ein Rezeptor ist, der die Präproteine von Tom22 übernimmt (Dietmeier et al., 1997). Jedoch reicht für die Funktion von Tom5 die C-terminale Ankerdomäne alleine aus und kann den Deletionsphänotyp komplementieren (Habib et al., 2003; Horie et al., 2003). Eine neuere Studie zeigt, dass die Deletion von Tom5 in *N. crassa* keinen Wachstumsphänotyp und keine Veränderung des Proteinimports nach sich zieht (Schmitt et al., 2005). Außerdem wird Tom5 in *S. cerevisiae* und in *N. crassa* bei höheren Temperaturen für die Stabilität des TOM-Komplexes benötigt. Diese Daten sprechen dafür, dass Tom5 eher eine strukturelle Rolle als die eines Rezeptors übernimmt (Schmitt et al., 2005). Tom6 und Tom7 sind wahrscheinlich an der Regulation der Assemblierung und Disassemblierung von Rezeptorproteinen mit der GIP beteiligt (Dekker et al., 1998; Honlinger et al., 1996). Beide Proteine wurden in *N. crassa* in der Nähe von Tom40 gefunden. Tom6 bildet dabei wahrscheinlich die Verbindung zwischen Tom40 und Tom22 (Dembowski et al., 2001). Tom7 erleichtert die Dissoziation der Translokase, so dass ein kontinuierlicher Austausch von Tom-Proteinen möglich ist (Dekker et al., 1998; Honlinger et al., 1996).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Translokation von Vorstufenproteinen über sequenzielle Interaktionen mit verschiedenen Untereinheiten des TOM-Komplexes, die die Proteine mit zunehmender Affinität binden, abläuft. Anschließend bleiben die Proteine entweder im Intermembranraum oder werden von den Translokasen der inneren Membran (TIMs) übernommen.

1.2.6. Die Translokase der inneren Membran (TIM23 Translokase)

Nach der Translokation über den TOM-Komplex interagieren Proteine mit Präsequenz mit der TIM23 Translokase (Bauer et al., 1996; Dekker et al., 1997).

Der TIM23-Komplex besteht aus Untereinheiten, die einen Kanal durch die Innenmembran bilden (Membransektor) und aus Untereinheiten, die die Translokation durch die Innenmembran in die Matrix durchführen und auch als Importmotor (auch Präsequenztranslokase assoziierter Motor, PAM) bezeichnet werden (Neupert und Herrmann, 2007). Die Translokase besteht aus den zwei phylogenetisch verwandten Membranproteinen Tim17 und Tim23, die von den sechs größtenteils hydrophilen Proteinen Tim50, Tim44, Tim16 (Pam16), Tim14 (Pam18), Tim21 und Pam17 umgeben sind (Rehling et al., 2004).

Die erste Tim-Komponente, die mit einem Präprotein, das vom TOM-Komplex kommt, interagiert, ist Tim50. Es verfügt über eine große Domäne im Intermembranraum, die an Tim23 bindet. Proteine mit Präsequenz assoziieren nach dem Eintritt in den Intermembranraum mit Tim50, das sie dann zur TIM23 Translokase weiterleitet (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002). Die Komponente Tim21 interagiert mit der Intermembranraum-Domäne von Tom22, welches auf eine Interaktion der beiden Komplexe schließen lässt (Chacinska et al., 2005; Mokranjac et al., 2005a). Der Kern des TIM23-Komplexes besteht aus äquimolaren Anteilen von Tim23 und Tim17. Beide Proteine sind essenziell und besitzen eine phylogenetisch verwandte Membrandomäne aus vier Transmembrandomänen (Emtage und Jensen, 1993; Kübrich et al., 1994; Maarse et al., 1994). Zusätzlich besitzt Tim23 am N-Terminus eine Domäne aus etwa 100 Aminosäuren, die in zwei Teile unterteilt werden kann. Der N-terminale Teil (Aminosäuren 1-49) ist in der Außenmembran verankert und kann so den Transfer von Vorstufenproteinen vom TOM-Komplex zur TIM23-Translokase erleichtern und somit die Effizienz des Proteinimports erhöhen (Donzeau et al., 2000). Der zweite Teil der Domäne (Aminosäuren 50-100) enthält eine *coiled-coil*-Domäne, die eine wichtige Rolle für die Dimerisierung von Tim23 und für die Substratbindung spielt (Bauer et al., 1996; Geissler et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Biochemische Untersuchungen zeigen, dass Tim17 und Tim23 mit transportierten Vorstufenproteinen in engem Kontakt stehen (Kübrich et al., 1994; Ryan und Jensen, 1993). Es wird angenommen, dass die Intermembranraumdomäne von Tim23 als Rezeptor für Präsequenzen dient und die integralen Membrandomänen von Tim23 einen Translokationskanal für Vorstufenproteine bilden. Dies kann an aufgereinigtem rekombinanten Tim23 beobachtet werden, da es einen spannungsgesteuerten Kanal, der für Präsequenzen

spezifisch ist, mit einem Durchmesser von etwa 13-24 Å bildet (Truscott et al., 2001). Die Funktion von Tim17 ist noch nicht aufgeklärt. Tim17 besitzt am N-Terminus eine kurze Domäne, die in den Intermembranraum ragt und zwei negative Ladungen besitzt, die für die Rolle von Tim17 sehr wichtig sind (Meier et al., 2004).

Die Tim23-Pore wird über das Membranpotential ($\Delta\psi$) reguliert (Truscott et al., 2001), welches als Triebkraft für den Transport der Präsequenzen durch die Pore in der Innenmembran dient (Martin et al., 1991; Truscott et al., 2001; Krayl et al., 2007). Für die komplette Translokation von Vorstufenproteinen ist auch noch eine zweite treibende Kraft notwendig. Dabei handelt es sich um den ATP-abhängigen Importmotor aus den Komponenten Tim14 und Tim17 (van der Laan et al., 2005), den beiden peripher assoziierten Komponenten Tim16 und Tim44, dem mitochondrialen Hitzeschockprotein mtHsp70 und dem Co-Chaperon Mge1, einem Nukleotidaustauschfaktor im Reaktionszyklus von mtHsp70 (Mayer, 2004). Das hydrophile Matrixprotein Tim44 dient als Verankerung von mtHsp70, so dass dessen ATPase-Domäne an der Austrittsseite des Importkanals zu liegen kommt. Mitochondriales Hsp70 wird zur Translokation des Vorstufenproteins in die Matrix benötigt und verbraucht dabei ATP. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wird durch das J-Protein Tim14 stimuliert. Dadurch sorgt Tim14 für eine effiziente Bindung von mtHsp70 an Präproteine (Mokranjac et al., 2003b; Truscott et al., 2003).

In *S. cerevisiae* konnte ein Homolog zu Tim14, Mdj2, identifiziert werden, welches ebenfalls eine Komponente des Importmotors ist und zumindest *in vitro* die ATPase-Aktivität von mtHsp70 im gleichen Maße wie Tim14 stimuliert (Mokranjac et al., 2005b). Bei Mdj2 könnte es sich, wie im Fall von Tom71, ebenfalls um eine Genduplikation handeln.

Für die Rolle von mtHsp70 beim Proteinimport werden zwei Modelle diskutiert, nämlich das „*Brownian Ratchet*“- und das Translokationsmotor-Modell. Das *Brownian Ratchet* Modell besagt, dass die Polypeptidkette eines Vorstufenproteins im Translokationskanal aufgrund der Brownschen Bewegung oszilliert. Nach einer Einwärtsoszillation in die Matrix kann mtHsp70 passiv einen Teil der Polypeptidkette einfangen. Mehrmalige Wiederholungen dieses Vorgangs würden dann dazu führen, dass das Vorstufenprotein vollständig importiert wird (Neupert und Brunner, 2002). Das Translokationsmotor-Modell hingegen besagt, dass an Tim44 gebundenes mtHsp70 mit dem Vorstufenprotein interagiert, wobei bei mtHsp70 Konformationsänderungen durch die Bindung von ATP auftreten, die eine mechanische Kraft erzeugen, welche das Protein in die Matrix zieht (Matouschek et al., 2000). Für beide Modelle konnten experimentelle und

theoretische Beweise gefunden werden. Mit dem *Brownian Ratchet* Modell können jedoch einige Beobachtungen besser erklärt werden, weshalb angenommen wird, dass es eher zutrifft. Außerdem wird eine Beteiligung des Membranpotentials als treibende Kraft für den Import diskutiert (Geissler et al., 2001; Okamoto et al., 2002; Shariff et al., 2004; D’Silva et al., 2005; Sato et al., 2005; Krayl et al., 2007). In beiden Modellen bindet mtHsp70 ATP-abhängig über Tim44 an die Innenmembran und fördert die Translokation von Präproteinen in die Matrix.

Es existieren zwei Modelle für die Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix und den Einbau von Vorstufenproteinen in die innere Membran. Das erste Modell geht davon aus, dass der TIM23-Komplex in zwei Formen vorliegt. Eine Form besteht aus dem Membransektor und dem Importmotor, die andere Form nur aus dem Membransektor. In der ersten Form ist Tim21 nicht im TIM23-Komplex anwesend. Diese Form dient wahrscheinlich der Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix. In der zweiten Form assoziiert Tim21 mit dem Komplex und der Importmotor dissoziiert und dient wahrscheinlich der Insertion von Proteinen in die Innenmembran (Chacinska et al., 2005). Das zweite Modell geht davon aus, dass es nur eine Form des TIM23-Komplexes gibt, die beide Aufgaben übernimmt. Proteine, die in der Innenmembran lokalisiert sind, besitzen ein Sortierungssignal, das nach der Erkennung durch die Pore zu ihrer lateralen Öffnung führt. Dadurch wird die Transmembrandomäne in der inneren Membran verankert (Popov-Čeleketić et al., 2008).

Nach dem Import eines Vorstufenproteins in die Matrix wird die Präsequenz des Proteins in den meisten Fällen durch die mitochondriale Prozessierungsprotease (MPP) proteolytisch abgespalten (Gakh et al., 2002). Anschließend wird das Protein in seine native Konformation gefaltet, wofür beispielsweise das Chaperon mtHsp70, das Chaperonin Hsp60 und die Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerase zur Verfügung stehen (Cheng et al., 1989; Ostermann et al., 1989).

1.2.7. Die *Carrier*-Translokase der inneren Membran (TIM22 Translokase)

Die zweite Translokase in der mitochondrialen Innenmembran, TIM22, inseriert membranpotenzialabhängig Innenmembranproteine mit mehreren hydrophoben Segmenten wie Tim23, Tim17 und Tim22 und alle *Carrier*-Proteine (Kerscher et al., 1997; Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996). Diese Proteine besitzen wenig charakterisierte Signalsequenzen. Vorstufenproteine werden im Intermembranraum von den kleinen löslichen Tim-Proteinen erkannt. Der 70 kDa große und essenzielle Komplex aus Tim9 und Tim10 wird für den Transport von *Carrier*-Vorstufenproteinen benötigt und der 70 kDa große Tim8-Tim13-

Komplex interagiert mit Tim23-Vorstufenproteinen (Bauer et al., 2000), welches aber auch, im Falle von *N. crassa*, ein Substrat des Tim9-Tim10-Komplexes ist (Vasiljev et al., 2004). Die kleinen Tim-Proteine im Intermembranraum verhindern, ähnlich wie Chaperone, die Aggregation importierter Vorstufenproteine und leiten die Vorstufenproteine zum TIM22-Komplex weiter. Beim Transfer von β -Barrel Vorstufenproteinen vom TOM- zum TOB-Komplex übernehmen sie eine ähnliche Rolle. Der TIM22-Komplex besteht aus peripheren und in die Membran integrierten Untereinheiten. Zu den peripheren Proteinen gehört der 70 kDa große Komplex aus Tim9, Tim10 und Tim12, einer Verbindung zwischen den löslichen membranintegrierten TIM22-Untereinheiten im Intermembranraum (Koehler et al., 1998; Leuenberger et al., 1999; Sirrenberg et al., 1998), sowie aus Tim8 und Tim13. Zu den in die Membran integrierten Proteinen zählen die drei Proteine Tim18, das essenzielle Tim22 und Tim54. Tim22 ist die zentrale Komponente der 300 kDa großen TIM22-Translokase (Sirrenberg et al., 1996) und bildet den Insertionskanal. Durch elektronenmikroskopische Analysen des TIM22-Komplexes konnte eine Doppelpore mit einem Durchmesser von 16 Å erkannt werden (Rehling et al., 2003). Tim54 ist ein nicht essenzielles Membranprotein mit einer großen Domäne im Intermembranraum (Kerscher et al., 1997) und könnte möglicherweise Vorstufenproteine oder andere Translokasekomponenten binden. Das ebenfalls nicht essenzielle Tim18 ist wahrscheinlich für die Stabilität, bzw. die Assemblierung des TIM22-Komplexes wichtig (Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000).

1.2.8. Die OXA1 Translokase

Die OXA1 Translokase in der mitochondrialen Innenmembran ist ein homooligomerer Proteinkomplex, der für die Insertion mehrerer Innenmembranproteine, die sowohl mitochondrial als auch kernkodiert sein können, verantwortlich ist (He und Fox, 1997; Hell et al., 2001; Nargang et al., 2002). Kernkodierte Proteine werden nach ihrem Import in die Matrix durch Oxa1 über einen Exportschritt in die Innenmembran integriert (Hell et al., 1998). Beispiele für solche Proteine sind die mitochondrial kodierte Untereinheit 2 des Cytochrom-Oxidasekomplexes (Cox2) und das kernkodierte Oxa1. Oxa1 durchspannt die Innenmembran fünfmal und besitzt eine C-terminale α -helikale Domäne, die in die Matrix ragt (Herrmann et al., 1997) und mitochondriale Ribosomen binden kann. Auf diese Weise könnte eine kotranslationale Integration von Membranproteinen ermöglicht werden (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Oxa1 ist ein Mitglied der stark konservierten Oxa1/YidC/Alb3-Proteinfamilie, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorkommt (Kuhn et al., 2003). Das prokaryotische YidC ist

ein integrales Membranprotein, das in der an das Cytosol angrenzenden Membran von Bakterien vorkommt. Alb3 (Albino3) ist ein integrales Membranprotein des Thylakoidmembransystems in Chloroplasten und ist wichtig für die Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran (Kuhn et al., 2003).

1.2.9. Der Erv1/Mia40 Importweg

Der mitochondriale Intermembranraum beherbergt eine große Anzahl kleiner Proteine mit einer molekularen Masse von 8 bis 22 kDa. Diese gelangen durch den TOM-Kanal und werden dann im Intermembranraum in ihre aktive Konformation gefaltet. Die Erkennung und Faltung wird vom Erv1/Mia40 Disulfidbrücken-Transfer-System durchgeführt. Die zentrale Komponente, Mia40, besitzt eine sehr konservierte C-terminale Domäne mit einem Motiv aus sechs Cysteinen (CPC-CX₉C-CX₉C), das drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet (Chacinska *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2005; Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Nur in Pilzen besitzt Mia40 am N-Terminus eine hydrophobe Transmembrandomäne, die nicht essenziell ist. Erv1 ist eine Sulphydryloxidase aus einer N-terminalen Domäne mit einem CXXC-Motiv und der C-terminalen FAD-Bindedomäne mit demselben Motiv (Coppock und Thorpe, 2006; Hofhaus *et al.*, 2003). Alle Substrate besitzen ebenfalls stark konservierte Cysteinreste mit einem Zwillingsmotiv aus CX₃C oder CX₉C (Gabriel et al., 2007, Herrmann et al. 2005; Terziyska et al., 2007). Die Substrate von Mia40/Erv1 sind klein genug, um durch den TOM-Komplex in beide Richtungen zu diffundieren. Dies kann durch die Bildung von Disulfidbrücken verhindert werden (Lutz et al., 2003). Nachdem die kleinen Substratproteine in den Intermembranraum gelangt sind, interagieren sie mit oxidiertem Mia40 und bilden dabei intermolekulare Disulfidbrücken aus. Anschließend werden die Substratproteine oxidativ gefaltet, indem schrittweise die Disulfidbrücken im Substratmolekül verändert werden, und es entstehen ein fertig gefaltetes Intermembranprotein und oxidiertes Mia40. Mia40 wird dann durch Erv1 reduziert und steht für einen weiteren Importzyklus zur Verfügung. Auf diese Weise bilden Mia40 und Erv1 ein Disulfidbrücken-Transfer-System, das kleine Proteine durch oxidative Faltung im Intermembranraum hält (Mesecke et al., 2005). Außerdem sind auch andere Proteine an diesem Prozess beteiligt, wie zum Beispiel Hot13, das die Assemblierung und die Aktivität der kleinen Tim-Proteine beeinflusst (Curran et al., 2004). Oxidiertes Erv1 wird durch die Elektronenübertragung von Cytochrom c wieder reduziert (Allen et al., 2005).

1.3. Biogenese mitochondrialer Außenmembranproteine

1.3.1. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine

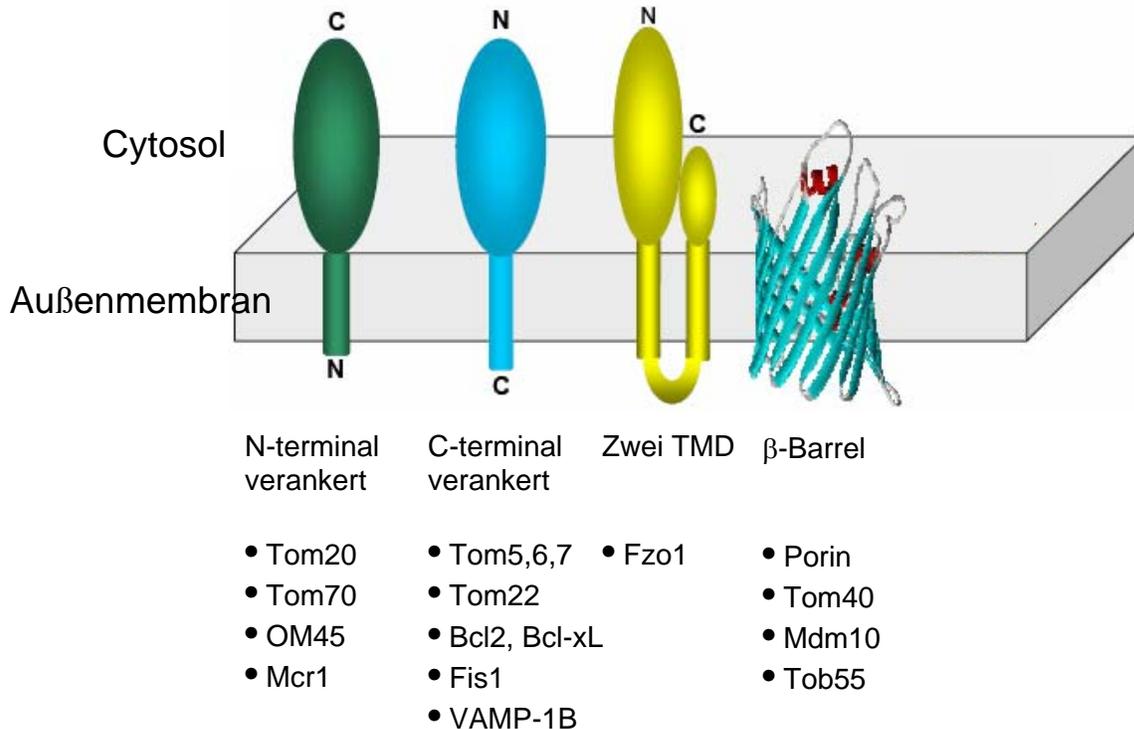


Abb.2. Topologien mitochondrialer Außenmembranproteine

In der mitochondrialen Außenmembran ist eine Vielzahl an Proteinen beherbergt, die an vielen Prozessen beteiligt sind. Unter den Proteinen befinden sich Porine, Proteine der Proteintranslokation, Enzyme der Lipid-Biosynthese und anderer Prozesse und Proteine, die an der Ausbildung der Mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. In höheren Organismen gibt es zusätzlich Proteine, die an der Apoptose und der Immunantwort beteiligt sind. Anhand ihrer Topologie können diese Proteine in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Abb. 2). Eine Proteinklasse, zu der Tom20, Tom70, OM45 und die Außenmembranform von Mcr1 gehören, besitzt am N-Terminus eine Transmembrandomäne. Der Großteil des Proteins ist cytosolisch lokalisiert. Sie werden auch Signal-Anker-Proteine genannt.

Proteine, die eine Transmembrandomäne am C-Terminus besitzen und bei denen der Großteil des Proteins in das Cytosol ragt, werden als Proteine mit C-terminalem Anker (CTA-Proteine) bezeichnet. Zu dieser Proteinklasse zählen beispielsweise Fis1, Tom5 und Bcl-2.

Das Protein Fzo1, welches ein Teil der Fusionsmaschinerie ist, besitzt zwei Transmembrandomänen, mit denen es die Außenmembran durchspannt. Der Großteil des Proteins ist cytosolisch lokalisiert und eine kleine Schleife befindet sich im Intermembranraum. Außerdem gibt es Proteine, die mindestens drei Transmembrandomänen besitzen, wie Ugo1, das auch ein Teil der Fusionsmaschinerie ist.

Eine weitere Proteinklasse sind β -Barrelproteine, die über mehrere antiparrallele β -Stränge, die β -Barrelstruktur, in die Außenmembran inseriert sind. Sie bestehen aus acht bis 22 β -Strängen aus acht bis elf Aminosäuren, die ausreichen, um eine Membran zu durchspannen (Paschen 2004, Rapaport, 2003).

1.3.2. Signalsequenzen mitochondrialer Außenmembranproteine

In β -Barrel Proteinen, wie Porin und Tom40 liegen interne Importsignale vor, die über mehrere Regionen im gesamten Protein verteilt sind. Die Deletion des N-, bzw. des C-Terminus in *N. crassa* führt zu keiner Veränderung der Lokalisation des Proteins (Rapaport und Neupert, 1999). Die richtige Lokalisation wird bei β -Barrelproteinen wahrscheinlich durch strukturelle Erkennungselemente sichergestellt (Rapaport, 2003).

Signal-Anker Proteine tragen diesen Namen, da die Transmembrandomäne und ihre flankierenden Sequenzen sowohl als Signalsequenz als auch als Membrananker funktionieren. Aus dieser Proteinklasse wurden die Signalsequenzen von Tom20 und Tom70 aus *S.cerevisiae* detailliert untersucht. Die Signalsequenz besteht aus den Aminosäuren 10 bis 29, die die Transmembrandomäne enthalten, und den Aminosäuren 1 bis 9, die ein hydrophiles, positiv geladenes Segment bilden (Shore et al., 1995; Waizenegger et al., 2003). Die positiv geladene N-terminale Region kooperiert mit der Transmembrandomäne, um die Gesamtinsertionsrate des Proteins zu erhöhen (McBride et al., 1992). Die Analyse der Signal-Anker-Sequenz von Säuger-Tom20 zeigte, dass für die Lokalisation an Mitochondrien eine moderate Hydrophobizität der Transmembrandomäne, die wichtigste Eigenschaft für mitochondriale Lokalisation, und eine positive Nettoladung innerhalb von fünf Aminosäuren in der C-terminal flankierenden Region benötigt werden (Kanaji et al., 2000). Außerdem ist es möglich, die Transmembrandomänen von Signal-Anker Proteinen auszutauschen. Dies lässt den Schluss zu, dass sie für die Funktion des jeweiligen Proteins nur eine untergeordnete Rolle spielen, aber für die Lokalisation eine entscheidende Rolle, obwohl keine Sequenzhomologie besteht (Waizenegger et al., 2003).

CTA-Proteine besitzen, wie Signal-Anker-Proteine, keine Sequenzhomologie in ihrer für die Lokalisation wichtigen Region am C-Terminus des Proteins. Sie werden in 1.3.4. näher beschrieben.

1.3.3. Biogenese von β -Barrel Membranproteinen

In eukaryotischen Zellen findet man β -Barrel-Proteine nur in den Außenmembranen von Chloroplasten und Mitochondrien (Gabriel et al., 2001; Rapaport, 2003; Schleiff et al., 2003) und in Prokaryoten nur in der Außenmembran von gram-negativen Bakterien (Tamm et al., 2001; Wimley, 2003).

Mitochondriale β -Barrel Proteine werden zunächst von den Rezeptoren Tom20 und Tom70 erkannt und über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transferiert (Krimmer et al., 2001; Model et al., 2001; Rapaport, 2002; Rapaport und Neupert, 1999; Schleiff et al., 1999). Dort interagieren sie mit den kleinen Tim-Komponenten (Hoppins und Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004b) und gelangen zum TOB-Komplex. Die Hauptkomponente des TOB-Komplexes (auch SAM-Komplex) ist das essenzielle Tob55 (SAM50) (Gentle et al., 2004; Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003). Tob55 besteht aus einer β -Barrel-Domäne im C-Terminus und einer N-terminalen Domäne mit POTRA-Wiederholungen (Polypeptidtransport assoziierte Domäne), die zur Erkennung der β -Barrel Vorstufenproteine dient (Habib et al., 2007). Die zweite essenzielle Komponente des TOB-Komplexes ist Tob38 (Sam35, Tom38) (Ishikawa et al., 2004; Milenkovic et al., 2004). Das Protein ist peripher mit der Außenseite der Außenmembran assoziiert. Das Fehlen von Tob38 hat bei der Insertion von β -Barrel Proteinen einen vergleichbaren Effekt wie das Fehlen von Tob55 (Ishikawa et al., 2004; Waizenegger et al., 2004; Milenkovic et al., 2004). Obwohl keine große Sequenzähnlichkeit besteht, hat es eine ähnliche Aufgabe wie Metaxin-2 in Säugern, in denen es an der Biogenese von β -Barrel Proteinen beteiligt ist (Kozjak-Pavlovic et al., 2007; Milenkovic et al., 2004; Waizenegger et al., 2004). Die dritte Komponente ist das nicht essenzielle Mas37 (Sam37, Tom37) (Gratzer et al., 1995). Mas37 Δ -Stämme besitzen einen verminderten Import von β -Barrel Proteinen und Wachstumsdefekte bei erhöhten Temperaturen. Ähnlich wie Tob38 ist Mas37 peripher mit der cytosolischen Seite der Außenmembran assoziiert (Gratzer et al., 1995; Wiedemann et al., 2003). Es besitzt Sequenzhomologie zu Metaxin-1 in Säugern (Armstrong et al., 1997) und ist wichtig für die Biogenese von β -Barrel Proteinen (Kozjak-Pavlovic et al., 2007).

1.3.4. Biogenese von Proteinen mit C-terminalem Anker (CTA-Proteine)

Ähnlich wie Signal-Anker Proteine besitzen CTA-Proteine eine einzige Transmembrandomäne, die sich am C-Terminus befindet, während der N-terminale Teil des Proteins im Cytosol lokalisiert ist (Borgese et al., 2007; Wattenberg und Lithgow, 2001). Wie bei Signal-Anker Proteinen ist das Transmembransegment leicht hydrophob und seine Umgebung positiv geladen. Für die mitochondriale Lokalisation werden mehrere positive Aminosäurereste benötigt, die die Transmembrandomäne flankieren (Abb. 3). Dies wird deutlich beim Vergleich der beiden zur Bcl-2-Familie gehörenden Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L. Bcl-x_L erfüllt diese Voraussetzungen und ist somit ausschließlich an den Mitochondrien lokalisiert. Bcl-2 besitzt in der flankierenden Region um die Transmembrandomäne nur eine basische Aminosäure auf jeder Seite. Dies führt dazu, dass das Protein in vielen Membranen der Zelle zu finden ist (Kaufmann et al., 2003). Einige CTA-Proteine, wie Cytochrom *b5* und VAMP1 sind sowohl an Mitochondrien als auch am Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert. Dies kommt dadurch zustande, dass es zwei Isoformen dieser Proteine in der Zelle gibt, die sich durch die Länge der Transmembrandomäne und in der Ladung in den flankierenden Regionen unterscheiden. Für die mitochondriale Lokalisation ist neben der Ladung auch eine relativ kurze Transmembrandomäne erforderlich (Borgese et al., 2003; Isenmann et al., 1998). Innerhalb der Transmembrandomäne können einzelne Aminosäuren ebenfalls eine wichtige Rolle für die Lokalisation spielen. In der Transmembrandomäne von Tom5, Tom6, Tom7 und Tom22 existiert ein konserviertes Prolin, das im Falle von Tom7 wichtig für eine effiziente Insertion in die Außenmembran ist (Allen et al., 2002).

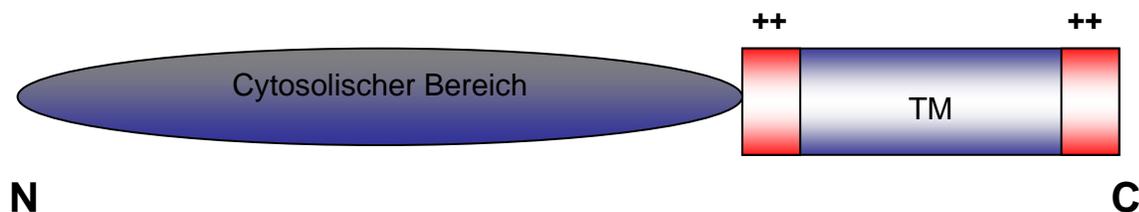


Abb. 3. Aufbau eines mitochondrialen Proteins mit C-terminalem Anker

CTA-Proteine übernehmen in der Zelle eine Vielzahl an Funktionen und können in allen Membranen der Zelle gefunden werden. Alle CTA-Proteine werden im Cytosol synthetisiert und

gelangen posttranslational über einen weitestgehend unbekanntem Mechanismus zu ihrer Zielmembran.

In der mitochondrialen Außenmembran befinden sich verschiedene Vertreter dieser Proteinklasse (siehe Abb. 2). Dazu gehören Fis1, ein Protein, das an der Teilung von Mitochondrien beteiligt ist (Mozdy et al., 2000), die drei kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes, Tom5, Tom6 und Tom7 (Allen et al., 2002; Beilharz et al., 2003), Apoptoseregulatoren der Bcl-2-Familie (Cory und Adams, 2002), die mitochondriale Form von Cytochrom *b5* (D'Arrigo et al., 1993), das Synaptojanin bindende Protein OMP25 (Nemoto und de Camilli, 1999), eine *Splice*-Variante des Vesikelassoziierten Membranproteins, VAMP-1B (Isenmann et al., 1998) und die GTPase Gem1, die an der Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt ist (Wolff et al., 1999; Fransson et al., 2003). Kürzlich konnte ein weiteres Mitglied dieser Gruppe identifiziert werden und wurde MAVS (mitochondriales antivirales Signaling) genannt. Dabei handelt es sich um das erste mitochondriale Protein, das direkt am angeborenen Immunsystem beteiligt ist (Seth et al., 2005). Für einige dieser Proteine konnte gezeigt werden, dass ihre CTA-Domäne für eine mitochondriale Lokalisation ausreicht (Allen et al., 2002; Beilharz et al., 2003; Dembowski et al., 2001; Egan et al., 1999; Nguyen et al., 1993). Wie bereits in 1.3.2. beschrieben, liegt die Information für ihre Lokalisation nicht als konservierte Sequenz in ihrer C-Terminalen Region, sondern als strukturelle Eigenschaften in dieser Region vor. Diese Informationen bestehen aus einem relativ kurzen Transmembransegment mit moderater Hydrophobizität, welches von positiven Ladungen flankiert wird. Diese Eigenschaften können von Protein zu Protein variieren (Borgese et al., 2007; Rapaport, 2003).

Während die strukturellen Eigenschaften, die es den CTA-Proteinen ermöglichen, in die mitochondriale Außenmembran integriert zu werden, weitestgehend bekannt sind, sind die Mechanismen, wie diese Proteine an der mitochondrialen Oberfläche erkannt und in die Membran integriert werden, noch wenig charakterisiert. Der Frage, ob CTA-Proteine für die Insertion in die mitochondriale Außenmembran Rezeptoren, externe Energie oder Chaperone benötigen, wurde in verschiedenen Studien teilweise mit widersprüchlichen Ergebnissen nachgegangen. Für die Lokalisation von VAMP-1B sind Oberflächenrezeptoren nötig (Lan et al., 2000). Der Import von humanem Bcl-2 in Hefemitochondrien scheint ebenfalls rezeptorabhängig zu sein (Motz et al., 2002). Eine neuere Studie kam jedoch zu dem Schluss, dass die Lokalisation von CTA-Proteinen in der mitochondrialen Außenmembran in Säugerzellen unabhängig von den proteasesensitiven Rezeptoren des TOM-Komplexes ist (Setoguchi et al., 2006).

Im ER ist die Situation ähnlich widersprüchlich. Einige Proteine scheinen unabhängig von ER-Proteinen zu inserieren (Brambillasca et al., 2006), andere jedoch scheinen für eine korrekte Insertion das SRP (Signalerkennungspartikel) und das Translocon des ER zu benötigen (Abell et al., 2003; Abell et al., 2004). Allerdings konnten hier schon einige Beobachtungen gemacht werden, die die Integration und den Transport von CTA-Proteinen in die ER-Membran betreffen. Mit Hilfe von Cytochrom *b5* wurde gezeigt, dass zumindest ein Teil der CTA-Proteine keine Komponenten des cotranslationalen Translokationsapparates benötigen und dass die Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran eine reduzierte Membraninsertion bewirkt (Brambillasca et al., 2005). Im Cytosol konnte das Protein TRC40/Asna-1 identifiziert werden, welches an neu synthetisierte CTA-Proteine bindet und sie zur ER-Membran bringt. Das Fehlen von funktionellem TRC/Asna-1 hatte zur Folge, dass die Membraninsertion vieler CTA-Proteine, vor allem derer mit stärker hydrophober Transmembrandomäne, stark reduziert war (Stefanovic und Hedge, 2007).

Eine mögliche Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist das Fehlen einer spezifischen *in vitro* Methode, die in der Lage ist, zu unterscheiden, ob Vorstufenproteine spezifisch in die Membran inseriert sind oder unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit der Membran (Borgese et al., 2003).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Insertionsmechanismus von CTA-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran anhand des Modellproteins Fis1. Zum einen musste eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, eine spezifische Insertion des Modellproteins in der mitochondrialen Außenmembran festzustellen. Anschließend sollte mit dieser Methode untersucht werden, welche Faktoren in der mitochondrialen Außenmembran für eine spezifische Insertion von CTA-Proteinen benötigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden weitgehend, wie in *Sambrook et al.* beschrieben, durchgeführt (Sambrook et al. 1989).

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

2.1.1.1. DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Die Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* wurde nach Birnboim *et al.* durchgeführt (Birnboim et al., 1979). Bakterien aus einer 2 ml Über-Nacht-Kultur in LB^{Amp} (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) wurden für 30 s in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl E1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/l RNaseA) resuspendiert und die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 300 µl E2-Puffer (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) 5 min bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 300 µl E3-Puffer (3,1 M KOAc, 2,5 M HAc) neutralisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (16100xg, 10 min, RT) wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Die ausgefällte DNA wurde abzentrifugiert (16100xg, 10 min, RT), mit 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (16100xg, 10 min, RT), 10 min bei RT getrocknet und schließlich in 30 µl H₂O resuspendiert.

2.1.1.2. DNA-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)

Große Mengen Plasmid-DNA (bis zu 0,5 mg) wurden mit Hilfe des Pure YieldTM Plasmid Midi-Prep Kits (Stratagene) isoliert. Bakterien aus einer 50 ml Über-Nacht-Kultur in LB^{Amp} wurden zentrifugiert (5000xg, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 3 ml *Cell Resuspension Solution* resuspendiert und anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 3 ml *Cell Lysis Solution* 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 4 ml *Neutralization Solution* neutralisiert. Nach einer Zentrifugation (15000xg, 10 min, RT) wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, auf mitgelieferte Silica-Säulen gegeben und durch Washen mit 5 ml *Endotoxin Removal Wash* und 20 ml *Column Wash Solution* gereinigt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (2000xg, 5 min, RT) mit 70°C heißem Wasser eluiert.

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

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNA-Fragmente exponentiell in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) amplifiziert. Dabei wurde der DNA Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 5 min zunächst denaturiert. Dann wurden dreißig Zyklen durchlaufen, die aus Denaturieren (1 min 95°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 5°C unter T_m) sowie DNA-Synthese (1 min pro Kilobase (kb) bei 72°C) bestanden. Die DNA-Synthese wurde durch eine 10 minütige Inkubation bei 72°C vervollständigt. Die Anlagerungstemperatur T_m der Primer wurde nach der „4+2“-Regel abgeschätzt ($T_m = 2^\circ\text{C pro A/T} + 4^\circ\text{C pro G/C}$). Es wurde der *GLtaq*-Kit der Firma GL BioTech verwendet. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt 7,5 U *GLtaq* DNA-Polymerase, 1,5 U *Pfu* DNA-Polymerase, 200 µM der Desoxynucleosid-5'-triphosphate sowie 100 pmol der Primer in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Als Matrize wurden 100 ng Plasmid-DNA verwendet. Amplifizierte DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.4.1.) gereinigt.

2.1.3. Modifikation von DNA durch Enzyme

2.1.3.1. Restriktionsverdau von DNA

Die durchgeführten Restriktionsverdaue dienten unterschiedlichen Zwecken. Zum einen wurden die durch Mini-Präparation isolierten Plasmide mit Hilfe einer Restriktionslängen-Analyse überprüft. Andererseits wurden DNA-Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden, geschnitten, um sie anschließend in Vektoren zu ligieren (siehe 2.1.3.3). Die Restriktionsverdaue wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) durchgeführt, wobei 3 U Enzym pro µg DNA eingesetzt wurden. Die Verdaue wurden bei der für die Enzyme optimalen Temperatur in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern für 1-2 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

2.1.3.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (SAP, New England Biolabs) wurden die Phosphatreste an den 3' Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne DNA-Fragment zu verhindern. Von der DNA wurden 10 µg in 50 µl SAP-Puffer mit 1 U Enzym für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation für 20 min bei 65°C gestoppt.

2.1.3.3. Ligation

Linearisierte Vektor-DNA (50-200 ng) und ein fünffacher molarer Überschuss der DNA-Fragmente wurden in einer 15 µl-Reaktion bestehend aus Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% (w/v) PEG 8000, pH 8,5) und 1 U T4-Ligase gemischt und über Nacht bei 14°C oder für 2 h bei RT inkubiert und 1 µl dieses Ansatzes wurde für die Transformation in *E. coli* Zellen benutzt.

2.1.4. Reinigung und Analyse von DNA

2.1.4.1. Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch nach ihrer Größe in horizontalen Agarosegelen (0,8-3% (w/v)) getrennt. Die Proben wurden mit 10x Auftragspuffer (60% (v/v) Glycerol, 0,5% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) Xylencyanol) gemischt und auf die Gele geladen. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) bei einer von der Gelgröße abhängigen Spannung von 50-160 V durchgeführt. Den Agarosegelen wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenmarker wurden die 1 kb bzw. die 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter von New England Biolabs verwendet.

2.1.4.2. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Kits* (Stratagene) isoliert. Dazu wurde das Gelfragment gewogen und mit 10 µl *Membrane Binding Solution* pro 10 mg Gelstück versetzt und für 10 min bei 65°C geschüttelt, bis die Agarose geschmolzen war. Die Lösung wurde auf die mitgelieferten Silica-Säulen gegeben, 1 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (16100xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene DNA wurde mit 700 µl *Membrane Wash Solution* gewaschen und zentrifugiert (16100xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde wieder verworfen und die DNA wurde mit 500 µl *Membrane Wash Solution* gewaschen und erneut zentrifugiert (16100xg, 5 min, RT). Anschließend wurde die Säule ohne Flüssigkeit erneut zentrifugiert (16100xg, 1 min, RT). Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50 µl Wasser durch Zentrifugation (2000xg, 5 min, RT) von der Säule eluiert.

2.1.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA, bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide.

2.1.5. Einführung von Punktmutationen

Zur Einführung von Punktmutationen in eine DNA-Sequenz wurde der *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene verwendet. Zunächst wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die die gewünschte Mutation enthielten und von nicht modifizierten Nukleotidsequenzen flankiert wurden. Anschließend wurde das Plasmid mit dem gewünschten Gen, in welches die Punktmutation eingeführt werden sollte, amplifiziert. Hierfür wurden 5 µl 10-fach Reaktionspuffer, 20 ng doppelsträngige DNAMatrize, 125 ng Oligonukleotid I, 125 ng Oligonukleotid II, 1 µl dNTP-Mix und 1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Dann wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 30 s zunächst denaturiert bevor 16 Zyklen, welche aus Denaturieren (30 s bei 95°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 55°C) und DNA-Synthese (2 min/kb Plasmidlänge bei 68°C) durchlaufen wurden, bestanden. Danach wurde die methylierte, nichtmutierte, Ausgangs-DNA-Matrize durch Zugabe von 1 µl *Dpn I* (10U/µl) und Inkubation bei 37°C für 1 h verdaut. Die zirkuläre, doppelsträngige DNA wurde anschließend in XL1-Blue „*Superkompetente Zellen*“ (Stratagene) transformiert. Dazu wurde ein 50 µl Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach für 45 s auf 42°C erhitzt und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 0,5 ml LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf eine LB^{Amp}-Kulturplatte (LB mit 2% (w/v) Agar und 100 mg/l Ampicillin) ausgestrichen. Die Kulturplatte wurde bei 37°C üN inkubiert.

2.1.6. Präparation und Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

2.1.6.1 Präparation kompetenter Zellen

Eine kleine Kultur, 10 ml LB_{Amp} wurde mit einer Kolonie eines *E. coli* Stammes (MH-1 oder XL-1 Blue) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 ml flüssiges LB_{Amp} Medium mit der Übernachtskultur angeimpft und so lange unter Schütteln kultiviert, bis sie die logarithmische Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~ 0,5)

erreichten. Anschließend wurden sie für 30 min auf Eis inkubiert, durch Zentrifugation (4400 xg, 5 min, 4°C) geerntet und nacheinander mit 500 ml, 250 ml und 50 ml 10% (v/v) Glycerol gewaschen. Die kompetenten Zellen wurden schließlich in 500 µl 10% (v/v) Glycerol resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.6.2. Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Elektroporation der elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurde der „Gene Pulser“ (BioRad) verwendet. Die elektrokompetenten *E. coli* Zellen (40 µl) wurden mit 1 µl des Ligationsansatzes für 30 s auf Eis inkubiert und anschließend in eine eiskalte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt. Die DNA wurde durch einen Strompuls (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms) in die Zellen transformiert. Die Zellsuspension wurde anschließend sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und 850 µl des Überstandes verworfen. Danach wurden sie im Restvolumen resuspendiert und auf einer LB^{Amp} Platte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.7. Verwendete Plasmide

Tab.1. Plasmide

Plasmid	Referenz
pGEM4	Promega
pGEM4-Porin	(Mayer et al., 1993)
pGEM4-Fis1	Diese Arbeit
pGEM4-Fis1 CS	Habib, 2006 Doktorarbeit
pGEM4-Fis1S147C	Habib, 2006 Doktorarbeit
pGEM4-Fis1-TMC	Diese Arbeit
pGEM4-Fis1-TMCQ4	Diese Arbeit
pGEM4-Tom5	Habib, 2006 Doktorarbeit
pGEM4-Tom6	Habib, 2006 Doktorarbeit
pGEM4-Tom7	Habib, 2006 Doktorarbeit
pGEM4-Tom70(1-38)Tom20	(Waizenegger et al., 2003)
pGEM4-pSu9(1-69)DHFR	(Pfanner et al., 1987)
pGEM4-F1β	(Kassenbrock et al., 1993)
pYX132-Fis1-TMC	Diese Arbeit

pYX132-Fis1-TMCQ4	Diese Arbeit
pYX132-EGFP-Fis1-TMC (129-155)	Diese Arbeit
pHS12-DsRed	(Bevis und Glick, 2002)

2.1.8. Klonierungsstrategien

pGEM4-Fis1-TMCQ4

Die DNA-Sequenz von Fis-TMC wurde durch PCR, in welcher Arg151, Lys153, Arg154 und Arg155 durch Glutaminreste ersetzt wurden, amplifiziert. Dafür wurden folgende Primer verwendet.

Name des Primers	Schnittstellen	Primersequenz
5'EcoRI Fis1	EcoRI	5'-AAA GAA TTC ATG ACC AAA GTA GAT TTT TGG-3'
3' HindIII Fis1-TMCQ4	HindIII	5'-TTT AAG CTT TCA CTG TTG CTG GTT TTG TAA GAA GAA ACA AGC CAC G-3'

pYX132-EGFP-Fis1-TMC (129-155)

Die ersten Schritte der Klonierung wurden zunächst im Vektor pGEM4 durchgeführt. In die DNA-Sequenz von Fis1 wurde zunächst eine SacI-Schnittstelle mit Hilfe des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits* inseriert und anschließend wurde eine mit PCR amplifizierte EGFP-Sequenz vor die Reste 129-155 mit Hilfe des Restriktionsenzym SacI gesetzt. Das nun erhaltene Fusionsprotein wurde dann mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII in pYX132 kloniert.

Name des Primers	Schnittstellen	Primersequenz
5'Fis1 TM SacI	SacI	5'-GAG GAT AAG ATC CAG AAG GAA GAG CTC AAG GGT GTT GTC GTC G-3'
3'Fis1 TM SacI	SacI	5'-CGA CGA CAA CAC CCT TGA GCT CTT CCT TCT GGA TCT TAT CCT C-3'
5'SacI EcoRI EGFP	SacI, EcoRI	5'-AAA GAG CTC GAA TTC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'
3' SacI EGFP	SacI	5'-AAA GAGCTC TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TG-3'

2.2. Methoden der Hefegenetik

2.2.1. Verwendete Hefestämme

Tab. 2. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
D273-10B	<i>Wildtyp</i>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
YTJB4	<i>MATa ura3 leu2 his4 lys2</i>	(Haucke et al., 1995)
YTJB64	YTJB4, <i>tom20::LEU2</i>	(Lithgow et al., 1994)
BY4743	<i>MATa/α his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3</i>	(Brachmann et al., 1998)
<i>Δtom6</i>	BY4743, <i>tom6::kanMX4</i>	Huntsville, AL (USA)
YPH499	<i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1trp1-Δ63 ura3-52 lys2-801</i>	(Sikorski et al., 1989)
<i>Δmas37</i>	YPH499, <i>mas37::HIS3</i>	(Habib et al., 2005)
<i>Δtom5</i>	YPH501, <i>tom5::HIS3</i>	(Dietmeier et al., 1997)
<i>Δtom7</i>	YPH499, <i>tom7::HIS3</i>	(Dietmeier et al., 1997)
<i>Δmim1</i>	YPH499, <i>mim1::HIS3</i>	(Waizenegger et al., 2005)
ADM551	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200</i>	(Mozdy et al., 2000)
ADM552	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200</i>	(Mozdy et al., 2000)
KKY3	<i>MATa his3- Δ200 leu2-3,112 ade2-101 suc2- Δ9 trp1- Δ901 ura3-52 tom40::HIS3 (pRS316-TOM40)</i>	(Kassenbrock et al., 1993)
KKY3.2	KKY3 (<i>pRS314-tom40-2</i>)	(Kassenbrock et al., 1993)
KKY3.3	KKY3 (<i>pRS314-tom40-3</i>)	(Kassenbrock et al., 1993)
KKY3.4	KKY3 (<i>pRS314-tom40-4</i>)	(Kassenbrock et al., 1993)

2.2.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden auf YPD oder Lactatmedium bei 30°C und temperatursensitive Mutanten wurden bei 24°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben bei 140 Upm in Schüttlern inkubiert. Zum Animpfen wurden Zellen direkt aus einem Glycerol-Stock (15%(v/v)), welcher bei -80°C gelagert wurde, oder eine Hefekolonie von einer Agarplatte verwendet. Zur Selektion von Hefestämmen mit bestimmten Markergenen wurde SD-, SGal- oder SLac-Medium, welches Markersubstanzen entsprechend den gewünschten

Selektionsbedingungen enthielt, verwendet. Atmungsdefiziente Hefestämme, die nicht in der Lage waren, auf Laktatmedium zu wachsen, wurden in YPGal oder YPD kultiviert. Die Selektion gegen das Wildtyp (WT)-*URA3*-Allel erfolgte auf 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) Medium (SD-Medium mit 0,1% (w/v) 5-Fluor-Orotsäure und 50 mg/l Uracil) (Boeke et al., 1987).

Für die Präparation von Mitochondrien wurden entsprechende Hefestämme etwa drei Tage in steigenden Volumina kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die OD_{600} einen Wert von 1,2 nicht überschritt. Zur Depletion essenzieller Proteine wurde der Hefestamm, der das essenzielle Gen unter der Kontrolle des *GAL10* Promotors enthielt, zunächst etwa 2 Tage in Galaktosehaltigem Medium angezogen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit sterilem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Glukose-haltigem Medium resuspendiert und für eine definierte Zeit kultiviert.

Laktat-Medium: 3 g Hefeextrakt, 1 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl ,
0,5 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,5 g NaCl, 1,1 g $MgSO_4 \times 6 H_2O$,
0,3 ml 1% $FeCl_3$, 22 ml 90% Milchsäure, H_2O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit
10 M KOH einstellen; in der Regel mit 0,1% Glukose oder 0,1%
Galaktose supplementiert

YP-Medium: 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H_2O dest. ad 900 ml,
nach dem Autoklavieren: + 100 ml 20% Galaktose (YPGal) oder + 100
ml 20% Glukose (YPD) oder + 100 ml 30% Glycerol (YPG)

S-Medium: 1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäurereste und
Ammoniumsulfat, 5 g Ammoniumsulfat, H_2O dest. ad 900 ml,
nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% Galaktose (SGal)
oder 100 ml 20% Glukose (SD) oder 100 ml 30% Glycerol (SG). Von
den Stammlösungen der Markersubstanzen wurden unter
Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophiemarker 2 ml
Tryptophan und Histidin, bzw. 3 ml Leucin und Lysin (Stammlösungen
10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (Stammlösung 2 g/l)
pro Liter Medium zugesetzt.

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

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

Hefestämme wurden in Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 kultiviert. Danach wurde folgende Verdünnungsreihe in H₂O angesetzt: 1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 OD₆₀₀. Pro Verdünnung wurden 5 µl auf die gewünschten Agarplatten aufgetragen. Diese wurden bei der zu untersuchenden Temperatur 2-7 Tage inkubiert.

2.2.4. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Hefestämme wurden mit Lithiumacetat nach dem Protokoll von Gietz transformiert (Gietz et al., 1992). Hefezellen wurden über Nacht in 50 ml YPD oder SD-Medium mit entsprechenden Markersubstanzen bei 30°C kultiviert. Am nächsten morgen wurden die Zellen in 50 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,15 verdünnt und erneut geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation geerntet (3000xg, 5 min, RT), mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und entsprechend der Transformationsanzahl in 50 µl Portionen auf mehrere Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde mit 240 µl 50% (w/v) PEG 3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl beschallter, denaturierter Lachs-Spermien-DNA (10 mg/ml) und 50 µl DNA (0,1-10 µg Plasmid-DNA oder 25 µl PCR-Produkt+25 µl ddH₂O) in dieser Reihenfolge versetzt und stark gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 30°C inkubiert und 20-25 min bei 42°C ein Hitzeschock verabreicht. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (4500xg, 15 s, RT) pelletiert, in 800 µl YPD-Medium resuspendiert und 2-3 h bei 30°C inkubiert. Nach erneutem Ernten wurde das Pellet in 150 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert.

2.2.5. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Hefe-DNA wurde nach dem Protokoll von Rose (Rose et al., 1990) präpariert. Hefezellen aus einer stationären 50 ml YPD-Kultur wurden für 5 min bei 3000xg bei RT geerntet, in 1 ml Zymolyase-Lösung (100 µg/ml Zymolyase, 1 M Sorbitol, 100 mM EDTA) resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer A (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 7,5) für 30 min bei 65°C inkubiert und 400 µl 5 M Kaliumacetat zugesetzt. Die Probe wurde 1 h auf Eis inkubiert und die Zellbruchstücke wurden dann durch Zentrifugation (20000xg, 15 min, 4°C) abgetrennt. Aus

dem Überstand wurde die DNA durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Die *in vitro* Synthese wurde mit dem Vektor pGEM4 (Promega) durchgeführt, in welchen das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des SP6 Promotors kloniert wurde. Die Translation wurde in Gegenwart von [³⁵S]Methionin durchgeführt.

In vitro Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde in modifizierter Form nach Melton durchgeführt (Melton et al., 1984). Ein Transkriptionsansatz (100 µl) enthielt 20 µl 5x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM Spermidin, pH 7,5), 10 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 4 µl RNasin (40 U/µl), 20 µl NTPs (jeweils 10 mM), 5,2 µl m⁷G(5')ppp(5')G, 3 µl SP6 RNA-Polymerase, 27 µl H₂O und 10 µl Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10 µl 10 M LiCl und 300 µl Ethanol versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde pelletiert (36700xg, 20 min, 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (36700xg, 20 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde 10 min bei RT getrocknet, in 100 µl H₂O mit 1 µl Rnasin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

In vitro Translation

Die *in vitro*-Translation wurde nach Pelham durchgeführt (Pelham et al., 1976). Ein Translationsmix (148,5 µl) enthielt 100 µl Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega), 40 U Rnasin, 3,5 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 1 mM), 12 µl [³⁵S]Methionin (10 mCi/ml), 7 µl 15 mM Magnesiumacetat und 25 µl RNA. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert und der Einbau radioaktiven Methionins wurde durch Zugabe von 12 µl 58 mM nicht radioaktiv markierten Methionins gestoppt. Ribosomen und andere aggregierten Proteine wurden nach Zugabe von 24 µl 1,5 M Saccharose durch Zentrifugation (125000xg, 30 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TNT gekoppelte Transkription/Translation

In diesem System können Transkription und Translation gekoppelt ablaufen. Ein TNT Ansatz (50 µl) enthielt 25 µl TNT Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega), 2 µl TNT Reaktionspuffer, 1 µl TNT SP6 RNA-Polymerase, 1 µl Aminosäuremix, 2 µl [³⁵S]Methionin (10 mCi/ml), 1 µl RNasin (40 U/µl) und 2 µl DNA (0,5 µg/µl). Der Ansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden Ribosomen und aggregierte Proteine durch Zentrifugation (125000xg, 30 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

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

Die Proben wurden in Laemmli-Puffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol) gelöst und für 3 min auf 95°C erhitzt. Große Gele liefen konstant bei 30 mA für ca. 2 h, kleine Gele liefen bei 25 mA für ca. 45 min. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie gefärbt (siehe 2.3.4) oder auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (siehe 2.3.5). Um den Transfer zu überprüfen und die Markerproteine sichtbar zu machen, wurden Nitrozellulose-Membranen reversibel mit einer Ponceau S Lösung (2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)) angefärbt.

2.3.3. High Tris-Harnstoff SDS-PAGE

High Tris-Harnstoff SDS-PAGE wurde zur Analyse kleiner Proteine unter 15 Kilodalton (kDa) und zur Unterscheidung von Fis1 (17 kDa), welches entweder unmarkiert oder mit IASD (siehe Abkürzungen) markiert war (17,6 kDa), zu unterscheiden. Die Elektrophorese wurde je nach Zweck bei 25 mA für 2 h 40 min bis 4 h 45 min durchgeführt.

Trenngel: 20% (w/v) Acrylamid, 0,25% (w/v) Bisacrylamid,
6 M Harnstoff, 0,1% (w/v) SDS,
0,75 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,05% (w/v) APS,
0,25% (v/v) TEMED

Sammelgel: 5% (w/v) Acrylamid, 0,07% (w/v) Bisacrylamid,
6 M Harnstoff, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8,
0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS,
0,25% (v/v) TEMED

Elektrophoresepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM Glycin,
0,1% (w/v) SDS

2.3.4. Coomassie-Färbung von Gelen

Das Boden- und das Sammelgel wurden nach beendeter SDS-PAGE entfernt und das Trenngel wurde zur Färbung der Proteine für 30 min in einem Färbegrad mit 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) H₂O) inkubiert. Anschließend wurde das Gel im Entfärbegrad (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 60% (v/v) H₂O) so lange entfärbt, bis auf klarem Hintergrund die blauen Proteinbanden sichtbar waren.

2.3.5. Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Kyshe-Anderson, 1984; Towbin et al., 1979). Nitrozellulose-Membranen wurden vor dem elektrophoretischen Transfer in Blotpuffer (20 mM Tris (pH nicht eingestellt), 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS) gegeben. Die Membran wurde zuerst auf zwei vorher mit Blotpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere, welche auf der Graphitelektrode (Anode) platziert worden waren, gelegt. Darauf wurden das Trenngel und zwei weitere mit Blotpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere gelegt, bevor die zweite Graphitelektrode (Kathode) darauf platziert wurde. Der Transfer wurde mit $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h durchgeführt. Dies entsprach bei den hier benutzten Gelen mit einer Größe von ca. $15 \times 9 \text{ cm}$ einer Stromstärke von 200 mA.

2.3.6. Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach elektrophoretischer Trennung mittels SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Hilfe von Röntgenfilmen (BioMax MR, Kodak) sichtbar gemacht, indem der Film auf die Blotmembran aufgelegt wurde und nach entsprechender Inkubationsdauer entwickelt wurde (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert). Alternativ wurden auf die Membranen mit radioaktiv markierten Proteinen Phosphorimaging-Platten gelegt und nach der gewünschten Expositionszeit die Intensität der Banden durch Verwendung eines Phosphorimagers (Fuji Bas3000, Aida Image Analyzer 3.4.3 software) quantifiziert.

2.3.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

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

2.3.8. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Aus wässrigen Lösungen wurden Proteine durch Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 12% (w/v) ausgefällt. Die denaturierten Proteine wurden nach 10 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation ($36700 \times g$, 20 min, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde dann in -20°C kaltem Aceton gewaschen, 5 min bei RT getrocknet und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

2.3.9. Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Zur Fällung wässriger Proteinlösungen wurden diese bei 4°C mit 2 Volumina gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (36700xg, 10 min, 4°C), die Überstände verworfen und die Pellets im gewünschten Puffer resuspendiert. Für die Herstellung der gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurden 76,7 g Ammoniumsulfat in 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt, damit sich Ammoniumsulfatkristalle bilden konnten.

2.3.10. Herstellung von Lipidvesikeln aus Phospholipiden

Zur Herstellung von Lipidvesikeln wurden Phospholipide (Avanti Polar Lipids) und Ergosterol (Fluka) im gewünschten Verhältnis gemischt. Um die Vesikel besser detektieren zu können, enthielten die Mischungen als Mengenkontrolle 2 mol% Fluorescein-Phosphatidylethanolamin (Sigma). Die organischen Lösungsmittel wurden für 3 h im Dunkeln unter Stickstoffatmosphäre und einem Luftdruck von 95 mbar in einem Rotationsverdampfer (CVC2000, Vacuubrand) entfernt. Anschließend wurden die Lipide in Liposomenpuffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 100 mM NaCl) in einer Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert. Die Suspension wurde zehn Mal durch eine Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 400 nm (Avestin) in einem Extruder (Avestin) gedrückt, um fertige Lipidvesikel zu erhalten.

Die Verteilung der fluoreszierenden Lipidvesikel wurde mit Hilfe von Fluorescein, welches an Phosphatidylethanolamin gebunden war, mit einem Fluorimeter (Fluorolog, Horiba Jobin Yvon) bestimmt. Dazu wurde eine Suspension von Lipidvesikeln durch Licht der Wellenlänge $\lambda = 480$ nm angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda = 521$ nm gemessen. Die Daten wurden dann mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.4. Methoden der Zellbiologie

2.4.1. Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

Hefezellen wurden zur Gewinnung von Gesamtzellprotein alkalisch aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen (1 OD₆₀₀ geerntet, in 400 µl H₂O resuspendiert und mit 75 µl einer Mischung aus 1,85 M NaOH, 9,2% (v/v) Ethanol und 7,7% (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei RT geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 600 µl 50% (w/v) TCA gefällt und in 40 µl Laemmli-Puffer gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.2. Isolierung von Rohmitochondrien aus *S. cerevisiae*

Hefezellen (10 OD) wurden durch Zentrifugation (3000xg, 5 min, RT) geerntet, mit 25 ml H₂O gewaschen, in SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2) mit 1 mM PMSF resuspendiert und mit 300 mg Glaskügelchen (Durchmesser 0,3mm) versetzt. Die Proben wurden jeweils viermal für 30 s gevortext und nach jedem Vortexschritt für 30 s auf Eis gekühlt. Durch einen Zentrifugationsschritt (1000xg, 3 min, 4°C) wurden Zellbruchstücke sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10000xg, 10 min, 4°C). Das Pellet, welches die Mitochondrien enthielt, wurde in 30 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, 10 min bei RT geschüttelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.3. Isolierung von Mitochondrien

2.4.3.1. Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte im Wesentlichen nach Daum (Daum et al., 1982). Hefezellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,5 kultiviert, durch Zentrifugation (4400xg, 5 min, RT) sedimentiert und mit H₂O gewaschen. Danach wurde das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und diese wurden in einer Konzentration von 0,5 g/ml in DTT-Puffer (100 mM Tris-H₂SO₄, 10 mM DTT, pH 9,4) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann unter Schütteln für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend wurden die Zellen reisoliert. Die Zellen wurden mit 200 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen und zum enzymatischen Aufschluss der Zellwände in einer Konzentration von 0,15 g/ml in Zymolyase-Puffer (3 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht, 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde unter Schütteln für 30-60 min bei 30°C inkubiert und die Sphäroblastenbildung wurde durch osmotische Lyse verfolgt. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 2 ml H₂O oder 2 ml 1,2 M Sorbitol gemischt. Wenn die OD₆₀₀ des Wassergemisches 10-20% der OD₆₀₀ des Sorbitolgemisches betrug, war die Sphäroblastenbildung beendet.

Die folgenden Schritte wurden auf Eis, bzw. bei 4°C unter Verwendung gekühlter Geräte durchgeführt. Die gewonnenen Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (3000xg, 5 min, 4°C) reisoliert und in Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) in einer Konzentration von 0,15 g/ml resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator durch zehn Stöße geöffnet. Durch zweimaliges Zentrifugieren (2000xg, 5 min, 4°C) wurden Zelltrümmer und ungeöffnete Zellen abgetrennt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (17400xg, 12 min, 4°C)

sedimentiert, in 10 ml SEM-Puffer aufgenommen, erneut von ganzen Zellen und Zelltrümmern gereinigt (2000xg, 5 min, 4°C) und reisoliert (17400xg, 12 min, 4°C). Abschließend wurden die Mitochondrien in einem kleinen Volumen SEM-Puffer aufgenommen, eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt und in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.3.2. Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Die Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* erfolgte nach Sebald (Sebald et al., 1979). Zur Isolierung wurden Hyphen einer Über-Nacht Kultur (50 ml bis 8 l) durch Absaugen in einer Nutsche isoliert, gewogen und in einen Mörser überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis mit gekühlten Puffern und Geräten. Die Zellen wurden mit Quarzsand und SEM-Puffer (je 1 ml pro 1 g Hyphen) versetzt und durch Reiben mit einem Pistill aufgebrochen. Danach wurde zweimal dieselbe Menge SEM-Puffer mit 5 mM PMSF zugegeben und jeweils für 1 min gemischt. Durch zwei Zentrifugationen wurde zunächst der Sand abgetrennt (je 2000xg; 10 min; 4°C). Durch Zentrifugation (30000xg; 12 min; 4°C) wurden die Mitochondrien aus dem Überstand isoliert, in SEM-Puffer aufgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.4.4. Subfraktionierung von Hefezellen

Die Subfraktionierung von Hefezellen wurde mit leichten Modifikationen wie von Meisinger beschrieben (Meisinger et al., 2000) durchgeführt. Es wurde wie unter 2.4.3.1. vorgegangen, jedoch enthielt der Homogenisationspuffer nur 0,2% (w/v) BSA. Nach der Sedimentation der Mitochondrien wurde der Überstand zur Gewinnung von Microsomen und Cytosol verwendet. Hierzu wurde der Überstand zentrifugiert (100000xg, 1 h, 4°C). Das Pellet enthielt die Microsomen, die in SEM-Puffer resuspendiert wurden. Im Überstand befanden sich die cytosolischen Faktoren. Beide Fraktionen wurden in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Mitochondrienfraktion wurde über einen Saccharose-Gradienten weiter gereinigt. Der Gradient wurde aus den Stufen 15, 23, 32 und 60% (w/v) Saccharose in 10 mM MOPS-KOH, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,2 gebildet. Die Mitochondrien wurden in einer Konzentration von 5 mg/ml in SEM-Puffer auf den Gradienten geladen und zentrifugiert (134000xg, 1h, 2°C). Die gereinigten Mitochondrien befanden sich in einer Bande zwischen 32 und 60% Saccharose. Sie wurden mit zwei Volumina SEM-Puffer verdünnt und sedimentiert (17400xg, 12 min, 2°C). Anschließend wurden die Mitochondrien in einem

kleinen Volumen SEM-Puffer aufgenommen, eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt und in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.5. *In vitro* Proteinimport in Mitochondrien und Lipidvesikel

Zu importierende Vorstufenproteine wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S] Methionin synthetisiert. Die Importreaktionen wurden entweder in F5-Puffer (0,03-3% (w/v) BSA, 250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 100 µg/ml Kreatinkinase, 5 mM Kreatinphosphat, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2) oder SI-Puffer (0,03-3% (w/v) BSA, 0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM MgOAc, 2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM MnCl₂, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 100 µg/ml Kreatinkinase, 5 mM Kreatinphosphat, 50 mM HEPES-KOH, pH 7,2) durchgeführt. Die Vorstufenproteine wurden bei verschiedenen Temperaturen für unterschiedliche Zeitpunkte importiert. In einigen Fällen wurden vor oder nach der Importreaktion Proteasen verwendet. Zur Entfernung cytosolischer Domänen von Importrezeptoren vor dem Import wurden Mitochondrien für 15 min mit 100 µg/ml Trypsin auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe eines dreißigfachen Massenüberschusses an Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI) gestoppt und der darauf folgende Import wurde standardmäßig durchgeführt. Die Proteasebehandlung von Mitochondrien oder Lipidvesikeln unter isotonischen Bedingungen nach dem Import diente dem Abbau nicht importierter Vorstufenproteinen, welche nach der Importreaktion an der Außenmembran hafteten oder nur partiell importiert worden waren. Nach dem Import wurden als Proteasen entweder Proteinase K (PK) oder Trypsin in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet und die Behandlung wurde für 15 min auf Eis durchgeführt. Durch Zugabe von 1 mM PMSF im Falle von PK oder STI im Falle von Trypsin und anschließender Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Proteaseverdaue gestoppt.

Zur Blockierung des TOM-Kanals während einer Importreaktion wurden 11 µg des Proteins pSu9(1-69)-DHFR zu 50 µg Mitochondrien zugegeben. Dieses Protein ist ein Fusionsprotein, welches aus der mitochondrialen Matrix-Signalsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase aus *N. Crassa* und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus besteht. Nach der Importreaktion wurden Mitochondrien (13200xg, 10 min, 4°C) und Lipidvesikel (186000xg, 1 h, 4°C) sedimentiert und in Laemmli-Puffer lysiert. Importierte und gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.4.6. *In vitro* Proteinimport in Mitochondrien, Microsomen und Lipidvesikel mit anschließender IASD-Markierung

Die Importreaktion wurde wie unter 2.4.5. beschrieben, durchgeführt, aber es wurde nach Beendigung der Reaktion keine Proteasebehandlung vorgenommen. Mitochondrien (13200xg, 10 min, 4°C), Microsomen und Lipidvesikel (186000xg, 1 h, 4°C) wurden sedimentiert und in Labeling Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM EDTA, 4M Harnstoff, 1 mM DTT) resuspendiert und für 5-20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DTT in einer Endkonzentration von 250 mM gestoppt. Anschließend wurden Mitochondrien (13200xg, 10 min, 4°C), Microsomen und Lipidvesikel (18600xg, 1 h, 4°C) sedimentiert, mit 600 µl SH-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM EDTA) resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in Laemli-Puffer lysiert und die Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf High-Tris Harnstoffgelen analysiert.

Mitochondrien, Microsomen und Lipidvesikel, wurden teilweise vor der Markierung mit IASD in Labeling Puffer mit 1% Triton-X-100 solubilisiert und nach Zugabe von IASD wie nicht solubilisierte Mitochondrien markiert. Nach Beendigung der Markierungsreaktion wurden die Proteine mit TCA gefällt, in Laemli-Puffer lysiert und mittels SDS-PAGE auf High-Tris Harnstoffgelen analysiert.

2.4.7. Erzeugung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen

Mitochondrien in SI-Puffer wurden in einem Verhältnis von 1:10 in 20 mM HEPES-KOH, pH 7,2 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten wurden sedimentiert (13200xg, 10 min, 4°C) und mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Immunodekoration (siehe 2.5.1.) von löslichen Intermembranraumproteinen wurde die Effizienz der Mitoplastenbildung überprüft.

2.4.8. Carbonatextraktion

Durch Carbonatextraktion ist es möglich, lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen zu trennen (Fujiki et al., 1982). Sedimentierte Mitochondrien wurden in einem Puffer aus 10 mM HEPES-KOH und 100 mM Na₂CO₃, pH 11,5 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die integralen Membranproteine wurden anschließend zentrifugiert (125000xg, 30 min, 4°C) und in Laemmli-Puffer resuspendiert. Der Überstand mit den löslichen und peripher assoziierten Proteinen wurde mit TCA gefällt und in Laemmli-Puffer gelöst.

Durch Kombination von alkalischer Extraktion und anschließender Flotations-Gradientenzentrifugation ist es möglich, die herkömmliche Carbonatextraktion zu verbessern. Hierbei sammeln sich integrale Membranproteine mit den Lipiden im oberen Bereich des Gradienten. Aggregierte Proteine und Proteine, die nicht in der Membran integriert waren, sind im unteren Bereich des Gradienten zu finden. Proben (100 µl) wurden mit 166 µl 2,4 M Saccharose, 0,1 M Na₂CO₃ und 100 µl SEM, 0,1 M Na₂CO₃ überschichtet und zentrifugiert (485000xg, 2h, 4°C). Dann wurden vom Gradienten von oben zunächst 250 µl und zweimal 150 µl abgenommen. Die Fraktionen wurden mit 20 mM HEPES-KOH, pH 7,4 auf 600 µl aufgefüllt, mit TCA gefällt und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

2.4.9. Mikroskopie

Um die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen und die Morphologie von Mitochondrien zu untersuchen, wurden zwei Methoden der Mikroskopie verwendet. Zum Einsatz kamen ein Fluoreszenzmikroskop und ein Konfokalmikroskop.

2.4.9.1 Fluoreszenzmikroskop

Hefezellen, die entweder ein GFP-Fusionsprotein oder an den Mitochondrien lokalisiertes RFP exprimierten, wurden bis zu einer Dichte OD₆₀₀ von 0,5 in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Bei Färbung der Mitochondrien mit *Mitotracker* (Stratagene) wurden Hefezellen ebenfalls bis zu einer Dichte OD₆₀₀ von 0,5 in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert, sedimentiert (3000xg, 5 min, RT) und in neuem Selektionsmedium mit 1 mM *Mitotracker* für 30 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen wieder sedimentiert (3000xg, 5 min, RT), in Wasser gewaschen und in wenig Wasser resuspendiert. Für die mikroskopische Analyse wurden 100 µl Zellsuspension durch Zugabe von 0,5% (w/v) Low Melting Point Agarose auf einem Objektträger fixiert. Die Aufnahmen wurden an einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss GmbH, Jena) unter Verwendung einer 100 W Quecksilber-Lampe gemacht. Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz Nr. 09 verwendet (Anregung: 450-490 nm, Emission: > 515 nm), für RFP und *Mitotracker* Filtersatz Nr. 15 (Anregung: 534-558 nm, Emission > 590 nm) (Heim et al., 1996). Die Bilder wurden mit einer SPOT-gekühlten Digitalkamera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI) aufgenommen und mit der MetaMorph Imaging Software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) prozessiert.

2.4.9.2. Konfokalmikroskop

Hier wurden Serien optischer Sektionen von Hefezellen mit einem Confocal Laser Scanning Mikroskop (TCS SP1, Leica Microsystems) erstellt. Die Hefezellen wurden wie in 2.4.9.1. präpariert. RFP wurde mit einem Krypton-Laser bei 568 nm angeregt. Der Emissionsbereich lag zwischen 575 nm und 625 nm. Die einzelnen in Graustufen erhaltenen Bilder der Sektionen wurden mit Hilfe des Programms LCSLite (Leica Microsystems) übereinandergelagert und jeder Kanal des RGB-Bildes erhielt eine Falschfarbe.

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western Blot)

Auf Nitrozellulose transferierte Proteine wurden durch Immunodekoration mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 1 h in TBS (154 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Blockierlösung entfernt und der Primärantikörper für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C zugegeben. Der Primärantikörper wurde in Abhängigkeit von seinem Titer 1:50 bis 1:10000 in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Dann wurden die Membranen 10 min in TBS, 10 min in TBS mit 0,05% (v/v) Triton-X-100 und 10 min in TBS gewaschen. Um gebundene Erstantikörper nachzuweisen, wurden als Sekundärantikörper gegen Immunoglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper aus der Ziege verwendet, welche mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren. Diese wurden im Verhältnis 1:10000 in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membran wurde mit dieser Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Membranen auf dieselbe Weise wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen und die Peroxidase mit einem Detektionssystem nachgewiesen, das auf Chemilumineszenz basiert. Dazu wurden die Membranen mit der Lumineszenzlösung inkubiert und die Signale auf Röntgenfilm nachgewiesen. Durch Mischen gleicher Volumina von Lösung 1 und Lösung 2 wurde die Lumineszenzlösung hergestellt.

Lösung1: 3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5, 300 µl Luminol (440 mg/10 ml DMSO), 133 µl p-Kumarinsäure (150 mg/10 ml DMSO), H₂O ad 30 ml

Lösung2: 3 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5, 18 µl H₂O₂ (30%), H₂O ad 30 ml

Die Lösungen waren in einem lichtgeschützten Gefäß für etwa eine Woche stabil.

2.5.2. Coimmunfällung

Zunächst wurden für die Coimmunfällung Antikörper an Protein A-Sepharose CL-4B (PAS) gekoppelt. Hierzu wurden 30 µl PAS zweimal mit TBS und anschließend mit Lysepuffer B (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF, 1% (w/v) Digitonin, pH 8,0) gewaschen. Danach wurden 30 µl Antiserum mit der äquilibrierten PAS für mindestens 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Dann wurden die PAS dreimal Lysepuffer B gewaschen.

Mitochondrien wurden auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Lysepuffer B im Überkopfschüttler solubilisiert. Unlösliches Material wurde abgetrennt (36700xg, 20 min, 2°C) und der Überstand wurde zu den Antikörpern gegeben, welche an die PAS gebunden worden waren. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler wurde die PAS mit den gebundenen Immunkomplexen viermal mit Lysepuffer B mit 0,05% (w/v) Digitonin gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Immunkomplexe in Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol und mit 0,05% (v/v) H₂O₂ dissoziiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Die Transmembrandomäne von Proteinen mit C-terminalem Anker reicht für die Lokalisation in der Außenmembran aus

Frühere Versuche konnten zeigen, dass für die Lokalisation von Fis1 an der mitochondrialen Außenmembran die Transmembrandomäne benötigt wird (Mozdy et al., 2000). Um die Frage zu klären, ob die Transmembrandomäne von Proteinen mit C-terminalem Anker (CTA-Proteine) für eine Lokalisation von Fis1 an der mitochondrialen Außenmembran ausreichend ist, wurde ein Fusionsprotein aus GFP und den Aminosäuren 129-155 von Fis1 am C-terminalen Ende von GFP konstruiert (siehe Abb. 4). Dieses Konstrukt wurde in Hefe transformiert und exprimiert. Mit Hilfe von subzellulärer Fraktionierung und Western Blot konnte das Fusionsprotein, ebenso wie das Markerprotein Tom20, in der mitochondrialen Fraktion gefunden werden, während das ER-Protein Erv2 und der cytosolische Marker Bmh1 nicht in der mitochondrialen Fraktion zu sehen waren. Dieses Ergebnis stimmt mit Mozdy et al. überein und lässt den Schluss zu, dass die Transmembrandomäne von Fis1 für die korrekte Lokalisation an der mitochondrialen Außenmembran ausreicht.

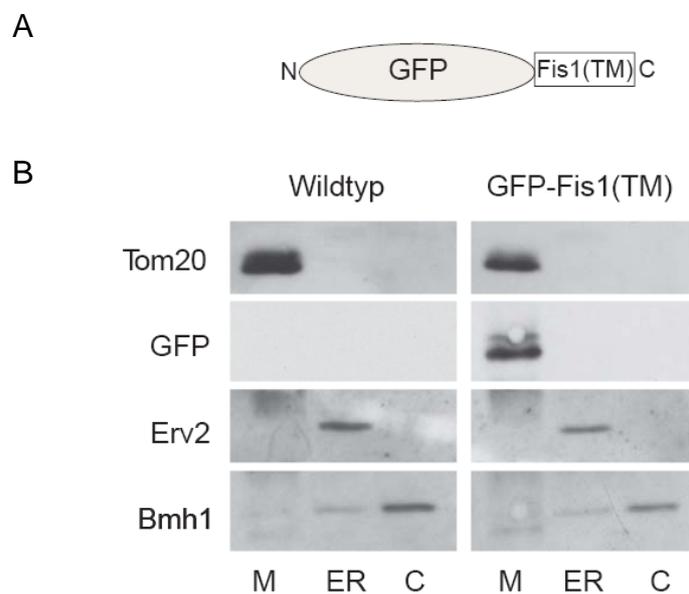


Abb. 4. Die Transmembrandomäne von Fis1 ist ausreichend für die Lokalisation an Mitochondrien. **A.** Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus GFP und der Transmembrandomäne von Fis1. **B.** Mitochondrien (M) wurden über einen Saccharosegradienten aus Wildtypzellen oder aus Hefezellen, die den Vektor pYX132 mit GFP-Fis1(TM) enthielten, aufgereinigt. Die postmitochondriale Fraktion wurde dann durch differenzielle Zentrifugation in die Fraktionen ER und Cytosol (C) weiter aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert. Es wurden Antikörper gegen GFP, den mitochondrialen Marker Tom20, den ER-Marker Erv2 und den cytosolischen Marker Bmh1 verwendet.

3.2. Entwicklung einer spezifischen Methode zur Analyse der Membraninsertion von Proteinen mit C-terminalem Anker

Um die Integration von CTA-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran zu untersuchen, ist eine Methode erforderlich, die erlaubt, zu unterscheiden, ob das Protein auch spezifisch in die Membran integriert wurde. In früheren Studien zur Insertion von CTA-Proteinen wurden bisher sehr gegensätzliche Ergebnisse beobachtet (siehe 1.3.4). Dieses Problem kann darauf beruhen, dass es bisher keine verlässliche Methode gab, um die Insertion zu kontrollieren. Die Klasse der CTA-Proteine besitzt nur wenige Aminosäurereste, die in den Intermembranraum hineinragen. Ein proteolytischer Verdau der Proteine durch von außen zugegebene Proteasen würde zu geschützten Proteinfragmenten mit einer Größe von nur 2-3 kDa führen, welche zu klein sind, um sie mittels SDS-PAGE zu sehen.

Um dieses Problem zu lösen, wurde eine Methode entwickelt, die auf der Modifikation von Cysteinresten in Fis1 beruht. Zur Cysteinmodifikation wurde das sulfhydrylreaktive Reagenz IASD (4-Acetamido-4'-[(iodoacetyl)amino]stilben-2,2'-disulfonsäure) verwendet, welches nicht in der Lage ist, durch Membranen zu gelangen (Struktur siehe Abb. 5).

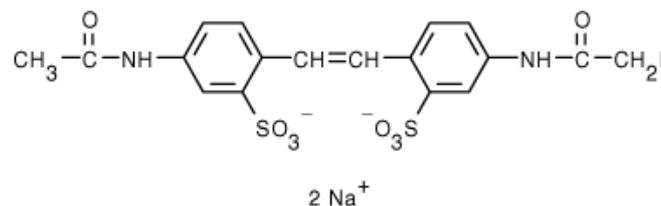


Abb. 5. Struktur von IASD

Diese Modifikation ermöglicht es, eine Insertion von Fis1 in die mitochondriale Außenmembran zu beobachten, weil Cysteine in der Transmembrandomäne nicht modifiziert werden können. Aufgrund des Molekulargewichtes von 624 Da kann man mit IASD markiertes Fis1 von nicht markiertem Fis1 durch ein verändertes Laufverhalten des Proteins bei SDS-PAGE unterscheiden. Somit können in die Membran integrierte Proteine von solchen, die mit der Membran nur assoziiert sind, unterschieden werden, da diese mit IASD modifiziert werden können. Mit dieser Methode wurden bereits die Topologien der Außenmembranproteine Bcl-2 und α -Hämolysin analysiert (Krishnasastry et al., 1994; Kim et al., 2004). Dieser Vorgang ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

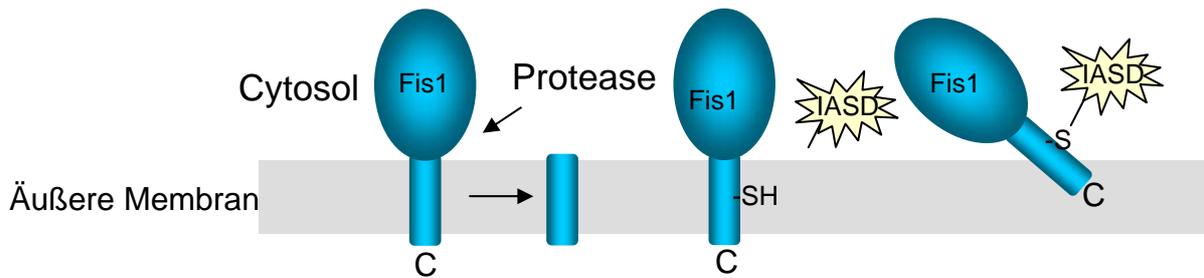


Abb. 6. Schematische Darstellung der Markierung von Fis1 mit IASD. Durch Zugabe von Proteasen würde ein geschütztes Fragment von 2-3 kDa entstehen, welches zu klein für die Analyse mittels SDS-PAGE ist. Ist Fis1 in die Membran integriert, kann IASD das Cystein in der Transmembrandomäne nicht binden.

Um diese Methode anwenden zu können, durfte Fis1 insgesamt nur ein Cystein enthalten, welches sich in der Transmembrandomäne befinden muss. Dafür mussten in der cytosolischen Domäne von Fis1 die beiden Cysteinreste (Cys79, Cys87) zu Serinresten mutiert werden. Dabei entstand ein Fis1 ohne Cysteinreste (Fis1-CS, siehe Abb. 6). Dies wurde auch mit einem Fis1 durchgeführt, welches bereits in der Transmembrandomäne an Position 147 einen Aminosäureaustausch von Serin gegen Cystein enthielt (Habib, 2003). Dieses Konstrukt wurde Fis1-TMC genannt (siehe Abb. 7).

```

Fis1:      M..C..C..TLKGVVVAGGVLGAVAVASFFLRNKRR
Fis1(CS): M..S..S..TLKGVVVAGGVLGAVAVASFFLRNKRR
Fis1(TMC): M..S..S..TLKGVVVAGGVLGAVAVACFFLRNKRR
Fis1(TMC-4Q):M..S..S..TLKGVVVAGGVLGAVAVACFFLQNQQQ

```

Abb. 7. Schematische Darstellung der verwendeten Fis1 Varianten.

Die Sequenzen der C-terminalen Domänen sind dargestellt. Aus der cytosolischen Domäne sind nur relevante Aminosäurereste dargestellt. Die Transmembrandomäne ist jeweils unterstrichen.

Um zu testen, ob die Fis1-Variante Fis1-TMC *in vivo* in die Außenmembran von Mitochondrien integriert werden kann und die Funktion von unverändertem Fis1 besitzt, wurde ein funktioneller Komplementationstest verwendet (Habib et al., 2003). Hierfür wurde ein Hefestamm mit einer Deletion von *FIS1* verwendet. Diese führt dazu, dass die Teilung der Mitochondrien nicht mehr möglich ist und somit zu einer veränderten Morphologie (Mozdy et al., 2000). Die Fähigkeit, diesen Morphologiephänotyp zu komplementieren, kann somit als Kriterium für korrekte Insertion und Funktion in der Außenmembran dienen. Fis1-TMC wurde mit einem Hefeexpressionsvektor in der Deletionsmutante exprimiert und diese wurde auf ihren Phänotyp untersucht. In Abbildung 8 ist dargestellt, dass Fis1-TMC in der Lage ist, den Deletionsphänotyp zu komplementieren und funktionell ist.

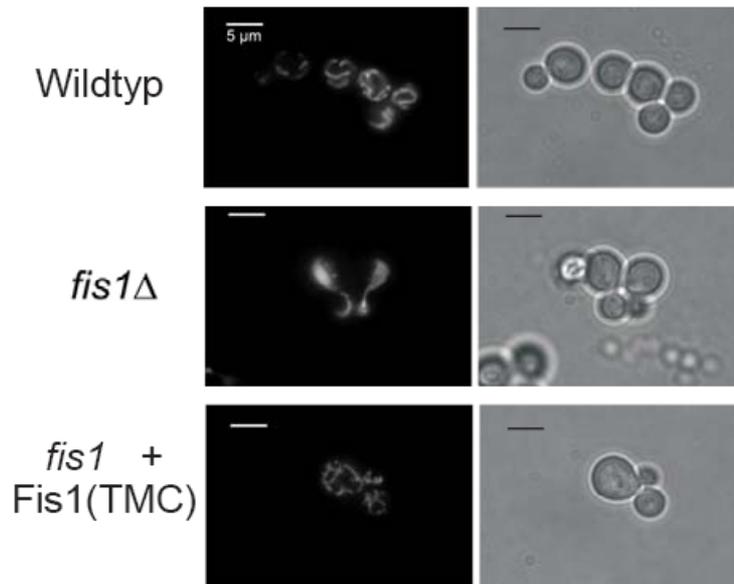


Abb. 8. Fis1-TMC kann die Morphologie des *fis1Δ* Phänotyps komplementieren. Zellen der angegebenen Stämme wurden mit in den Mitochondrien lokalisiertem RFP transformiert und mit Fluoreszenzmikroskopie (links) und Phasenkontrastmikroskopie (rechts) analysiert.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die Membraninsertion mit Hilfe der IASD-Markierung beobachtet werden kann. Dazu wurden Mitochondrien aus *fis1Δ* Zellen, die Fis1-TMC einem Plasmid exprimierten, isoliert und mit IASD behandelt. In Abbildung 9A ist zu sehen, dass der größte Teil der Fis1-Moleküle vor der Modifizierung durch IASD geschützt war. Nach Solubilisierung der Mitochondrien mit dem Detergenz Triton X-100 (Tx-100) wurde der Schutz durch die Membran aufgehoben und somit das gesamte Fis1 markiert. Danach wurden isolierte Mitochondrien mit radioaktiv markierten Vorstufenproteinen von Fis1 und Fis1-TMC inkubiert. Diese wurden mit alkalischer Lösung behandelt, um lösliche Proteine zu entfernen und anschließend mit IASD behandelt. Sowohl Fis1 als auch Fis1-TMC blieben in der Membranfraktion und radioaktiv markiertes Fis1-TMC verhielt sich wie endogenes Fis1-TMC (Abb. 9B), wobei der Großteil des Proteins unmodifiziert blieb, wenn kein Triton X-100 hinzugegeben wurde. Bei Wildtyp Fis1 konnte kein Unterschied festgestellt werden, wenn Triton X-100 zugegeben wurde, da hier beide Cysteine in der cytosolischen Domäne vorliegen und somit immer frei zugänglich waren (Abb. 9B). Um auszuschließen, dass das Cystein im Intermembranraum liegt und so bei beschädigter Außenmembran zugänglich für IASD sein könnte, wurden Mitochondrien mit radioaktiven Vorstufenproteinen inkubiert, danach die Außenmembran durch osmotischen Schock aufgebrochen und die Fis1-Proteine mit IASD markiert. Hier ist ebenfalls zu sehen, dass der

Großteil von Fis1-TMC vor der Modifikation mit IASD geschützt blieb, wenn kein Triton X-100 hinzugegeben wurde (siehe Abb.9C).

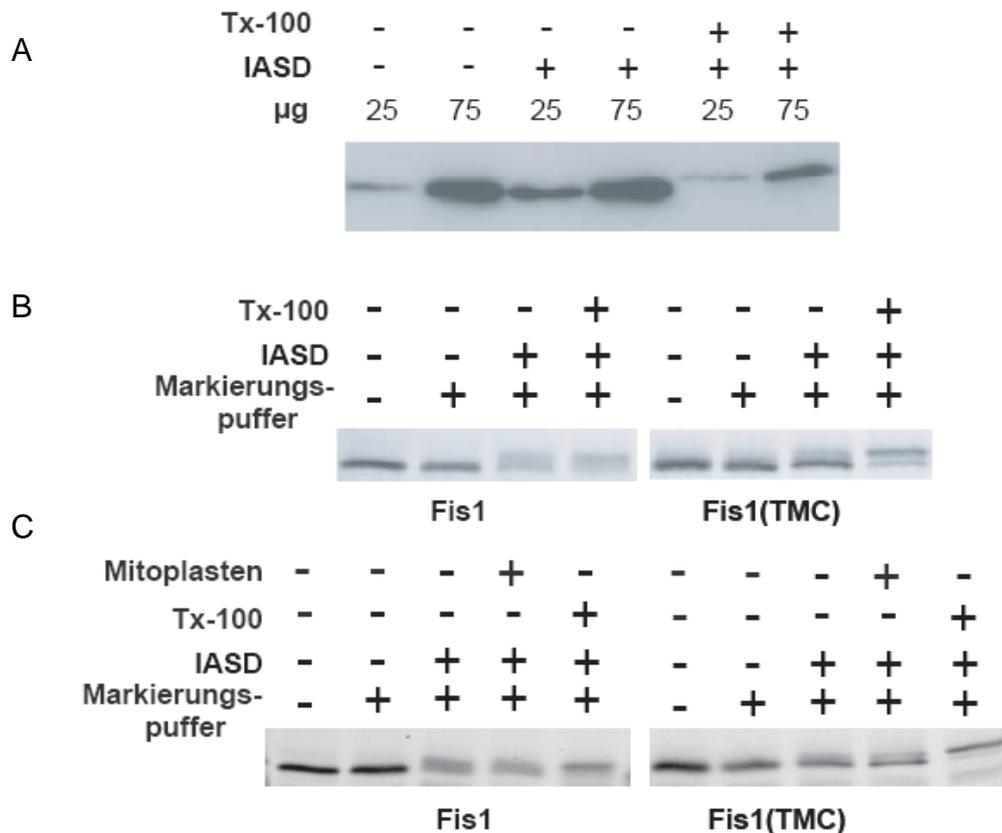


Abb. 9. Fis1-TMC ist vor der Modifikation durch IASD geschützt, wenn es in der Außenmembran integriert ist. **A.** Endogenes Fis1-TMC kann nicht von IASD modifiziert werden. Die angegebenen Mengen von Mitochondrien aus dem Hefestamm *fis1Δ*, der mit Fis1-TMC transformiert war, wurden mit IASD in An- bzw. Abwesenheit von Triton X-100 inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit Antikörper gegen Fis1 dekoriert. **B.** Radioaktiv markiertes Fis1-TMC kann nicht von IASD in Carbonat gefällten Membranen markiert werden. Wildtyp Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Fis1, bzw. Fis1-TMC für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen durch Carbonatextraktion isoliert und in Importpuffer oder Markierungspuffer resuspendiert und, wo angegeben, mit IASD und Triton X-100 behandelt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **C.** Radioaktiv markiertes Fis1-TMC kann nicht von IASD in Mitochondrien und Mitoplasten markiert werden. Wildtyp Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Fis1, bzw. Fis1-TMC für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien isoliert und, wo angegeben durch osmotischen Schock die Außenmembran geöffnet und in Importpuffer oder Markierungspuffer resuspendiert und, wo angegeben, mit IASD und Triton X-100 behandelt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Um sicher zu stellen, dass das Verhalten von markiertem Fis1-TMC darauf beruht, dass es in die Membran inseriert ist und nicht von aggregiertem Protein stammt, wurden nun verschiedene Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien, die mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC inkubiert worden waren, mit IASD modifiziert, und dann wurden die Mitochondrien mit Hilfe von Saccharosegradienten analysiert. Membranen und Proteine, die

in Membranen integriert sind, befinden sich im Gradienten im oberen Bereich. Aggregierte und lösliche Proteine befinden sich im unteren Bereich. Die von IASD nicht modifizierten Fis1-Moleküle konnten in denselben Fraktionen wie Tom20, das als Markerprotein für die Außenmembran diente, gefunden werden. Fis1-TMC, das mit Triton X-100 behandelt wurde, verhielt sich wie mitochondriales Hsp70, das als lösliches Markerprotein fungierte (Abb.10).

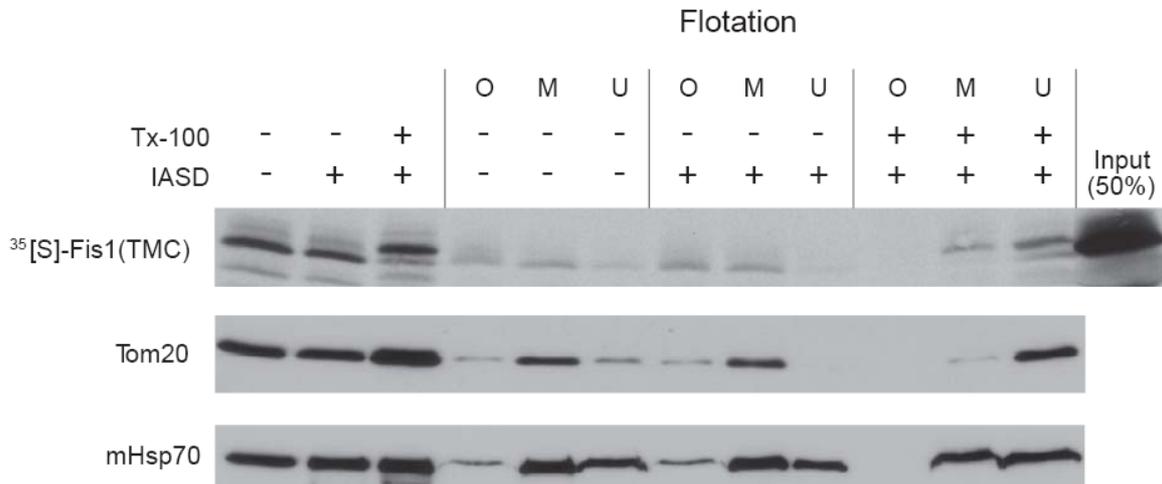


Abb. 10. Durch IASD unmodifiziertes Fis1-TMC aggregiert nicht.

Wildtyp-Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation reisoliert, in Markierungspuffer resuspendiert und, wo angegeben, mit IASD und Triton X-100 inkubiert. Anschließend wurden alle drei Proben in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde reisoliert und in Ladepuffer gelöst. Die andere Hälfte wurde in 0,1 M Na₂CO₃ resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben durch Flotationsgradientenzentrifugation analysiert. Membranen befinden sich am Ende der Zentrifugation oben. Lösliche und aggregierte Proteine unten. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern dekoriert. O, obere Fraktion; M, mittlere Fraktion; U, untere Fraktion

Als nächstes wurde radioaktiv markiertes Fis1-TMC als Kontrolle verwendet, bei dem die Arginine am C-Terminus durch Glutamine ersetzt worden waren (Fis1-TMC-4Q) (Abb.6). Diese Variante des Proteins kann aufgrund der fehlenden positiven Ladungen nicht in Mitochondrien inserieren und ist nicht funktionell (Habib et al., 2003). In Abbildung 11 ist zu sehen, dass der größte Teil von Fis1-TMC-4Q mit IASD modifiziert werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transmembrandomäne dieser Fis1 Variante nicht richtig in die Membran integriert werden konnte. Da beide Fis1 Varianten dieselbe Transmembrandomäne besitzen, zeigt dieses Experiment, dass ein Schutz vor der Modifizierung durch IASD auf der richtigen Integration in die Membran und nicht auf einer unspezifischen Interaktion der hydrophoben Transmembrandomänen beruht.

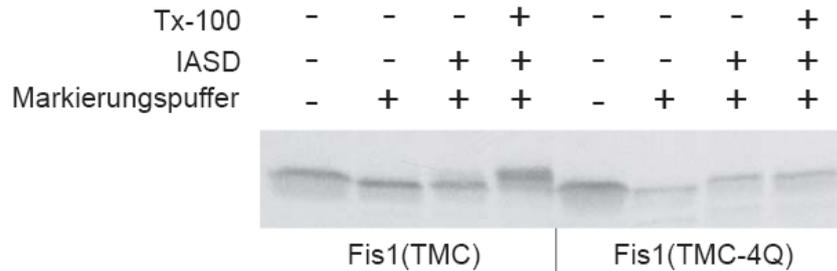


Abb. 11. Eine insertionsdefiziente Variante von Fis1 kann nicht vor der Markierung mit IASD geschützt werden. Wildtyp Mitochondrien wurden für 30 Minuten entweder mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC oder Fis1-TMC-4Q inkubiert und danach, wie in Abb. 9 beschrieben, behandelt.

Um sicherzustellen, dass die Modifikation von Fis1-TMC ausschließlich an seinem einzigen Cystein stattfindet, wurden radioaktiv markiertes Fis1-TMC und eine Fis1 Variante ohne Cysteine (Fis1-CS, siehe Abb. 7) mit IASD modifiziert. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass die Modifikation nur in Fis1-TMC auftritt und somit cysteinspezifisch ist.

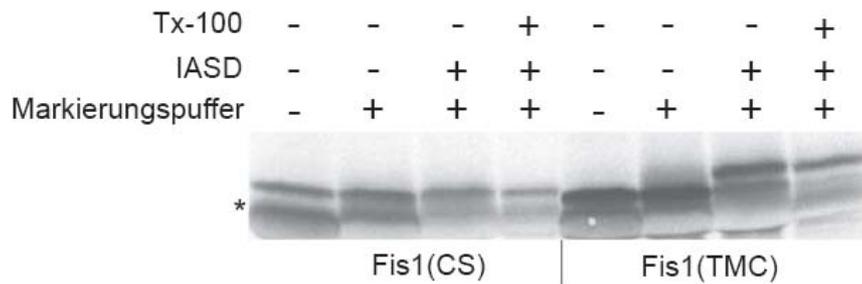


Abb. 12. Cysteinspezifische Modifikation von Fis1-TMC. Radioaktiv markierte Proteine von Fis1-CS und Fis1-TMC wurden in Markierungspuffer mit IASD und, wo angegeben, Triton X-100 für 20 Minuten bei 25°C inkubiert und danach, wie in Abb. 9 beschrieben, behandelt. Der Stern markiert eine Hämoglobinbande. Hämoglobin kommt in Retikulozytenlysate in großen Mengen vor.

3.3. Die Insertion von Fis1 ist unabhängig von den Importrezeptoren Tom20 und Tom70

Tom20 und Tom70 sind die beiden Hauptrezeptoren des TOM-Komplexes und für den Import der meisten mitochondrialen Proteine zuständig. Daher stellte sich die Frage, ob die beiden Rezeptoren für die Insertion von CTA-Proteinen benötigt werden. Dies sollte nun mit der in 3.2. neu entwickelten *in vitro* Methode untersucht werden. Zunächst wurden Mitochondrien vor der Inkubation mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC mit der Protease Trypsin behandelt. Dadurch wurden alle nach außen stehenden Bereiche der Oberflächenrezeptoren der Außenmembran proteolytisch verdaut. Die Integration von Fis1-TMC erfolgte sowohl in Mitochondrien ohne Trypsinbehandlung als auch in Mitochondrien

mit Trypsinbehandlung mit derselben Effizienz. Dies lässt den Schluss zu, dass die Entfernung der Oberflächenrezeptoren durch Trypsin keinen Einfluss auf das Insertionsverhalten von Fis1 besitzt. Die Membranintegration des β -Barrelproteins Porin, welches Importrezeptoren benötigt (Krimmer et al., 2001), war in Trypsin behandelten Mitochondrien stark reduziert (Abb. 13).

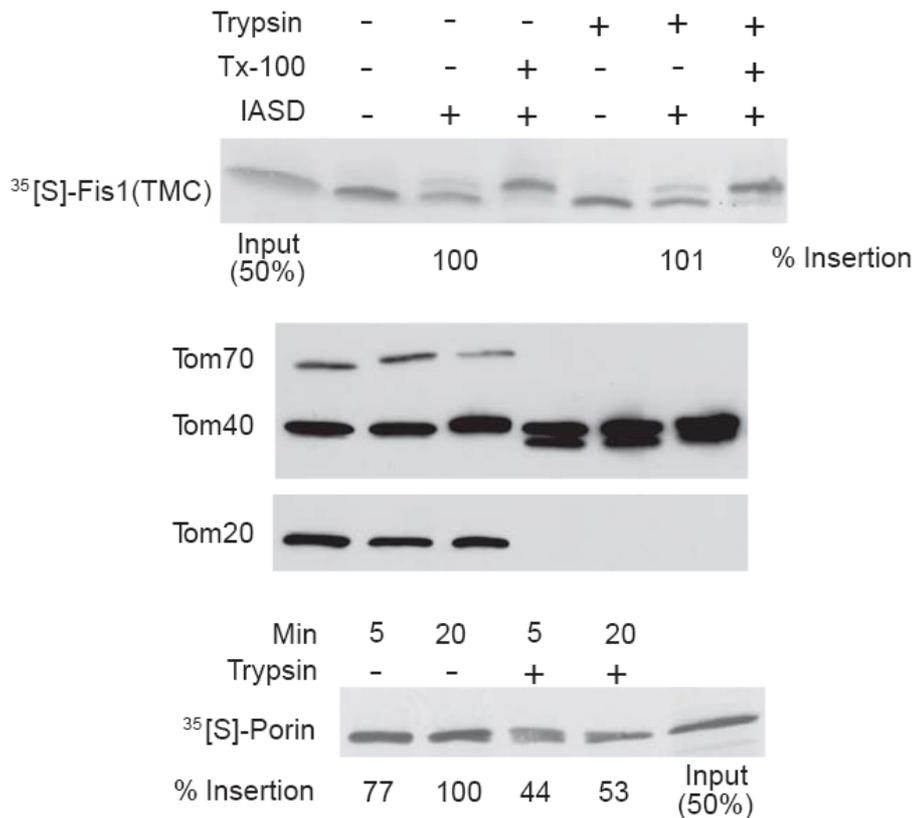


Abb. 13. Die Insertion von Fis1 ist unabhängig von Importrezeptoren. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit intakten und trypsinbehandelten Mitochondrien inkubiert und anschließend mit IASD behandelt. Die mitochondrialen Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine Membran geblottet und mittels Autoradiographie und Immunodekoration analysiert. Die benutzten Antikörper waren gegen die Rezeptoren Tom20 und Tom70, sowie gegen das in der Membran liegende Tom40, bei dem durch die Trypsinbehandlung ein kleines Fragment abgespalten wurde, gerichtet. Unten: Porin wurde für die angegebenen Zeitpunkte in Mitochondrien inkubiert und anschließend mit 100 μ g/ml Proteinase K inkubiert, um nicht inseriertes Protein zu entfernen. Die Insertion von Fis1 wurde aus der Bande berechnet, die vor der Modifikation durch IASD geschützt war. Um die Effizienz zu messen, wurde die vor IASD-Markierung geschützte Bande der nicht mit Trypsin behandelten Mitochondrien auf 100% gesetzt.

Im nächsten Schritt wurden Mitochondrien verwendet, die aus Stämmen mit einer Deletion von Tom20 oder Tom70 stammten. Diese wurden mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC inkubiert und anschließend wurde die Menge des inserierten Proteins analysiert. Wie nach der Trypsinbehandlung (Abb. 13) konnte hier weder bei *tom70* Δ - noch bei *tom20* Δ -Mitochondrien ein verändertes Insertionsverhalten von Fis1 festgestellt werden (Abb. 14A und B). Die Analyse der Importkinetik in diesen Mitochondrien für 1, 5 oder 20 Minuten

ergab, dass die Insertion von Fis1 ein sehr schneller Vorgang ist. Selbst bei einer Importtemperatur von 0°C konnte für keinen der drei Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied bei der Insertionskinetik festgestellt werden (Abb. 14C).

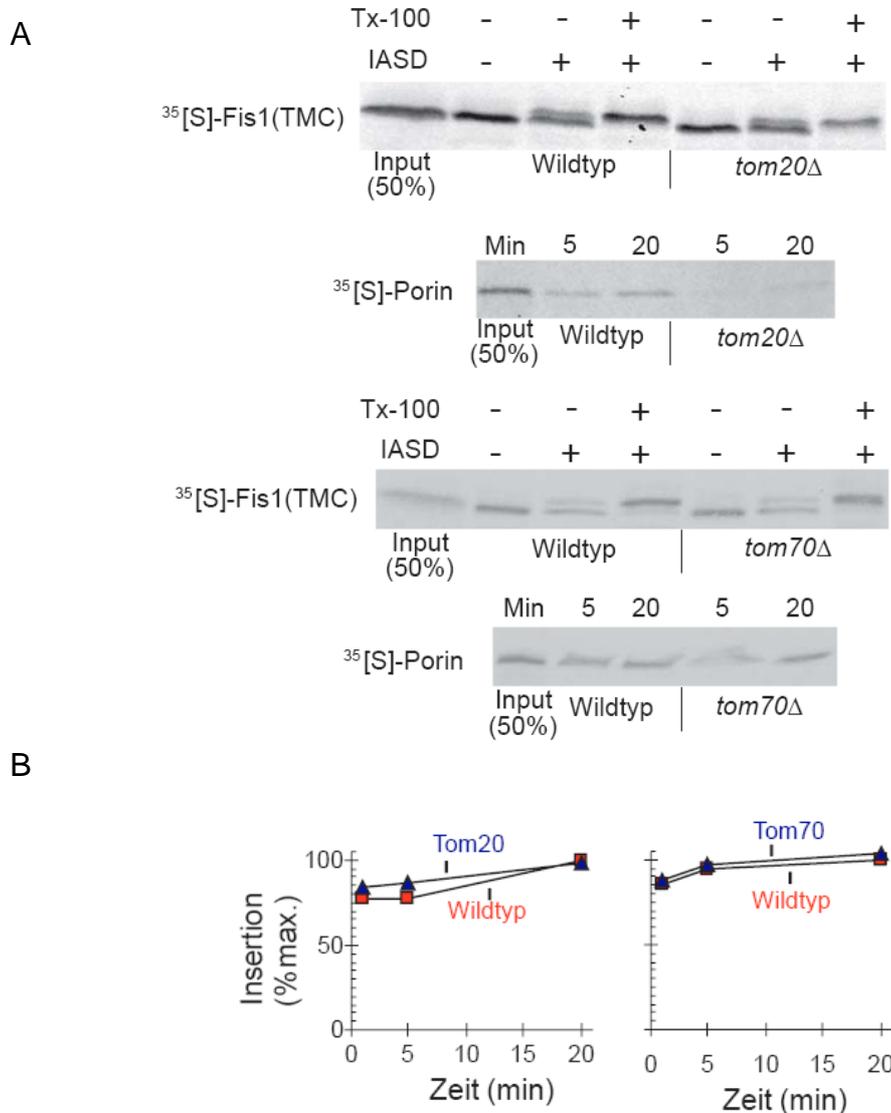


Abb. 14. Die Insertion von Fis1 ist unabhängig von den Rezeptoren Tom20 und Tom70.

A. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Wildtyp Mitochondrien oder Mitochondrien, denen entweder Tom20 oder Tom70 fehlte, inkubiert und wie in Abb. 8B und 8C beschrieben weiterbehandelt. **B.** Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde bei 0°C für die angegebenen Zeiten mit Wildtyp Mitochondrien oder Mitochondrien, denen entweder Tom20 oder Tom70 fehlte, inkubiert und wie in Abb. 9 beschrieben weiterbehandelt. Die Banden wurden quantifiziert und die Intensitäten der Banden, die dem unmodifizierten Protein entsprechen, wurden als Maß für die Proteininsertion verwendet. Die Proteinmenge, die nach 20 Minuten der ersten Inkubation in Mitochondrien aus dem Wildtypstamm inserierte, wurde auf 100% gesetzt.

Andere CTA-Proteine wie die kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes, Tom5, Tom6 und Tom7, wurden ebenfalls über einen Mechanismus in die Außenmembran integriert, der die TOM-Rezeptoren nicht benötigt (Abb. 15). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass

die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 bei der Insertion von CTA-Proteinen in die Außenmembran keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

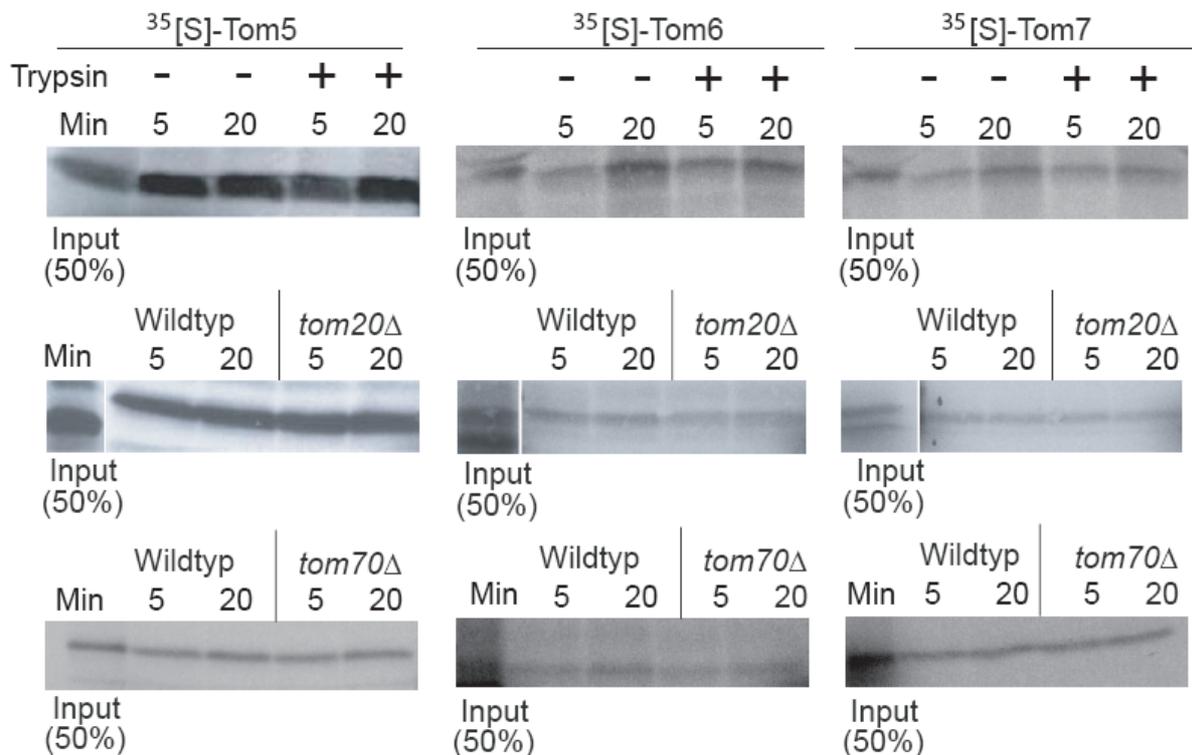


Abb. 15. Die Insertion von Tom5, Tom6 und Tom7 ist unabhängig von den Rezeptoren Tom20 und Tom70. Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden mit Mitochondrien, die vor dem Import mit Trypsin behandelt wurden (oben), mit *tom20Δ* Mitochondrien (Mitte) oder mit *tom70Δ* Mitochondrien inkubiert. Die Membranen wurden mittels Carbonatextraktion isoliert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

3.4. Die bekannten Importkomponenten der Außenmembran werden nicht für die Insertion von Fis1 benötigt

Vor ihrer Insertion in die Außenmembran werden β -Barrel Proteine durch die Importpore des TOM Komplexes transportiert (Paschen et al., 2005; Wiedemann et al., 2006). Es stellte sich nun die Frage, ob der Import von Fis1 in die Außenmembran auf eine ähnliche Weise abläuft und die Importpore, die vom TOM-Kernkomplex gebildet wird, benötigt wird. Dafür wurden Mitochondrien zunächst mit einem Überschuss des rekombinanten Vorläuferproteins pSu9(1-69)-DHFR, welches eine Präsequenz für die Lokalisation in der mitochondrialen Matrix enthält, inkubiert. Hier konnte ebenfalls keine Veränderung der Insertion von Fis1-TMC beobachtet werden. Der Import des β -Barrel-Proteins Porin war jedoch unter diesen Bedingungen, wie erwartet, stark beeinträchtigt (Krimmer et al., 2001) (Abb. 16A). Die Behandlung mit pSu9(1-69)-DHFR hatte auch keinen Einfluss auf die

kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes. In *N. crassa* konnte unter diesen Bedingungen bei Tom6 und Tom7 eine Reduktion der Assemblierung in den TOM-Komplex festgestellt werden (Dembowski et al., 2001). Dies lässt den Schluss zu, dass das Verstopfen der Importpore die Assemblierung der kleinen Tom-Komponenten beeinflusst, nicht aber ihre Integration in die Außenmembran.

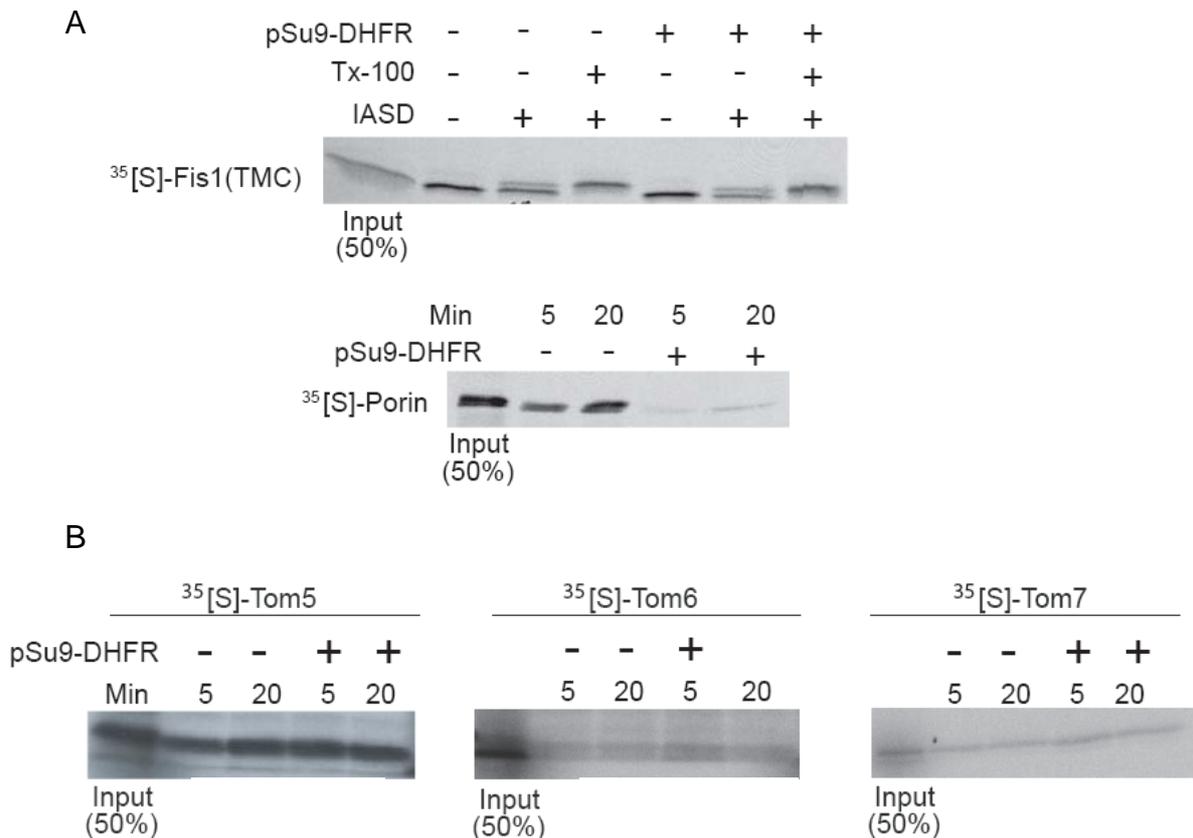


Abb. 16. Fis1 und die kleinen Tom-Untereinheiten werden unabhängig von der Importpore in die Außenmembran inseriert. A. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit isolierten Mitochondrien in An-, bzw. Abwesenheit eines Überschusses des Vorläuferproteins pSu9(1-69)-DHFR inkubiert und anschließend wie in Abb. 9 behandelt. Mitochondrien, die mit Porin inkubiert wurden, wurden nach dem Import mit Proteinase K behandelt. **B.** Radioaktive Vorstufenproteine wurden mit wie unter A behandelten Mitochondrien inkubiert und wie in Abb. 15 weiterbehandelt.

Als nächstes wurde getestet, ob eine Mutation der Hauptkomponente des TOM-Komplexes, Tom40, einen Einfluss auf die Integrationsfähigkeit von Fis1-TMC hat. Dazu wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine mit Mitochondrien inkubiert, die die Mutation *tom40-2*, *tom40-3* oder *tom40-4* enthielten. Diese Mutationen führen nach einem Hitzeschock zu einem Verlust der Funktion von Tom40. Hier konnte sowohl für Fis1-TMC als auch für die

kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes dieselbe Insertionseffizienz in Mitochondrien mit Wildtyp-Tom40 und einer Mutation in Tom40 festgestellt werden (Abb.17).

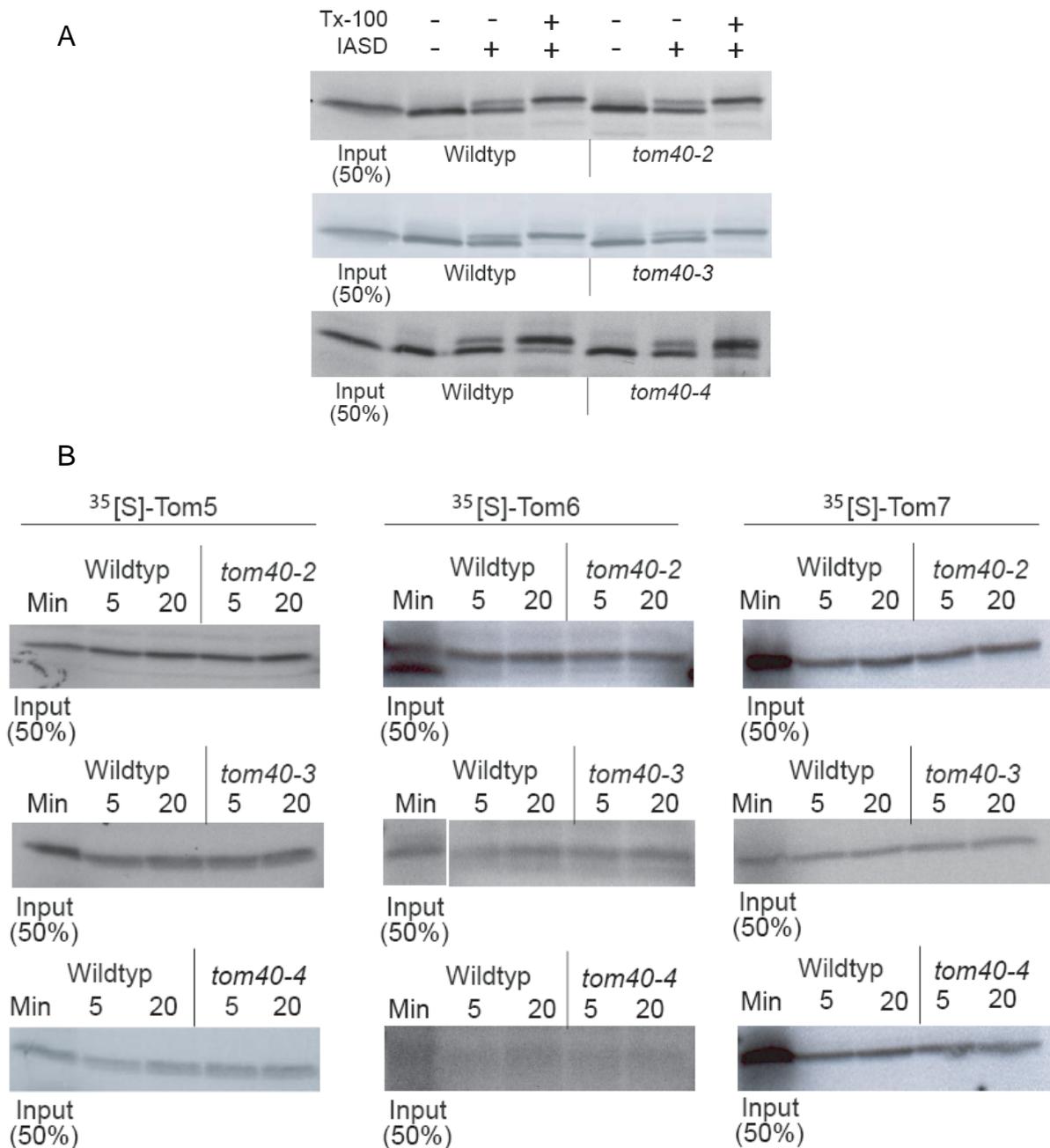


Abb. 17. Die Insertion von Fis1 und den kleinen Tom-Untereinheiten ist unabhängig von Tom40. **A.** Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Wildtyp Mitochondrien oder mit Mitochondrien, die ein temperatursensitives Allel von Tom40 (*tom40-2*, *tom40-3*, *tom40-4*) enthielten, inkubiert. Die weitere Behandlung ist in Abb. 9 beschrieben. **B.** Radioaktive Vorstufenproteine wurden mit wie unter A behandelten Mitochondrien inkubiert und wie in Abb. 15 weiterbehandelt.

Auch in Mitochondrien aus Deletionsmutanten der Tom-Komponenten (Tom5, Tom6, Tom7) konnte nach Inkubation sowohl mit radioaktiv markiertem Fis1-TMC als auch mit den kleinen Tom-Untereinheiten kein Unterschied im Insertionsverhalten festgestellt werden (siehe Abb. 18).

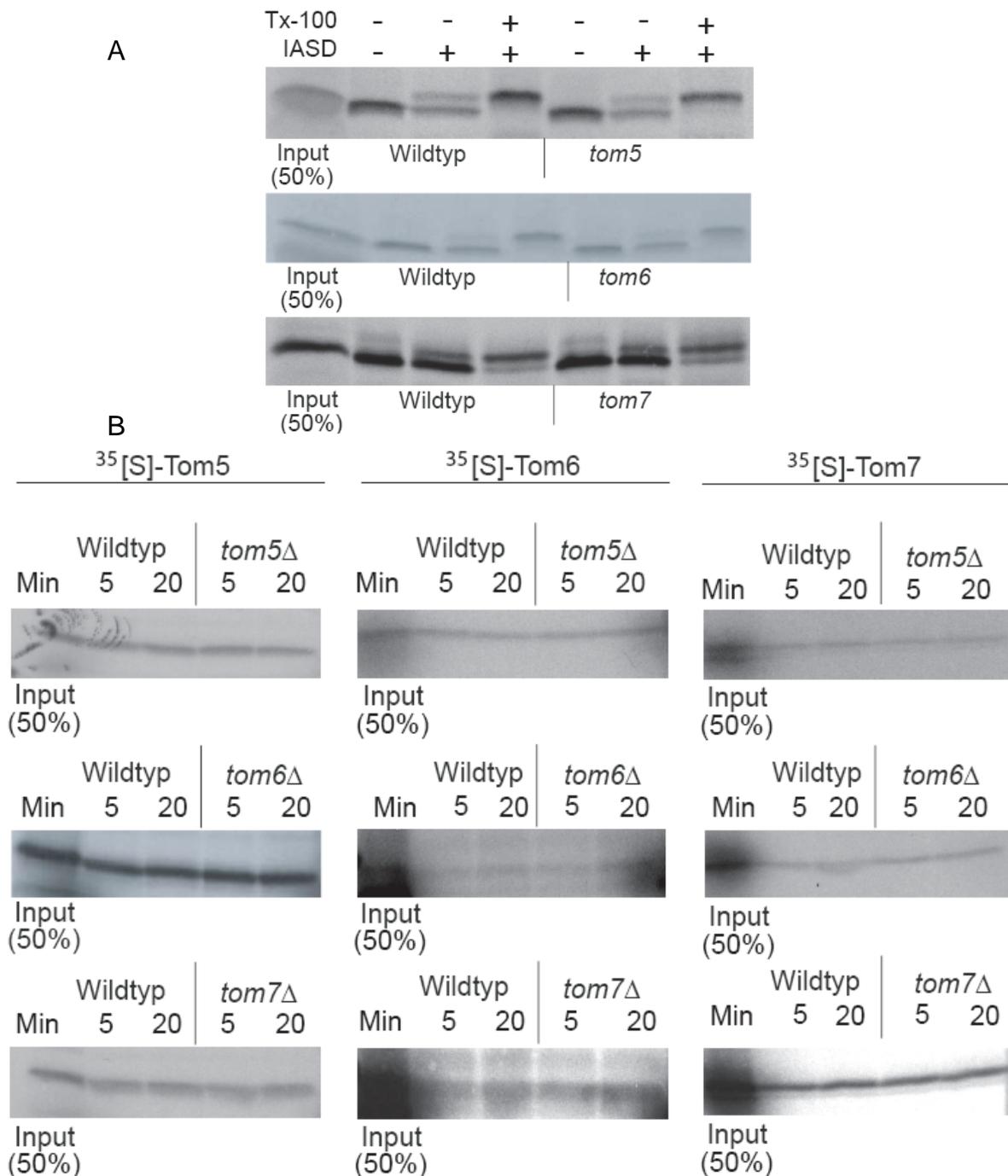


Abb.18. Fis1 und die kleinen Tom-Untereinheiten sind unabhängig von den kleinen Tom-Komponenten Tom5, Tom6 und Tom7. A. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Wildtyp Mitochondrien oder mit Mitochondrien, denen Tom5, Tom6 oder Tom7 fehlte, inkubiert. Die weitere Behandlung ist in Abb. 9 beschrieben. **B.** Radioaktive Vorstufenproteine wurden mit denselben Mitochondrien wie in A inkubiert und wie in Abb. 15 weiterbehandelt.

Im Gegensatz zum Verhalten von Fis1 oder den kleinen Tom-Komponenten ist der Import des Vorstufenproteins pSu9-(1-69)-DHFR, welches eine Präsequenz enthält, in *tom6* Δ - und *tom40-3*-Mitochondrien reduziert (Abb. 19).

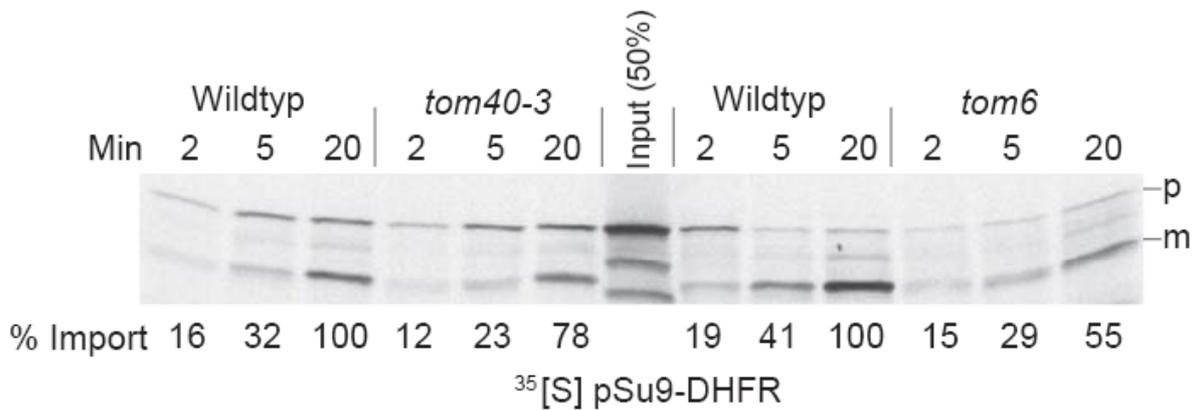


Abb. 19. Der Import von pSu9-DHFR ist in *tom40-3*- und *tom6*Δ-Mitochondrien reduziert. Radioaktiv markiertes pSu9-DHFR wurde mit den entsprechenden Mitochondrien für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Die Bande die der maturierten Form (m) entspricht, wurde quantifiziert. Dabei wurde die Menge an Vorstufenprotein, die nach 20 Minuten in Kontrollmitochondrien, wobei jeder mutierte Stamm einen unterschiedlichen parentalen Wildtypstamm besitzt, importiert wurde auf 100% gesetzt. Das Vorstufenprotein von pSu9-DHFR ist mit p gekennzeichnet.

Die Mutationen in Tom40 und den kleinen Tom-Untereinheiten beeinflussten die Integration von Fis1 auch dann nicht, wenn die Kinetik der Insertion bei 0°C analysiert wurde. Diese Daten sprechen dafür, dass die Insertion von CTA-Proteinen vom TOM-Komplex unabhängig ist. Im Gegensatz dazu ist die Insertion des Signal-Anker Proteins Tom20 von Tom40 abhängig, um seine korrekte Topologie zu erhalten (Ahting et al., 2005).

Der TOB-Komplex (z.T. auch SAM-Komplex genannt) besteht aus den Komponenten Tob55, Tob38 und Mas37 und sorgt für die Membranintegration von β-Barrel Proteinen in die Außenmembran nachdem sie durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum geleitet wurden (Paschen et al., 2005; Pfanner et al., 2004). Es stellte sich die Frage, ob dieser Komplex eine Rolle bei der Insertion von CTA-Proteinen spielt. Weder die Deletion von Mas37 noch die Herunterregulierung der Expression der essenziellen Proteine Tob55 oder Tob38 führten zu einer Veränderung des Insertionsverhaltens von Fis1-TMC und der kleinen Tom-Untereinheiten. Dies ist in Abbildung 20 am Beispiel von *mas37*Δ dargestellt (Abb. 20 und nicht gezeigte Daten). Vor allem die Ergebnisse mit *mas37*Δ stimmen mit neuesten Berichten überein, in denen gezeigt werden konnte, dass Mas37 für die Assemblierung der kleinen Tom-Komponenten benötigt wird, nicht aber für deren Insertion (Stojanowski et al., 2007).

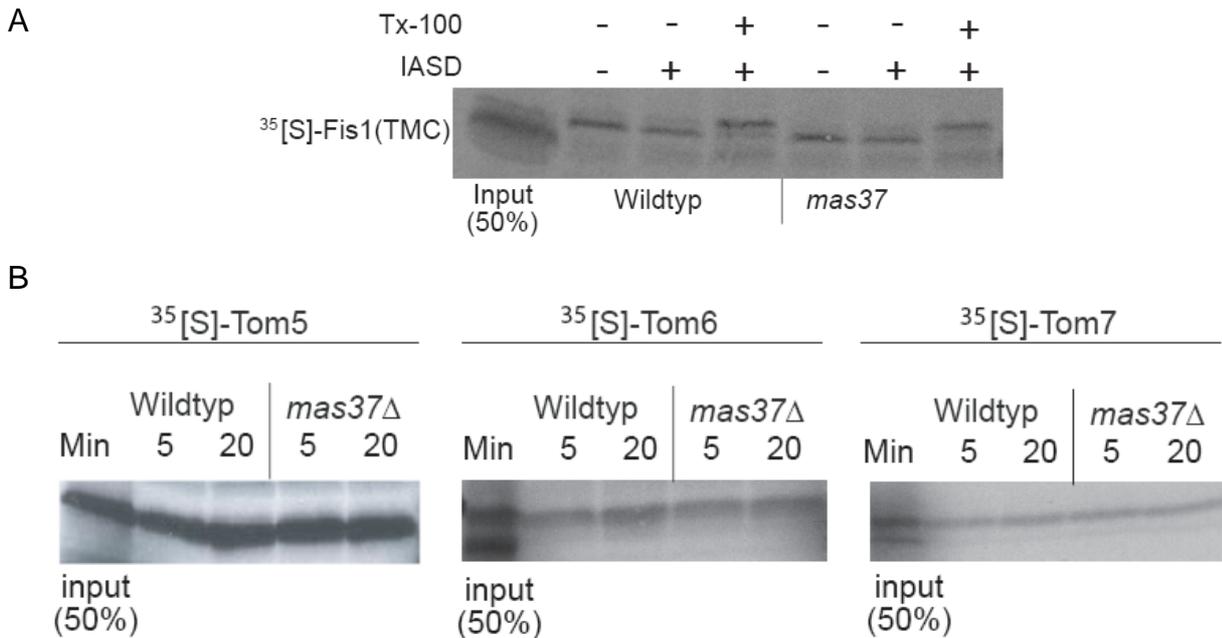


Abb. 20. Fis1 und die kleinen Tom-Untereinheiten werden TOB-unabhängig integriert.

A. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Wildtyp Mitochondrien oder mit Mitochondrien, denen Mas37 (*mas37Δ*) fehlte, inkubiert. Die weitere Behandlung ist in Abb. 9 beschrieben. **B.** Radioaktive Vorstufenproteine wurden mit denselben Mitochondrien wie in A inkubiert und wie in Abb. 15 weiterbehandelt.

Die Menge an exprimiertem Fis1 in den Mitochondrien in den hier analysierten Mutationen des TOM- und des TOB-Komplexes war im Vergleich zu Wildtypmitochondrien sehr ähnlich (nicht abgebildet). Zusammenfassend ist festzustellen, dass keines der hier untersuchten Proteine essenziell für die Insertion von CTA-Proteinen ist. In Abbildung 21 ist dies anhand der Insertion von Fis1-TMC in die verschiedenen Mutanten dargestellt.

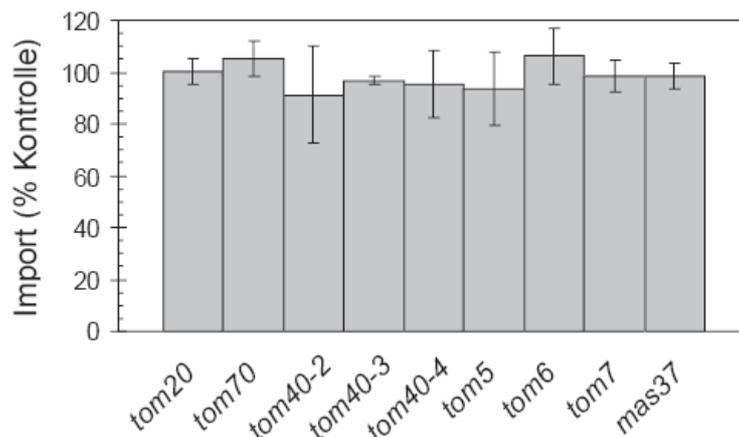


Abb. 21. Die Insertion von Fis1 ist unabhängig von den bekannten Importkomponenten.

Fis1-TMC wurde mit den angegebenen Mitochondrien, die die entsprechende Mutation aufwiesen und ihren korrespondierenden Wildtyp, inkubiert und anschließend wie in Abb. 9 behandelt. Für jeden Stamm wurden mindestens drei Experimente durchgeführt. Die Banden, die dem integrierten Protein entsprechen, d.h. unmodifiziertes Protein in Gegenwart von IASD, wurden quantifiziert. Die Menge des integrierten Proteins in den einzelnen Stämmen wurde mit dem korrespondierenden Wildtyp, der auf 100% gesetzt wurde, verglichen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.5. Fis1 kann in Lipidvesikel mit niedriger Ergosterolkonzentration integriert werden

Fis1-TMC konnte in die mitochondriale Außenmembran aller hier untersuchten Mutanten und ihres korrespondierenden Wildtyps mit derselben Effizienz inserieren. Dadurch kam die Frage auf, ob Fis1-TMC auch in der Lage sein könnte, in Lipidvesikel zu inserieren, die frei von Proteinen waren. Dafür wurden zunächst Lipidvesikel hergestellt, die die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Außenmembran nachahmten (De Kroon et al., 1999). Die Lipidzusammensetzung wurde nach einer früheren Publikation abgeschätzt und für die Herstellung der Lipidvesikel verwendet (Gaigg et al., 1995). Die Lipidvesikel bestanden aus Phosphatidylcholin (46 mol%), Phosphatidylethanolamin (35 mol%), Phosphatidylinositol (13 mol%), Cardiolipin (4 mol%) und Ergosterol (2 mol%). Anschließend wurde getestet, mit welcher Effizienz Fis1-TMC in der Lage ist, im Vergleich zu Wildtyp Mitochondrien, in die Lipidvesikel zu inserieren. Dazu wurden Vorstufenproteine von Fis1-TMC mit Mitochondrien und Lipidvesikeln für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass Fis1-TMC mit einer ähnlichen Insertionseffizienz in der Lage ist, in Vesikel eingebaut zu werden. Außerdem verhält sich Fis1-TMC in Mitochondrien und Lipidvesikeln auch bei kurzer Inkubation (1 min, 5min) ähnlich.

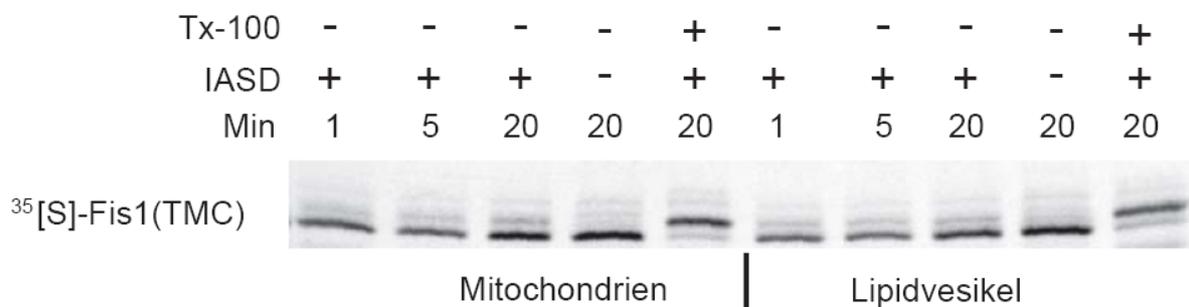


Abb. 22. Fis1 kann in Lipidvesikel und Mitochondrien mit einer ähnlichen Effizienz inserieren. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Mitochondrien (50 µg) oder einer äquivalenten Menge an Lipidvesikeln (33 µg) inkubiert und anschließend wie in Abb. 9 behandelt.

Von allen subzellulären Membranen, die an das Cytosol angrenzen, weist die mitochondriale Außenmembran den niedrigsten Gehalt an Ergosterol auf. Das Verhältnis von Ergosterol zu Phospholipid liegt hier bei 0,02/1 mol/mol (Zinser et al., 1991; Schneiter et al., 1999). Außerdem ist bekannt, dass der Cholesteringehalt für die Insertion von Cytochrom *b5* wichtig ist (Brambillasca et al., 2005). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob ein niedriges Ergosterolverhältnis ein Teil des Mechanismus sein könnte, der die spezifische Lokalisation von mitochondrialen CTA-Proteinen sichert. Um dies zu testen, wurden Lipidvesikel mit unterschiedlichem Ergosterolgehalt hergestellt. Die verwendeten Vesikel

enthielten wie in Abbildung 22 2 mol%, welches dem Gehalt in der mitochondrialen Außenmembran entspricht, 10 oder 20 mol% Ergosterol. Das Verhältnis der anderen Lipide in der Membran wurde dabei konstant gehalten. Mit diesen Vesikeln wurde dann getestet, mit welcher Effizienz die Insertion von Fis1-TMC stattfinden kann. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass die Menge des inserierten Fis1-TMC mit steigendem Ergosterolgehalt stark abnimmt. Bei einer Erhöhung des Ergosterolgehaltes auf 10 mol% werden nur noch 56% der Fis1 Proteine im Vergleich zu Vesikeln mit 2 mol% Ergosterol in die Membran intergiert. Bei einer weiteren Erhöhung des Ergosterolgehaltes auf 20 mol% waren es nur noch 41% (Abb. 23)

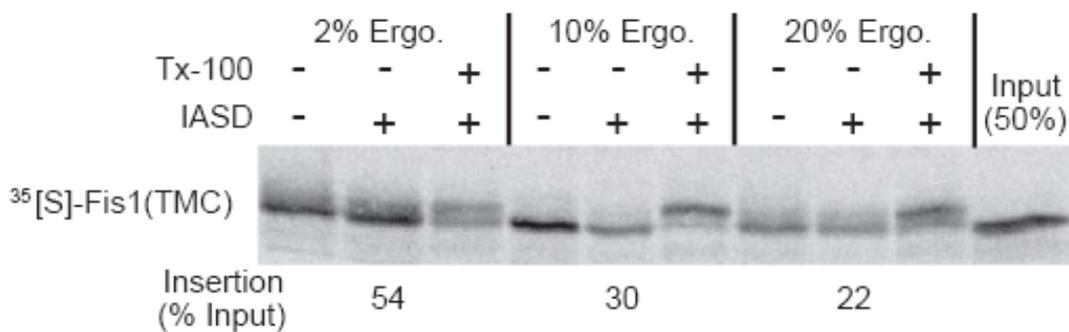


Abb. 23. Ein erhöhter Ergosterolgehalt reduziert die Insertionseffizienz von Fis1 in Lipidvesikelmembranen. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Lipidvesikeln mit mitochondrialer Lipidzusammensetzung mit den angegebenen Ergosterolkonzentrationen inkubiert und anschließend wie in Abb. 9 behandelt.

Außerdem stellte sich die Frage, ob andere Phospholipide einen ähnlichen Einfluss auf die Insertionsfähigkeit von Fis1-TMC haben. Dafür wurden Lipidvesikel aus Phospholipiden (Avanti Polar Lipids) von *E.coli* hergestellt, welchen ebenfalls unterschiedliche Ergosterolmengen beigemischt wurden. Hier konnte, wie bei den Lipidvesikeln mit mitochondrialer Zusammensetzung, beobachtet werden, dass Fis1-TMC in Lipidvesikel mit niedriger Ergosterolkonzentration mit einer ähnlichen Effizienz inseriert wie in Mitochondrien. Diese Effizienz nimmt jedoch bei steigendem Ergosterolgehalt ebenfalls stark ab (siehe Abb. 24). Dies lässt den Schluss zu, dass hauptsächlich der niedrige Ergosterolgehalt in der Membran für die Insertionseffizienz von Fis1 verantwortlich ist.

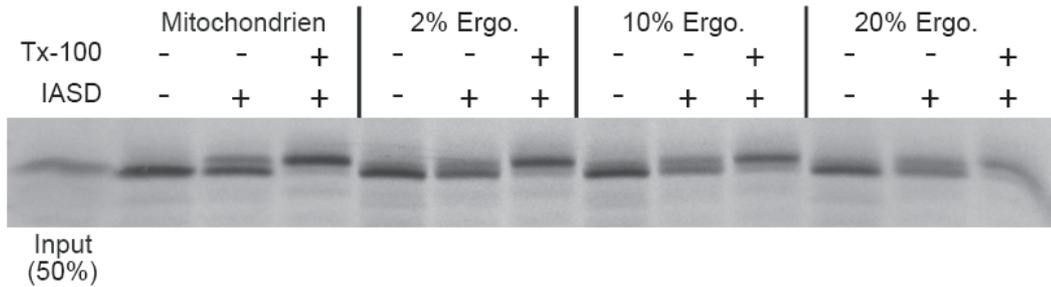


Abb. 24. Der Ergosterolgehalt in der Membran reduziert die Effizienz der Fis1 Insertion. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Lipidvesikeln aus polaren *E. coli* Phospholipiden mit den angegebenen Ergosterolkonzentrationen inkubiert und anschließend wie in Abb. 9 behandelt.

Als Kontrolle wurde eine Variante von Tom20 mit den Lipidvesikeln aus Abb. 22 inkubiert. Diese Variante besitzt eine N-terminale Verlängerung aus den ersten 38 Aminosäuren von *N. crassa* Tom70 (Tom20ext). Durch diese Verlängerung ist es möglich eine Insertion von Tom20 in die Membran durch einen proteolytischen Verdau nach der Importreaktion zu beobachten. Mit diesem Vorstufenprotein konnte bereits beobachtet werden, dass der TOM-Komplex für die Insertion von Tom20 benötigt wird und dass Tom20 nur in geringen Mengen in Lipivesikel inseriert (Ahting et al., 2005). Tom20 war an Mitochondrien und Lipidvesikel gebunden, konnte aber nur in Mitochondrien integriert werden (Abb. 25). Dies lässt den Schluss zu, dass nicht alle Außenmembranproteine in der Lage sind, in Lipidvesikel zu inserieren und dass Fis1 in Lipidvesikel mit niedrigem Ergosterolgehalt inserieren kann.

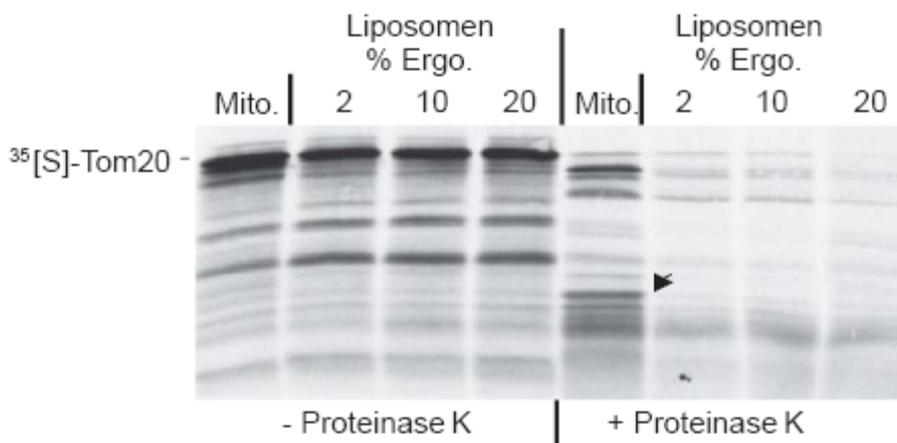


Abb. 25. Tom20ext kann nicht in Lipidvesikel inserieren. Radioaktiv markiertes Tom20ext wurde für 20 Minuten bei 25°C entweder mit Mitochondrien oder mit einer äquivalenten Menge Lipidvesikeln mit entsprechendem Ergosterolgehalt inkubiert. Anschließend wurden die Proben geteilt, so dass zwei gleich große Proben entstanden. Eine Hälfte wurde in Auftragspuffer gelöst, die andere mit 500 µg/ml Proteinase K behandelt und dann in Auftragspuffer gelöst. Das spezifische Insertionsfragment ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die bisherigen Experimente mit Lipidvesikeln wurden nicht unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt und es wäre zu erwarten, dass der hydrophobe Teil von Fis1 in der Lage sein sollte, *in vitro* in jede Membran mit der richtigen Lipidzusammensetzung zu inserieren. Da die Insertionskinetik zu schnell ist, um mit der hier angewandten Methode gemessen werden zu können, ist es nicht möglich, die Insertionskinetik in Mitochondrien und Lipidvesikel zu vergleichen. Aus diesem Grund sollte festgestellt werden, in welche Membran Fis1 bevorzugt inseriert, wenn sowohl Mitochondrien als auch Lipidvesikel im selben Reaktionsgemisch vorliegen. Diese Bedingungen simulieren die *in vivo* Situation besser, in der CTA-Proteine eine Integration in das falsche Zellkompartiment verhindern sollten und spezifisch in ihr Zielkompartiment inserieren. Um die Insertion von Fis1-TMC sowohl in Mitochondrien als auch in Lipidvesikeln getrennt analysieren zu können, mussten diese durch differenzielle Zentrifugation getrennt werden. Die Verteilung der Lipidvesikel wurde mit Hilfe von 2 mol% Fluorescein-Phosphatidylethanolamin in den Lipidvesikeln, die ansonsten dieselbe Lipidzusammensetzung besaßen, verfolgt. Durch das fluoreszierende Phospholipid konnte die Fluoreszenz jeder einzelnen Fraktion gemessen werden. Nach der Trennung von Mitochondrien und Phospholipiden konnten 8-12% der Gesamtfluoreszenz in der mitochondrialen Fraktion gefunden werden. Etwa 90% der Fluoreszenz konnte in der Fraktion mit den Lipidvesikeln gemessen werden. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass die mitochondriale Fraktion mit aggregierten Liposomen signifikant kontaminiert war. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind an einem Beispiel in Abbildung 26 dargestellt.

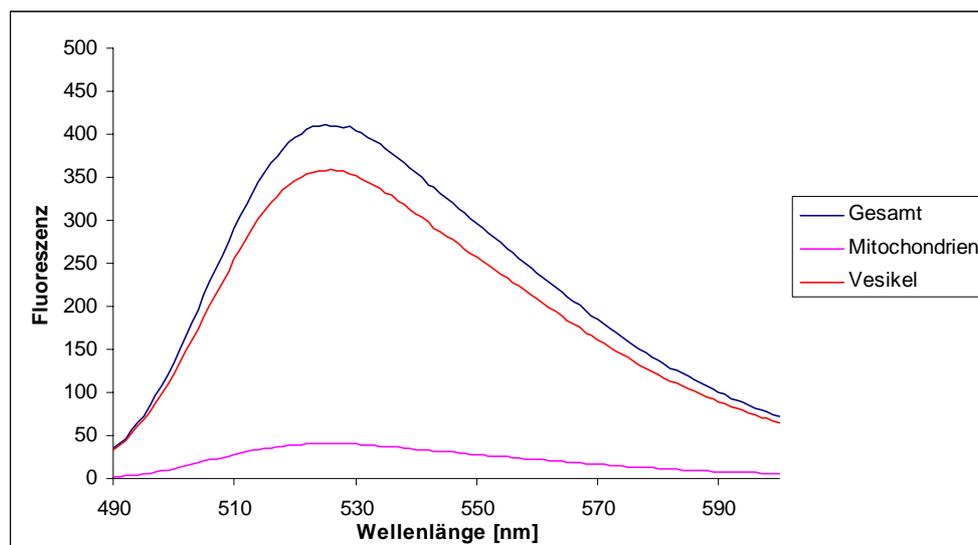


Abb.26. Fluoreszenzmessungen der Fraktionen. Die Fluoreszenz der Proben wurde vor und nach der differentiellen Zentrifugation mit Hilfe des Fluoreszenzspektrums von Fluorescein-Phosphatidylethanolamin gemessen. Fluorescein wird bei einer Wellenlänge von 480 nm (Absorptionsmaximum) angeregt und besitzt sein Emissionsmaximum bei 521 nm.

In diesen Konkurrenzexperimenten konnte ein Großteil der Fis1-Moleküle in die Mitochondrien inserieren. Fis1 konnte aber auch in Lipidvesikel inserieren. Hier zeigte sich, dass ein erhöhter Ergosterolgehalt die Fähigkeit der Vesikel mit den Mitochondrien, um Fis1-Moleküle zu konkurrieren, stark reduzierte (Abb. 27). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Ergosterol die Insertion von Fis1-TMC in Lipidvesikel inhibiert.

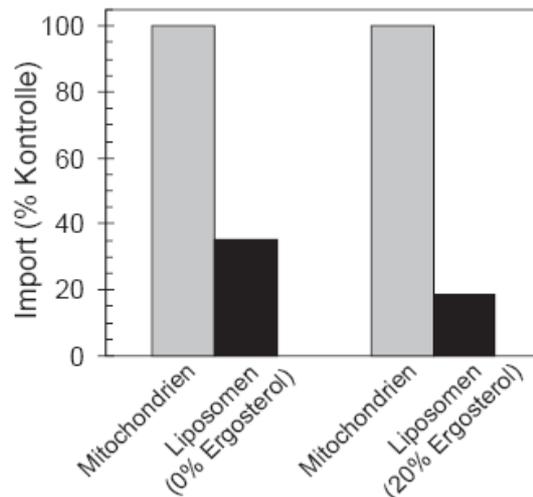


Abb. 27. Ein erhöhter Ergosterolgehalt inhibiert die Insertion von Fis1-TMC in Lipidvesikel. Radioaktiv markiertes Vorstufenprotein von Fis1-TMC wurde mit einem Gemisch aus Mitochondrien (50 µg Protein) und 33 µg Lipidvesikeln mit entsprechendem Ergosterolanteil inkubiert und wie in Abb. 9 beschrieben, mit IASD behandelt. Mitochondrien und Lipidvesikel wurden durch differenzielle Zentrifugation getrennt und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Die Banden wurden quantifiziert und die Intensität des von IASD nicht modifizierten Proteins wurde als Maß für die Insertion des Proteins in die Membran genommen. Die Proteinmenge, die in die Mitochondrien inserierte, wurde für jedes Gemisch auf 100% gesetzt.

Mitochondrien von *N.crassa* enthalten in ihrer Außenmembran einen Ergosterolgehalt, der bei etwa 30% und damit weit über dem von Hefe liegt (Hallermayer und Neupert, 1974). Deshalb wurden isolierte Mitochondrien aus Hefe und *N. crassa* mit Fis1-TMC inkubiert. Die Fähigkeit von Fis1-TMC, in Mitochondrien von *N. crassa* zu inserieren, war reduziert. In *N.crassa* Mitochondrien inserierten nur etwa 60% des Fis1 im Vergleich zu Hefe (Abb. 28).

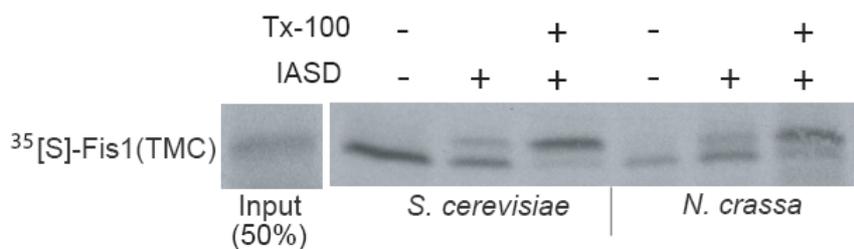


Abb.28. Die Insertion von Fis1-TMC ist in *N. crassa*-Mitochondrien stark beeinträchtigt. Radioaktiv markiertes Fis1-TMC wurde mit Hefemitochondrien oder mit Mitochondrien aus *N. crassa* inkubiert. Die weitere Behandlung ist in Abb. 9 beschrieben.

3.6. Insertion von Fis1-TMC-4Q in Lipidvesikeln und Microsomen

Im nächsten Schritt wurde die Membraninsertion einer Fis1-Variante mit vier Ladungsaustauschen in der C-terminalen Region (Fis1-TMC-4Q) untersucht (Abb. 7). Diese Variante ist sowohl *in vitro* (Abb. 11) als auch *in vivo* (Habib et al., 2003) nicht in der Lage, in die Außenmembran integriert zu werden. Es stellte sich die Frage, ob diese Ladungsvariante in Lipidvesikel inserieren kann. Für den Fall, dass eine Insertion stattfindet, würde sich daraus die Frage ergeben, wie Mitochondrien zwischen den beiden Konstrukten unterscheiden können. Zuerst wurden Fis1-TMC und Fis1-TMC-4Q mit Lipidvesikeln inkubiert, die die mitochondriale Lipidzusammensetzung hatten. Im Gegensatz zu Fis1-TMC war Fis1-TMC-4Q nicht in der Lage, in Lipidvesikel zu inserieren (Abb. 29A). Um nun zu testen, wie spezifisch das verwendete *in vitro* System ist, wurden Fis1-TMC und Fis1-TMC-4Q mit Microsomen aus Hundepankreas (Promega) inkubiert. Fis1-TMC-4Q war in der Lage, in Microsomen integriert zu werden (Abb. 29B). Fis1-TMC konnte ebenfalls in Microsomen mit einer ähnlichen Effizienz eingebaut werden. Dieses Ergebnisse stimmen mit einem früheren Bericht überein, in dem gezeigt werden konnte, dass eine Variante von Cytochrom *b5*, die *in vivo* an den Mitochondrien lokalisiert ist, *in vitro* sehr effizient in Microsomen integriert werden kann (Borgese et al., 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass Fis1-TMC-4Q aufgrund seiner veränderten Ladungen im C-Terminus weder in Mitochondrien noch in Lipidvesikel inserieren kann. Daraus kann man schließen, dass die Mitochondrien nicht zwischen den beiden Ladungsvarianten unterscheiden, sondern dass die Ladungen in der Nähe der Transmembrandomäne für die Insertion verantwortlich sind.

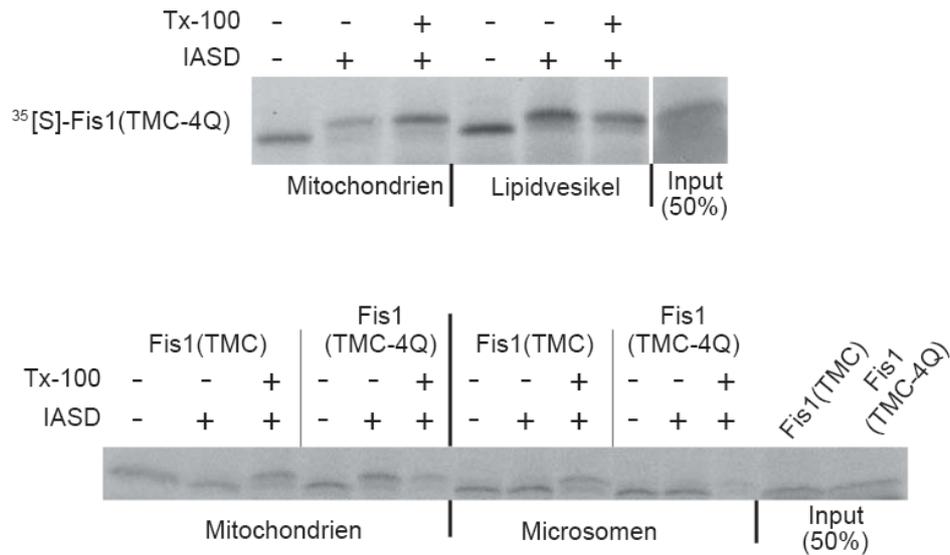


Abb. 29. Eine Ladungsvariante von Fis1 kann in Microsomen aber nicht in Lipidvesikel integriert werden. **A.** Radioaktiv markiertes Fis1-TMC-4Q wurde für 20 Minuten bei 25°C entweder mit Mitochondrien (50 µg Protein) oder Lipidvesikeln (33 µg) inkubiert und wie in Abb. 9 weiterbehandelt. **B.** Radioaktiv markierte Vorstufenproteine von Fis1-TMC und Fis1-TMC-4Q wurden für 20 Minuten bei 25°C mit 50 µg Mitochondrien oder Microsomen inkubiert und wie in Abb. 9 weiterbehandelt.

4. Diskussion

Proteine mit C-terminalem Anker (CTA-Proteine) erfüllen in der Zelle wichtige Funktionen an ihren spezifischen Organellen, die für das Leben, bzw. den Tod der Zelle verantwortlich sind. Sie sind mit ihrem C-terminalen Segment in der Membran verankert, während der Großteil des Proteins im Cytosol lokalisiert ist. Beispiele dieser Proteinklasse sind Fis1, das an der Teilung von Mitochondrien beteiligt ist, die kleinen Untereinheiten den TOM-Komplexes, Tom5, Tom6 und Tom7, sowie, bei höheren Eukaryoten die Apoptose regulierenden Proteine der Bcl-2-Familie und antivirales Signalling.

4.1. Die Transmembrandomäne enthält die Information für die mitochondriale Lokalisation

Für die Lokalisation von CTA-Proteinen in der mitochondrialen Außenmembran konnte bereits gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne von positiven Ladungen flankiert sein muss und dass eine Änderung dieser Ladungen zu einer veränderten Lokalisation in der Zelle führt (Habib et al., 2003). Hier sollte geklärt werden, ob die Transmembrandomäne alleine in der Lage ist, für die mitochondriale Lokalisation zu sorgen. Dies konnte mit Hilfe eines Fusionsproteins aus GFP und der Transmembrandomäne von Fis1 aus Hefe gezeigt werden, welches, wie Fis1, an den Mitochondrien lokalisiert war. Für humanes Fis1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Fehlen der N-terminalen Domäne keinen Einfluss auf die Lokalisation hat (Yoon et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die cytosolische Domäne alleine nicht in der Lage war, zu den Mitochondrien zu gelangen (Mozdy et al., 2000). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Information für die Lokalisation in der Transmembrandomäne liegt und keine weiteren Bereiche dafür notwendig sind.

4.2. Entwicklung einer spezifischen Methode für die Beobachtung der Insertion in die Membran

Nun sollte der Import von CTA-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran näher charakterisiert werden, wobei der Importmechanismus und die daran beteiligten Komponenten von Interesse waren. Bisher war die Untersuchung dieser Frage nur begrenzt möglich, da der Einbau von Vorstufenproteinen in die Außenmembran nicht zuverlässig analysiert werden konnte. Ein proteolytischer Verdau von Vorstufenproteinen mit einer Protease nach Beendigung der Importreaktion würde hier zu sehr kleinen Proteinfragmenten

führen, die später durch SDS-PAGE nicht mehr zu beobachten wären. Mit der in bisherigen Studien verwendeten Methode der Carbonatextraktion ist es nicht möglich, zwischen unspezifischer Bindung des hydrophoben Vorstufenproteins und physiologischer Membranintegration zu unterscheiden (Borgese et al., 2003). Um dieses Problem zu lösen, wurde eine spezifische und zuverlässige Methode entwickelt, um die Membranintegration zu verfolgen. Diese Methode beruht darauf, dass das CTA-Protein Fis1, welches als Modellprotein verwendet wurde, in der Transmembrandomäne ein Cystein enthält, das bei spezifischer Membranintegration nicht durch das sulfhydrylreaktive Reagenz IASD, welches Membranen nicht passieren kann, modifiziert werden kann. Bei einer unspezifischen Membranbindung von Fis1 ist das Cystein für IASD zugänglich und kann modifiziert werden. Durch die Modifikation hat nicht integriertes Fis1 ein höheres Molekulargewicht und kann durch SDS-PAGE von spezifisch integriertem Fis1 unterschieden werden. Mit Hilfe dieser Methode konnte kürzlich die TOM-unabhängige Insertion von Mcr1 in die Außenmembran von Mitochondrien beobachtet werden (Meineke et al., 2008).

4.3. Die Insertion von Proteinen mit C-terminalem Anker ist unabhängig von den bekannten Translokationskomplexen der Außenmembran

Die meisten bisherigen Studien über mitochondriale CTA-Proteine wurden mit Untereinheiten des TOM-Komplexes als Modellproteine durchgeführt. Daher ist es nicht überraschend, dass die richtige Topologie und die Assemblierung dieser Proteine TOM-Komplex-abhängig ist (Dembowski et al., 2001). Aus diesem Grund fiel die Wahl des Modellproteins auf Fis1, da es keine Untereinheit des TOM-Komplexes ist.

Mit dieser Methode wurde gezeigt, dass die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 nicht nötig für den korrekten Membraneinbau von Fis1 sind. In einer früheren Studie konnte jedoch beobachtet werden, dass der Importrezeptor Tom20 an der Insertion des CTA-Proteins Bcl-2 in Hefemitochondrien beteiligt ist (Mutz et al., 2002). Es ist unklar, ob diese Beobachtung durch das verwendete Modellprotein kommt, oder daher, dass ein heterologes System verwendet wurde. Im Gegensatz zum Signal-Anker Protein Tom20 (Ahting et al., 2005), das seine Transmembrandomäne, die ebenfalls von positiven Ladungen flankiert ist, am N-Terminus hat, war die Insertion von Fis1 nicht durch eine Mutation in Tom40 beeinflusst. Außerdem wurden auch keine weiteren Komponenten des TOM-Komplexes benötigt. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer Studie, in der eine TOM-unabhängige Insertion mehrerer CTA-Proteine in Säugermitochondrien beobachtet werden konnte (Setoguchi et al., 2006). Setoguchi et al. benutzten Säugerzellen als Modellzellen, in denen man mit RNAi einen

knockdown des entsprechenden Gens erreicht. Dies schließt aber nicht aus, dass noch minimale Mengen der Importkomponenten vorhanden sein könnten, die für die Integration von CTA-Proteinen ausreichen. In dieser Arbeit konnte die Insertion von CTA-Proteinen an Hefemitochondrien beobachtet werden, welche den Vorteil besitzen, dass man Deletionsmutanten erzeugen kann. Auf diese Weise kann man sicherstellen, dass das entsprechende Gen nicht mehr exprimiert werden kann. Es wurde in diesen Experimenten eine sehr schnelle und temperaturunabhängige Insertionskinetik festgestellt. Setoguchi et al. konnten mit ihrer Methode eine langsamere und temperaturabhängigere Insertion beobachten. Dieser Unterschied könnte durch die Verwendung der verschiedenen experimentellen Systeme entstanden sein. In dem hier verwendeten System wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine mit einer verdünnten Lösung, die Mitochondrien enthielt, gemischt. Dadurch hatten die Vorstufenproteine direkten Zugang zur mitochondrialen Außenmembran. Durch die Verwendung semi-intakter Zellen bei Setoguchi et al., zu denen die Vorstufenproteine gegeben wurden, mussten diese durch das sehr dichte Cytosol erst zu den Mitochondrien gelangen, wodurch sich das veränderte Verhalten erklären lässt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die spezifische Insertion von CTA-Proteinen in Mitochondrien nicht auf spezifischen Interaktionen mit den Komponenten des TOM-Komplexes beruht.

Anschließend stellte sich die Frage, ob die Komponenten des TOB-Komplexes einen Einfluss auf die Insertion von CTA-Proteinen haben könnten. Es konnte für den TOB-Komplex demonstriert werden, dass er an der Biogenese α -helikaler Untereinheiten des TOM-Komplexes beteiligt ist. Dies trifft auch auf die kleinen Untereinheiten zu, die CTA-Proteine sind. Allerdings ist nur die Assemblierung in den TOM-Komplex und nicht die Insertion in die Membran betroffen (Stojanowski et al., 2007). In dieser Arbeit konnte sowohl für die kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes als auch für Fis1 festgestellt werden, dass die Insertion in die mitochondriale Außenmembran vom TOB-Komplex unabhängig verläuft. Somit sind für eine spezifische Insertion von CTA-Proteinen weder Interaktionen mit Komponenten des TOM-Komplexes noch mit den Komponenten des TOB-Komplexes nötig. Dies bedeutet, dass die spezifische Insertion eher von anderen Faktoren abhängig ist.

4.4. Ein niedriger Ergosterolgehalt der Membran ist die Voraussetzung für die Membraninsertion

Einer der Faktoren, die die Spezifität der Membranintegration beeinflussen, könnte die Lipidzusammensetzung der Außenmembran sein. Der Gehalt an Ergosterol in der

mitochondrialen Außenmembran von Hefe ist der niedrigste in allen Membranen, die Kontakt zum Cytosol haben. Das molare Verhältnis von Ergosterol zu Phospholipid beträgt 0,01 bis 0,02 in dieser Membran (Schneiter et al., 1999; Zinser et al., 1991), während das Verhältnis in ER oder Plasmamembran bei 0,18, bzw. 0,46 liegt (Schneiter et al., 1999). Der Frage, ob der Ergosterolgehalt einen Einfluss auf das Insertionsverhalten von Fis1 hat, wurde mit Hilfe von Lipidvesikeln, die unterschiedlichen Ergosterolgehalt hatten, nachgegangen. Zunächst konnte beobachtet werden, dass Fis1 sehr effizient in Lipidvesikel mit mitochondrialer Lipidzusammensetzung inserieren kann. Eine Erhöhung des Ergosterolgehaltes führte zu einer starken Reduzierung von Fis1. Daraus folgt der Schluss, dass der niedrige Ergosterolgehalt und die daraus resultierende erhöhte Fluidität der Außenmembran dazu beitragen, dass mitochondriale CTA-Proteine spezifisch in die Außenmembran eingebaut werden können. Der niedrige Sterolgehalt kann eine schnellere Insertion in die Membran erleichtern und dadurch der mitochondrialen Außenmembran einen kinetischen Vorteil gegenüber den anderen Membranen in der Zelle verleihen. Dieser Schluss wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Insertion von Vorstufenproteinen von Hefe-Fis1 in isolierten Mitochondrien aus *N. crassa* stark reduziert war. Die Außenmembran dieser Mitochondrien enthält einen viel höheren Anteil an Ergosterol im Vergleich zur mitochondrialen Außenmembran von Hefe (Hallermayer und Neupert, 1974). Ein kleiner Teil von Fis1-Molekülen konnte in neueren Studien auch in der Membran von Peroxisomen gefunden werden (Kobayashi et al., 2007; Koch et al., 2005). Peroxisomen besitzen, wie Mitochondrien, einen niedrigen Ergosterolgehalt mit einem molaren Verhältnis von 0,03 im Vergleich zu Phospholipiden (Schneiter et al., 1999). Dies unterstützt die Theorie, dass die Insertion von Fis1 durch einen niedrigen Ergosterolgehalt gefördert wird. Für CTA-Proteine mit Lokalisation im ER wurde vorgeschlagen, dass der relativ niedrige Ergosterolgehalt im Vergleich zu den Membranen des Sekretionsweges die Lokalisation unterstützt (Brambillasca et al., 2005). Die Insertion mitochondrialer CTA-Proteine benötigt sogar einen noch niedrigeren Ergosterolgehalt. Somit scheint die definierte Lipidzusammensetzung von jeder subzellulären Membran ein entscheidender Faktor bei der Aufrechterhaltung des proteomischen Profils der Organellenmembran zu sein. Ein weiteres Indiz, dass die Lipidzusammensetzung der Membran Einfluss auf Membranproteine hat, ist die Innenmembran von Mitochondrien, in der das Lipid Cardiolipin an der Stabilisierung und Organisation von Proteinkomplexen beteiligt ist (McKenzie et al., 2006; Zhang et al., 2005). Die Frage, ob Ergosterol *in vivo* einen ähnlichen Effekt auf die Insertion von CTA-Proteinen hat, wurde an den Mutanten *erg6Δ*, *erg24Δ* und *erg28Δ* untersucht. Diese Mutanten besitzen

Defekte im Ergosterolsyntheseweg und haben einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie, die der von *fis1* Δ ähnelt (Altmann und Westermann, 2005). Es konnte zwar eine Reduktion von Fis1 an den Mitochondrien festgestellt werden, aber gleichzeitig waren auch andere mitochondriale Proteine (OM45, Porin, Tim23, Tim50 und Tom40) teilweise reduziert (Daten nicht gezeigt). Dies kann dadurch zustande kommen, dass durch das Fehlen von Ergosterol auch der Import und die Assemblierung anderer mitochondrialer Proteine stark beeinflusst werden, da durch die veränderte Lipidzusammensetzung ähnlich wie beim Fehlen von Cardiolipin in der Innenmembran (McKenzie et al., 2006; Zhang et al., 2005), die Stabilisierung und Organisation von Proteinkomplexen in der Membran gestört sein kann. Durch den Einfluss der Lipidzusammensetzung auf das Insertionsverhalten von CTA-Proteinen ist es möglich, dass Lipide eine Rolle bei der Biogenese von Organellen und dort vor allem der Proteintranslokation spielen.

Es stellt sich also die Frage, wie Fis1 *in vivo* an seinen richtigen Bestimmungsort gelangt. Fis1 war jedoch auch in der Lage, *in vitro* in Microsomen integriert zu werden. Diese Beobachtung unterstützt die Idee, dass die ER-Membran, solange keine konkurrierenden Organellen vorhanden sind, fähig ist, CTA-Proteine zu integrieren, die eigentlich in anderen Membranen lokalisiert sind (Borgese et al., 2007). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Spezifität von CTA-Proteinen für die richtige Membran, die eine falsche Insertion verhindern sollte, auf kinetischen Faktoren beruht, die die irreversible Integration in das richtige Kompartiment beschleunigen. Bei diesen Faktoren könnte es sich um noch nicht identifizierte Proteine handeln, die die Insertion von Fis1 in die Membran durch Einfangen des Fis1-Vorstufenproteins verstärken. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Außenmembran Lipiddomänen oder andere strukturelle Elemente enthält, die die Insertion von Fis1 erleichtern und/oder die integrierten Proteine stabilisieren. Diese Stabilisierung, die in Lipidvesikeln nicht vorkommt, wird wahrscheinlich nicht für die Membranintegration selbst benötigt, aber sie könnte das Gleichgewicht zwischen Vorstufen-Fis1 und vollkommen inseriertem Fis1 auf die zuletzt genannte Seite verschieben.

4.5 Mögliche Mechanismen der Membraninsertion

Eine große Frage bei der Topogenese von CTA-Proteinen ist, ob der Transport vom Cytosol zur richtigen Zielmembran und die darauf folgende Integration in die Membran von cytosolischen Proteinen und/oder Proteinen in der Zielmembran unterstützt werden. Für CTA-Proteine, die im ER lokalisiert sind, gibt es darüber sich widersprechende Berichte (Borgese et al., 2003; High und Abell, 2004). Während für das Protein Syb2 die Beteiligung der Sec-

Maschinerie vermutet wird (Abell et al., 2003), wird für Cytochrom *b5* ein Mechanismus, der unabhängig von anderen Proteinen ist, vorgeschlagen (Brambillasca et al., 2005). Eine mögliche Lösung für dieses Problem ist die Vorstellung, dass CTA-Proteine verschiedenen Wegen abhängig von der Hydrophobizität ihrer Transmembransegmente folgen (High und Abell, 2004). Proteine mit niedriger Hydrophobizität in dieser Region können ohne Hilfe eines anderen Faktors zu ihrem Zielort gelangen, während solche mit einem stärker hydrophoben Transmembransegment die Hilfe zusätzlicher Proteine benötigen (Brambillasca et al., 2006). Diese Idee wird durch die kürzliche Entdeckung des cytosolischen Proteins Asna1/TRC40, welches mit einer Untergruppe von CTA-Proteinen interagiert und ihren Transport zum ER erleichtert, unterstützt (Stefanovic und Hedge, 2007). TRC40 war jedoch nicht an der Insertion von Proteinen wie Cytochrom *b5* beteiligt, die ohne Unterstützung in die Membran inserieren können. Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung cytosolischer Proteine ist das am ER lokalisierte CTA-Protein Sec61 β , dessen Insertion vom Chaperon Hsp70 und seinem Co-Chaperon Hsp40 erleichtert wird (Abell et al., 2007). Bis jetzt konnte noch kein Protein identifiziert werden, das die Biogenese mitochondrialer CTA-Proteine erleichtert. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass solche Faktoren CTA-Proteine zu den Mitochondrien bringen. Daraus ergeben sich für die Insertion von CTA-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran drei Möglichkeiten (Abb. 30). Die erste Möglichkeit ist die, dass im Cytosol synthetisierte Vorstufenproteine in der Außenmembran von einem bisher noch nicht identifizierten Protein in der Außenmembran erkannt und eingebaut werden. In Hefe konnte etwa 85% des Proteoms der mitochondrialen Außenmembran identifiziert werden (Zahedi et al., 2006). Dabei handelt es sich um etwas mehr als 100 Proteine, von denen zum größten Teil ihre Funktion schon bekannt ist. Daher besteht noch die Möglichkeit, dass ein solcher Rezeptor existiert und noch nicht identifiziert ist. Es stellt sich allerdings die Frage, ob CTA-Proteine für Ihre Insertion in die Mitochondriale Außenmembran einen Rezeptor benötigen, da Versuche mit proteasebehandelten Mitochondrien und Lipidvesikeln zeigten, dass die Insertion auch in diesen Fällen mit unveränderter Effizienz ablief. Daher ist die Wahrscheinlichkeit eines Rezeptorproteins in der Membran als eher niedrig einzuschätzen. Die zweite Möglichkeit ist, dass Vorstufenproteine ohne Hilfe von anderen Proteinen in die Membran inserieren können. Die dritte Möglichkeit beinhaltet einen cytosolischen Faktor, der die Vorstufenproteine bindet und zur mitochondrialen Außenmembran bringt, wo dann die Insertion des Vorstufenproteins stattfindet, welche mit oder ohne Hilfe eines weiteren Faktors ablaufen könnte. Die Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass zumindest für die Insertion von CTA-Proteinen

die richtige Lipidzusammensetzung ausreicht und der TOM-Komplex nicht an der Insertion beteiligt ist.

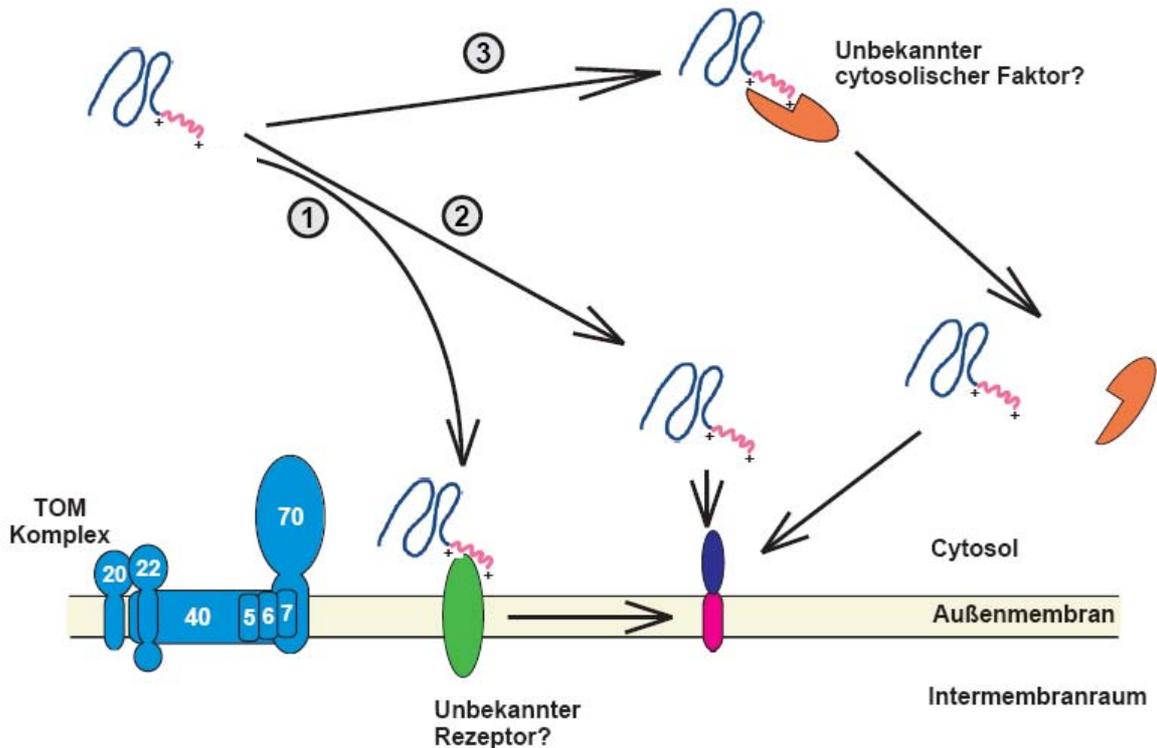


Abb. 30. Mögliche Mechanismen der Insertion von CTA-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran. 1) CTA-Proteine werden von einem bisher unbekanntem Rezeptor in der mitochondrialen Außenmembran erkannt und integriert. 2) CTA-Proteine können ohne Hilfe von anderen Proteinen in die Außenmembran inserieren. 3) CTA-Proteine werden von einem oder mehreren cytosolischen Faktoren gebunden und zur Außenmembran gebracht, wo sie mit, bzw. ohne Hilfe eines Rezeptors inserieren können. Der TOM-Komplex ist an keinem der möglichen Mechanismen beteiligt. Die positiven Ladungen in dieser Abbildung repräsentieren alle die Transmembrandomäne flankierenden positiven Ladungen.

Bei den kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes konnte ebenfalls beobachtet werden, dass zumindest die Insertion in die mitochondriale Außenmembran wie bei Fis1 unabhängig von den bekannten Importkomponenten abläuft. Dies lässt es wahrscheinlicher werden, dass die Insertion in die mitochondriale Außenmembran sowohl von Fis1 als auch von den kleinen Untereinheiten des TOM-Komplexes zumindest teilweise über denselben Mechanismus ablaufen. Der Unterschied von Fis1 zu den kleinen TOM-Komponenten ist, dass diese für ihre Assemblierung in den TOM-Komplex und ihre Funktion auf andere Faktoren, wie die Assemblierung in den TOM-Komplex (Model et al., 2001), oder die Hilfe von Mas37 (Stojanowski et al., 2007), angewiesen sind. Für die Außenmembranvariante des Signal-Anker Proteins Mcr1 konnte ebenfalls beobachtet werden, dass es TOM-unabhängig in die Außenmembran inserieren kann (Meineke et al., 2008). Der Unterschied von CTA- und

Signal-Anker Proteinen besteht darin, dass sich die Transmembrandomäne am N-, bzw. C-Terminus befindet. Abgesehen von diesem Unterschied sind die Transmembrandomänen sehr ähnlich aufgebaut. Beide besitzen ein kurzes Transmembransegment und sind von positiven Ladungen flankiert. Daher kann es auch möglich sein, dass diese sehr ähnlichen Informationen in der Transmembranregion dazu beitragen, dass beide Proteinklassen einen ähnlichen Mechanismus zur Membraninsertion benutzen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass Fis1 über einen neuen Weg in die mitochondriale Außenmembran integriert wird, der keine der bekannten Importkomponenten der Außenmembran benutzt und dass die richtige Lipidzusammensetzung der Außenmembran die Insertion erleichtert.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biogenese von Proteinen mit C-terminalem Anker in der mitochondrialen Außenmembran untersucht. Diese Proteine bestehen aus einem Transmembransegment am C-Terminus und einer hydrophilen cytosolischen Domäne. CTA-Proteine mit mitochondrialer Lokalisation übernehmen eine Reihe wichtiger Aufgaben. Sie stabilisieren den TOM-Komplex, modulieren die mitochondriale Morphologie und regulieren in höheren Eukaryoten die Apoptose und das antivirale Signalling. Trotz ihrer Bedeutung für viele zelluläre Prozesse ist der Mechanismus, über den sie erkannt und in die mitochondriale Außenmembran eingebaut werden, weitestgehend unbekannt. Einer der Gründe, warum dieser Mechanismus wenig charakterisiert ist, ist das Fehlen einer spezifischen Methode für die Kontrolle der Membranintegration.

Um diesen Mechanismus zu verstehen, wurde deshalb in dieser Arbeit eine spezifische Methode entwickelt, mit der man die Insertion von Fis1 verfolgen kann. Das Modellprotein Fis1 ist ein Bestandteil der mitochondrialen Außenmembran und vermittelt die Teilung von Mitochondrien. Eine korrekte Insertion konnte mit Hilfe des sulfhydrylspezifischen Reagenz 4-Acetamido-4'-[(iodoacetyl)amino]stilben-2,2'-disulfonsäure (IASD) und einer Fis1-Variante mit einem einzigen Cysteinrest im Transmembransegment beobachtet werden. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass weder *in vivo* noch *in vitro* die Deletion der Importrezeptoren Tom20 und Tom70 die Insertion von Fis1 beeinflussten. Ferner beeinträchtigten Mutationen, bzw. Deletionen des TOM-Kernkomplexes die Insertion von Fis1 nicht. Auch die Komponenten des TOB-Komplexes spielen beim Membraneinbau keine Rolle.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass Fis1 in die Membran von Lipidvesikeln integriert. Die Außenmembran von Mitochondrien besitzt den niedrigsten Ergosterolgehalt aller Membranen in der Zelle, die an das Cytosol angrenzen. In Einklang hiermit war die Membraninsertion in Lipidvesikel mit erhöhtem Ergosterolgehalt signifikant reduziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Schlussfolgerung nahe, dass keine der bekannten Importkomponenten an der Membranintegration von Fis1 beteiligt sind. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass noch nicht identifizierte cytosolische Faktoren, die Fis1 zu den Mitochondrien bringen, an diesem Mechanismus beteiligt sein könnten. Außerdem könnte ein bisher unbekanntes Protein, das in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert ist, die Insertion von Fis1 vermitteln. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass Fis1 über einen bisher unbekanntem Mechanismus in die mitochondriale Außenmembran integriert wird.

Die Bedeutung der spezifischen Lipidzusammensetzung der Membran für diesen Prozess lässt den Lipiden eine neue Rolle für die Biogenese mitochondrialer Proteine zukommen.

6. Literatur

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., und Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.
- Abell, B.M., Jung, M., Oliver, J.D., Knight, B.C., Tyedmers, J., Zimmermann, R. und High, S. (2003). Tail-anchored and signal-anchored proteins utilize overlapping pathways during membrane insertion. *J. Biol. Chem.* 278, 5669-5678.
- Abell, B.M., Pool, M.R., Schlenker, O., Sinning, I. und High, S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J.* 23, 2755-2764.
- Abell, B.M., Rabu, C., Leznicki, P., Young, J.C. and High, S. (2007). Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J. Cell Sci.* 120, 1743-1751.
- Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M., und Wood, N.W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 7, 207-219.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W., und Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 147, 959-968.
- Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W. und Rapaport, D. (2005). Signal-anchored Proteins Follow a Unique Insertion Pathway into the Outer Membrane of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 48-53.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S., und Wissinger, B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 26, 211-5.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D.P., Lisowsky, T., und Tokatlidis, K. (2005). Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 353, 937-944.
- Allen, R., Egan, B., Gabriel, K., Beilharz T., und T. Lithgow. (2002). A conserved proline residue is present in the transmembrane-spanning domain of Tom7 and other tailanchored protein subunits of the TOM translocase. *FEBS Lett.* 514, 347-350.
- Altmann, K., und Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 16, 5410-5417.
- Armstrong, L.C., Komiya, T., Bergman, B.E., Mihara, K., und Bornstein, P. (1997). Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion, *J. Biol. Chem.* 272, 6510-6518.
- Atencio, D.P., und Yaffe, M.P. (1992). MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol. Cell Biol.* 1, 283-91
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., und Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: role of TIM complexes. *Trends Cell Biol* 10, 25-31.
- Bauer M.F., Sirrenberg C, Neupert W und Brunner M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell.* 87, 33-41.

- Beddoe, T., und Lithgow, T. (2002). Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592, 35-39.
- Beilharz, T., Egan, B., Silver, P.A., Hofmann, K. und Lithgow, T. (2003). Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8219-8223.
- Bevis, B.J., und Glick, B.S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* 20, 83-87.
- Birnboim, H.C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., und Fink, G.R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., und Lithgow, T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J* 14, 6318-6326.
- Borgese, N., Brambillasca, S. und Colombo, S. (2007). How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 368-375.
- Borgese, N., Colombo, S., und Pedrazzini, E., (2003). The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J. Cell Biol.* 161, 1013-1019.
- Borgese, N., Gazzoni, I., Barberi, M., Colombo, S. und Pedrazzini, E. (2001). Targeting of a tail-anchored protein to endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane by independent but competing pathways. *Mol. Biol. Cell* 12, 2482-2496.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M. und Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* 175, 767-777.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarow, M., Hegde, R.S. und Borgese, N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J.* 24, 2533-2542.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruft, V., und Schmitz, U.K. (1992). The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* 11, 3219-3227.
- Braun H.P. und Schmitz U.K. (1999). The mitochondrial processing peptidase. *Planta* 209, 267-74
- Brix, J., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22 and Tom70. *J Biol Chem* 272, 20730-20735.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., und Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* 274, 16522-16530.

- Caplan, A.J., Cyr, D.M., und Douglas, M.G. (1992). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell*. 71, 1143-55.
- Caplan, A.J., Tsai, J., Casey, P.J., und Douglas, M.G.. (1991). Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 267, 18890-5.
- Chan N.C., Likić V.A., Waller R.F., Mulhern T.D., und Lithgow T. (2006). The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi. *J Mol Biol*. 358, 1010-22.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A.E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Truscott, K.N., Guiard, B., Pfanner, N., und Rehling, P. (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*. 120, 817-29.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J*. 23, 3735-3746.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., und Horwich, A.L., (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*. 337, 620-5.
- Coppock, D.L., und Thorpe, C. (2006). Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid. Redox Signal*. 8, 300-311.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Leverich, E.P., Hwang, D.K., Beverly, K.N., und Koehler, C.M. (2004). The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J. Biol. Chem*. 279, 43744-43751.
- D'Arrigo, A., Manera, E., Longhi, R. und Borgese, N. (1993). The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J. Biol. Chem*. 268, 2802-2808.
- Daum, G., Bohni, P.C., und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13028-13033.
- Davis, A.J., Sepuri, N.B., Holder J., Johnson, A.E., und Jensen, R.E. (2000). Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J. Cell Biol*. 150, 1271-1282.
- Dekker, P.J.T., Martin, F., Maarse, A.C., Bömer, U., Müller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., und Pfanner, N. (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J* 16, 5408-5419.
- Dekker, P.J.T., Ryan, M.T., Brix, J., Müller, H., Hönliger, A., und Pfanner, N. (1998). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: Molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol* 18, 6515-6524.
- De Kroon, A.I.P.M., Koorengel, M.C., Goerdayal, S.S., Mulders, P.C., Janssen, M.J. und De Kruijff, B. (1999). Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Membr. Biol* . 16, 205-211.

- Dembowski, M., Künkele, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W. und Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM Core Complex of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 276, 17679-17685.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., und Lill, R. (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11752-11757.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J.T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M., und Pfanner, N. (1997). Tom5 Functionally Links Mitochondrial Preprotein Receptors to the General Import Pore. *Nature*. 388, 195-200.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., und Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*. 313, 314-318.
- D'Silva, P.R., Schilke, B., Walter, W., und Craig, E.A. (2005). Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 12419-12424.
- Egan, B., Beilharz, T., George, R., Isenmann, S., Gratzner, S., Wattenberg, B. und Lithgow, T. (1999). Targeting of tail-anchored proteins to yeast mitochondria in vivo. *FEBS Lett.* 451, 243-248.
- Eilers, M., und Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* 322, 228-232.
- Emtage, J.L., und Jensen, R.E. (1993). MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol.* 122, 1003-12.
- Endo, T., Yamamoto, H., und Esaki, M. (2003). Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J. Cell Sci.* 116, 3259-3267.
- Endres, M., Neupert, W., und Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* 18, 3214-3221.
- Endo, T., und Kohda, D. (2002). Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1592, 3-14.
- Epand, R.M., Hui, S.W., Argan, C., Gillespie, L.L., und Shore, G.C. (1986). Structural analysis and amphiphilic properties of a chemically synthesized mitochondrial signal peptide. *J Biol Chem* 261, 10017-10020.
- Esaki, M., Shimizu, H., Ono, T., Yamamoto, H., Kanamori, T., Nishikawa, S.I., und Endo, T. (2004). Mitochondrial protein import: Requirement of the presequence elements and TOM components for precursor binding to the TOM complex. *J Biol Chem* 279, 45701-45707.
- Fölsch, H., Gaume, B., Brunner, M., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1998). C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J.* 17, 6508-6515.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 15, 479-487.
- Fransson, A., Ruusala, A., und Aspenström, P. (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 6495-6502.

- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., und Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to ER. *J Cell Biol* 93, 97-102.
- Fujiki, M., und Verner, K. (1991). Coupling of protein synthesis and mitochondrial protein import in a homologous yeast *in vitro* system. *J. Biol. Chem.* 266, 6841-6847.
- Fujiki, M., und Verner, K. (1993). Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast: Evidence for cotranslational import *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 268, 1914-1920.
- Gabriel, K., Buchanan, S.K., und Lithgow, T. (2001). The alpha and beta: protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. *Trends Biochem. Sci.* 26, 36-40.
- Gabriel, K., Milenkovic, D., Chacinska, A., Müller, J., Guiard, B., Pfanner, N., und Meisinger C. (2007). Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol.* 365, 612-620
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F. und Daum, G. (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 214-220.
- Gakh, O., Cavadini, P., und Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592, 63-77.
- Gärtner, F., Bomer, U., Guiard, B., und Pfanner, N. (1995). The sorting signal of cytochrome b(2) promotes early divergence from the general mitochondrial import pathway and restricts the unfoldase activity of matrix Hsp70. *EMBO J.* 14, 6043-6057.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N., und Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell.* 111, 507-518.
- Geissler, A., Rassow, J., Pfanner, N., und Voos, W. (2001). Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix Hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol Cell Biol.* 21, 7097-7104.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., und Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* 164, 19-24.
- Gietz, D., Jean, A.S., Woods, R.A., und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acid Res* 20, 1425.
- Glick, B.S., Beasley, E.M., und Schatz, G. (1992a). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 17, 453-459.
- Glick, B.S., Wachter, C., und Schatz, G. (1992b). The energetics of protein import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1101, 249-51.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R.E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S.D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G., und Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* 129, 25-34.
- Gray, M. W., Burger, G., und Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gunter, T.E., Yule, D.I., Gunter, K.K., Eliseev, R.A., und Salter, J.D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* 567, 96-102.

- Habib, S.J., Vasiljev, A., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Multiple functions of tail-anchor domains of mitochondrial outer membrane proteins. *FEBS Lett.* 555, 511-515.
- Habib, S.J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem.* 280, 6434-6440.
- Habib S.J., Waizenegger T, Niewianda A, Paschen S.A., Neupert W, und Rapaport D. (2007). The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *J Cell Biol.* 176, 77-88.
- Hallermayer, G. und Neupert, W. (1974). Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of *Neurospora crassa*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 355, 279-88.
- Hammen, P.K., Gorenstein, D.G., und Weiner, K. (1996). Amphiphilicity determines binding properties of three mitochondrial presequences to lipid surface. *Biochemistry.* 35,3772-3781.
- Harkness, T. A., Nargang, F.E., van der Klei, I., Neupert, W., und Lill, R. (1994). A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol* 124, 637-648.
- Harmey, M.A., Hallermayer, G., Korb, H., und Neupert, W. (1977). Transport of cytoplasmically synthesized proteins into mitochondria in a cell-free system from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 81, 533-544.
- Hartl, F.U., und Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.
- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B., und Neupert, W. (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell.* 51, 1027-1037.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G., und Lithgow, T. (1996). The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *EMBO J* 15, 1231-1237.
- Haucke, V., Lithgow, T., Rospert, S., Hahne, K., und Schatz, G. (1995). The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. *J Biol Chem* 270, 5565-5570.
- He, S., und Fox, T.D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* 8, 1449-1460.
- Heim, R., und Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6, 178-182.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1998). Oxa1p, an essential component of the novel N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W., und Stuart, R.A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* 20, 1281-1288.
- Herrmann, J.M., und Hell, K. (2005). Chopped, trapped or tacked - protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 30, 205-211.

- Herrmann, J. M., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear encoded Oxa1p. *EMBO J* 16, 2217-2226.
- High, S. und Abell, B. M. (2004). Tail-anchored protein biosynthesis at the endoplasmic reticulum: the same but different. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 659-662.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., und Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature*. 395, 516-521.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brüttsch, H., und Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J* 9, 3191-3200.
- Hines, V., und Schatz, G. (1993). Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p. *J Biol Chem* 268, 449-454.
- Hofhaus, G., Lee, J.E., Tews, I., Rosenberg, B., und Lisowsky, T. (2003). The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur. J. Biochem. / FEBS* 270, 1528-1535.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Baiker, K., Hell, K., und Bauer, M.F. (2005). Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J. Mol. Biol.* 353, 517-528.
- Holroyd, C., und Erdmann, R. (2001). Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett* 501, 6-10.
- Honlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J* 15, 2125-2137.
- Hoogenraad N.J., Ward L.A., Ryan, M.T. (2002). Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 97-105
- Hoppins, S.C., und Nargang, F.E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 12396-12405.
- Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellmann, I., und Rosenberg, L.E. (1985). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J* 4, 1129-1135.
- Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., und Schatz, G. (1984). The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* 178, 306-310.
- 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.
- Jarvis, J.A., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Craik, D.J., und Hoj, R.B. (1995). Solution structure of the acetylated and noncleavable mitochondrial targeting signal of rat chaperonin 10. *J Biol Chem.* 270, 1323-1331.

- Jensen, R.E., und Dunn, C.D. (2002). Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* 1592, 25-34.
- Jensen, R.E. und Johnson, A.E. (2001). Opening the door to mitochondrial protein import. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1008–1010.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., und Stuart, R.A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* 22, 6438-6447.
- Jiang, X., und Wang, X. (2004). Cytochrome *c*-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73, 87-106.
- Káldi, K., Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W., und M. Brunner, M. (1998). Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix targeted preproteins. *EMBO J.* 17, 1569-1576.
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M., und Mihara, K. (2000). Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 151,277-288.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neupert, K., Stein, R., und Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 160, 53-64.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W., und Douglas, M.G. (1993). Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J.* 12, 3023-3034.
- Kellems, R.E., Allison, V.F. und Butow, R.A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 65, 1-14.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S., und Jensen, R.E. (1997). The Tim54p Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 139, 1663-1675.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B., und Jensen, R.E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 11, 103-116.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I., Pfanner, N., und Neupert, W. (1993). The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* 74, 483-492.
- Kim, P.K., Annis, M.G., Dlugosz, P.J., Leber, B. und Andrews, D.W. (2004). During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol. Cell* 14, 523-529.
- Knox, C., Sass, E., Neupert, W. und Pines, O. (1998). Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 25587-25593.
- Kobayashi, S., Tanaka, A. und Fujiki, Y. (2007). Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp. Cell Res.* 313, 1675-1686.
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N.A., McNiven, M.A. und Schrader, M. (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 5077-5086.
- Koehler, C.M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 309–335.

- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J., und Schatz, G. (1998). Import of Mitochondrial Carriers Mediated by Essential Proteins of the Intermembrane Space. *Science* 279, 369-373.
- Koehler, C. M., Merchant, S., und Schatz, G. (1999b). How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* 24, 428-432.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., und Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 20, 1187-1193.
- 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.
- Kozjak-Pavlovic, V., Ross, K., Benlasfer, N., Kimmig, S., Karlas, A., und Rudel, T. (2007). Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis, *EMBO Rep.* 8, 576-582.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., und Voos, W. (2007) A cooperative action of the ATP - dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol Cell Biol.* 27, 411-425.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E., und Pfanner, N. (2001). Biogenesis of the major mitochondrial outer membrane protein porin involves a complex import pathway via receptors and the general import pore. *J. Cell Biol.* 152, 289-300.
- Krishnasastri, M., Walker, B., Braha, O. und Bayley, H. (1994). Surface labeling of key residues during assembly of the transmembrane pore formed by staphylococcal alpha hemolysin. *FEBS Lett.* 356, 66-71.
- Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M., und Pfanner, N. (1994). The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *Febs Lett.* 349, 222-8.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., und Dalbey, R.E. (2003). The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* 13, 510-516.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., und Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009-1019.
- Kyshe-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-207.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lan, L., Isenmann, S. und Wattenberg, B.W. (2000). Targeting and insertion of C-terminally anchored proteins to the mitochondrial outer membrane is specific and saturable but does not strictly require ATP or molecular chaperones. *Biochem. J.* 349, 611-621.

- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1999). The DNA helicase, Hml1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J. Biol. Chem.* 274, 20937-20942.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G., und Koehler, C.M. (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J* 18, 4816-4822.
- Lill, R., und Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trend Biochem Sci* 25, 352-356.
- Lin, M.T., und Beal, M.F. (2006). Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nature Medicine* 12, 1241-1243.
- Lithgow, T., Glick, B.S., und Schatz, G. (1995). The protein import receptor of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 20, 98-101.
- Lithgow, T., Junne, T., Wachter, C., und Schatz, G. (1994). Yeast mitochondria lacking the two import receptors Mas20p and Mas70p can efficiently and specifically import precursor proteins. *J Biol Chem* 269, 15325-15330.
- Lutz, T., Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2003). Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* 22, 4400-4408.
- Maarse, A.C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N., und Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *Febs Lett.* 349, 215-21.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., und C. Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* 3, 159-164.
- Martin, J., Mahlke, K., und Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. *J Biol Chem.* 266, 18051-18057.
- Matouschek, A., Pfanner, N., und Voos, W. (2000). Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* 1, 404-410.
- Mayer, M. P. (2004). Timing the catch. *Nat Struct Mol Biol.* 11, 6-8.
- Mayer, A., Lill, R., und Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J. Cell Biol.* 121, 1233-1243.
- Mayer, A., Neupert, W., und Lill, R. (1995). Mitochondrial protein import: Reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell* 80, 127-137.
- McBride, H.M., Millar, D.G., Li J.M., und Shore, G.C. (1992). A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 119, 1451-7.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R. and Ryan, M.T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* 361, 462-469.
- Meier, S., Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2004). Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J Biol Chem.* 280, 7777-7785.

- Meineke, B., Engl, G., Kemper, C., Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H. und Rapaport, D. (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett.*, 582, 855-60.
- Meisinger, C., Ryan, M. T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R., und Pfanner, N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol* 21, 2337-2348.
- Meisinger, C., Sommer, T., und Pfanner, N. (2000). Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem* 287, 339-342.
- Melton, D., Krieg, P., Rebagliati, M., Maniatis, T., Zinn, K., und Green, M. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl Acid Res* 12, 7035-7056.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059-1069.
- Mihara, K., und Omura, T. (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria - the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol.* 6, 104-108.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B. Pfanner, N., Meisinger, C.(2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability, *J.Biol.Chem.* 279, 22781-22785.
- Millar, D.G., und Shore, G.C. (1994). Mitochondrial Mas70p signal anchor sequence. Mutations in the transmembrane domain that disrupt dimerization but not targeting or membrane insertion. *J Biol Chem* 269, 12229-12232.
- Moczko, M., Bömer, U., Kübrich, M., Zufall, N., Hönlinger, A., und Pfanner, N. (1997). The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. *Mol Cell Biol* 17, 6574-6584.
- Moczko, M., Dietmeier, K., Sollner, T., Segui, B., Steger, H.F., Neupert, W., und Pfanner, N. (1992). Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 310, 265-268.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N., und Ryan, M.T. (2001). Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* 8, 361-370.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* 316, 657-666.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W., und K. Hell, K. (2003a). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22, 816-825.
- Mokranjac D., Popov-Celeketić D., Hell K. und Neupert W. (2005a). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem.* 280, 23437-40.
- Mokranjac, D., Sichtung, M., Neupert, W., und Hell, K. (2003b). Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22, 4945-4956.

- Mokranjac, D., Sichtung, M., Popov-Celeketic, D.A., Berg, A., Hell, K., und W. Neupert, W. (2005b). The import motor of the yeast mitochondrial TIM23 preprotein translocase contains two different J proteins, Tim14 and Mdj2. *J Biol Chem.* 280, 31608-14.
- Mori M, Terada K. (1998). Mitochondrial protein import in animals. *Biochim. Biophys. Acta* 1403, 12–27.
- Motz, C., Martin, H., Krimmer, T. und Rassow, J. (2002). Bcl-2 and Porin Follow Different Pathways of TOM-dependent Insertion into the Mitochondrial Outer Membrane. *J. Mol. Biol.* 323, 729-738.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., und Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated Mitochondrial Fission is a Multi-step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151, 367-379.
- Mühlenhoff, U., und Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459, 370-382.
- Naoe, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H., und Endo, T. (2004). Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 279, 47815-47821.
- 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.
- Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1999). Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein. *EMBO J.* 18, 2991-3006.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 863-917.
- Neupert, W., und Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 555-565.
- Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–749.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. und Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265-8.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W., und Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.* 21, 3659–3671.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W., und Hartl, F.U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature.* 341, 125-130.
- Paschen, S.A. (2004). Biogenese von mitochondrialen β -Barrel-Membranproteinen - Identifizierung des TOB-Komplexes. *Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- Paschen, S.A., und Neupert, W. (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life.* 52, 101-12.
- Paschen, S.A., Neupert, W. und Rapaport, D. (2005). Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 30, 575-582.

- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., und W. Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*. 426, 862-866.
- Pelham, H.R.B., und Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67, 247-256.
- Pfanner, N., und Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 339-349.
- Pfanner, N., und Neupert, W. (1987). Distinct steps in the import of the ADP/ATP carrier into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262, 7528-7536.
- Pfanner, N., Tropschug, M., und Neupert, W. (1987). Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell* 49, 815-823.
- Popov-Čeleketić D., Mapa K., Neupert W., und Mokranjac D. (2008). Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J. in press*
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., et al. (2004). Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol.* 2:e160.
- Puccio, H., und Koenig, M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet.* 9,887-892.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T., und Schatz, G. (1993). Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J* 12, 4115-4123.
- Rapaport, D. (2002). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem. Sci.* 27, 191-197.
- Rapaport, D. (2003). How to find the right organelle-Targeting signals in mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO Rep.* 4, 948-952.
- Rapaport, D., Künkele, K.P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W., und Lill, R. (1998a). Dynamics of the TOM Complex of Mitochondria during Binding and Translocation of Preproteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5256-5262.
- Rapaport, D., und Neupert, W. (1999). Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* 146, 321-331.
- Rehling, P., Brandner, K., und Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 519–530.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., und Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science.* 299, 1747-1751.
- Reichert, A.S., und Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Robinson, C., Thompson, S. J., und Woolhead, C. (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic* 2, 245-251.

- Roise, D., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., und Schatz, G. (1986). A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *EMBO J* 5, 1327-1334.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J. H., Allison, D.S., und Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J* 7, 649-653.
- Ryan, K.R., und Jensen, R.E. (1993). Mas6p can be cross-linked to an arrested precursor and interacts with other proteins during mitochondrial protein import. *J Biol Chem.* 268, 23743-23746.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, 2nd edn (Cold Spring Harbor, CSH Laboratory Press).
- Sato, T., Esaki, M., Fernandez, J.M., und Endo, T. (2005) Comparison of the proteinunfolding pathways between mitochondrial protein import and atomic-force microscopy measurements. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 17999–18004
- Schatz, G. (1997). Just follow the acid chain. *Nature* 388, 121-122.
- Schleiff, E., Eichacker, L.A., Eckart, K., Becker, T., Mirus, O., Stahl, T., und Soll, J. (2003). Prediction of the plant beta-barrel proteome, a case study of the chloroplast outer envelope. *Protein Sci.* 12, 748-759.
- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N., und Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J Biol Chem* 269, 11893-11901.
- Schleiff, E., Silvius, J.R., und Shore, G.C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J Cell Biol* 145, 973-978.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogel, 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.
- Schnell, D. J., und Hebert, D. N. (2003). Protein translocons. Multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112, 491-505.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrstnik, C., Eder, S., Daum, G. et al. (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 146, 741-754.
- Schwartz, M.P., und Matouschek, A. (1999). The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 13086-13090.
- Sebald, W., Neupert, W. und Weiss, H. (1979). Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria. *Methods Enzymol.*, 55, 144-148.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K. und Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF- κ B and IRF3. *Cell* 122, 669-682.
- Setoguchi, K., Otera, H. und Mihara, K. (2006). Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* 25, 5635-5647.
- Shariff, K., Ghosal, S., und Matouschek, A. (2004). The force exerted by the membrane potential during protein import into the mitochondrial matrix. *Biophys J.* 86, 3647–3652.

- Sherman, E.L., Go, N.E., und Nargang, F.E. (2005). Functions of the small proteins in the TOM complex of *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*. 16, 4172-82.
- Shore, G.C., McBride, H.M., Millar, D.G., Steenaart, N.A.E. und Nguyen, M. (1995). Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem*. 227, 9-18.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schönfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, et al. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 13207–13212.
- Sikorski, R.S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W., und Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W., und Brunner, M. (1998). Zinc finger-like proteins Tim10/Mrs11p and Tim12/Mrs5p mediating import of carrier proteins into mitochondria. *Nature* 391, 912-915.
- Smagula, C.S., und Douglas, M.G. (1988). ADP/ATP carrier of *S. cerevisiae* contains a mitochondrial import signal between amino acids 72 and 111. *J. Cell. Biochem*. 36, 323- 328.
- Soll, J., und Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 198-208.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N., und Neupert, W. (1989). MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* 59, 1061-1070.
- Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W., und Pfanner, N. (1992). Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature* 355, 84-87.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K.P., Nussberger, S., Neupert, S., und Rapaport, D. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J* 19, 4895-4902.
- Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23, 2239-2250.
- Stefanovic, S. und Hegde, R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159.
- Stein, I., Peleg, Y., Even-Ram, S. und Pines, O. (1994). The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 14, 4770-4778.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2007). Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J. Cell Biol*. 179, 881-893.
- Suissa, M., und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondriabound cytoplasmic polysomes. *J. Biol. Chem*. 257,13048-13055.

- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* 22, 6448-6457.
- Tamm, L.K., Arora, A., und Kleinschmidt, J.H. (2001). Structure and Assembly of β -barrel Membrane Proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 32399-32402.
- Terziyska, N., Grumbt, B., Bien, M., Neupert, W., Herrmann, J.M., und Hell, K. (2007). The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* 581, 1098-1102.
- Terziyska, N., Lutz, T., Kozany, C., Mokranjac, D., Mesecke, N., Neupert, W., Herrmann, J.M., und Hell, K. (2005). Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* 579, 179-184.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 267-271.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Truscott, K.N., Kovermann, Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N., und Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1074-1082.
- Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Müller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P., und Pfanner, N. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J. Cell Biol.* 163, 707-713.
- van der Laan, M., Chacinska, A., Lind, M., Perschil, I., Sickmann, A., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N., und Rehling, P. (2005). Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol Cell Biol.* 25, 7449-58.
- van der Laan, M., Rissler, M., und Rehling, P. (2006a). Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res.* 6, 849-861.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., *et al.* (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 401, 485-489.
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F.E., Go, N.E., Habib, S.J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S., und Rapaport, D. (2004). Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol. Biol. Cell.* 15, 1445-1458.
- Verner, K. (1993). Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends Biochem. Sci.* 18, 366-371.
- von Heijne, G., Stepphun, J., und Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* 180, 535-545.

- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W., Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* 5, 704-709.
- Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep* 6, 57-62.
- Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W., und Rapaport, D. (2003). Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem* 278, 42064-42071.
- Waltner, M., und Weiner, W. (1995). Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem*. 270, 26311-26317.
- Wattenberg, B. und Lithgow, T. (2001). Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* 2, 66-71.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfish, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*. 424, 565-571.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. und Chacinska, A. (2006). Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Cell* 21, 145-148.
- Wiedemann, N., Pfanner, N., und Ryan, M.T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J* 20, 951-960.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2004b). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 18188-18194.
- Wimley, W.C. (2003). The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol*. 13, 404-411.
- Wolff, A.M., Petersen, J.G., Nilsson-Tillgren, T., und Din, N. (1999). The open reading frame YAL048c affects the secretion of proteinase A in *S. cerevisiae*. *Yeast*. 15, 427-434.
- Wu, Y. und Sha, B. (2006). Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p. *Nat Struct Mol Biol*. 13, 589-93.
- Yoon, Y., und McNiven, M.A. (2001). Mitochondrial division: New partners in membrane pinching. *Curr Biol* 11, 67-70.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., und Endo, T. (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*. 111, 519-528.
- Yano, M., Terada, K., und Mori, M. (2003). AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. *J Cell Biol* 163, 45-56.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J. und McNiven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23, 5409-20.

Young, J.C., Hoogenraad, N.J., und Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112, 41-50.

Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell*. 17, 1436-1450.

Zhang, M., Mileykovskaya, E. und Dowhan, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 29403-8.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. und Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173, 2026-2034.

7. Abkürzungen

α	Anti
Abb.	Abbildung
a. E.	arbiträre Einheiten
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AIP	Arylhydrokarbon-Rezeptor-interagierendes Protein
Alb3	Albino3
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Chaperon
C-	Carboxy-
COX	Cytochrom Oxidase
Δ	Deletion des entsprechenden Gens
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\Psi$	Membranpotenzial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
5-FOA	5-Fluor-Orotsäure
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GIP	generelle Import-/Insertionspore
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazino-N'-2-ethansulfonsäure
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

IASD	(4-Acetamido-4'-[(iodoacetyl)amino]stilben-2,2'-disulfonsäure)
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMP	Innenmembranpeptidase
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- β ,D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Mim	Mitochondrialer Import
MOPS	3-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
MSF	mitochondrialen Import stimulierender Faktor
mt	mitochondrial
N-	Amino-
<i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmunserum
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
Sam	Protein des SAM-Komplexes
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>

<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.</i>	<i>cerevisiae Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat
STI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
Su9	Untereinheit 9 der F _o -Untereinheit der F ₁ F _o -ATPase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TMD	Transmembrandomäne
Tob	Protein des TOB-Komplexes
TOB	Topogenese von mitochondrialen Außenmembran- β - Barrel- Proteinen (<i>topogenesis of mitochondrial outer membrane β-barrel proteins</i>)
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
U	enzymatische Einheiten (<i>units</i>)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
v/v	Volumen pro Volumen
VDAC	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

Ott, M., Norberg, E., Walter, K.M., Schreiner, P., **Kemper, C.**, Rapaport, D., Zhivotovsky, B., und Orrenius, S. (2007). The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. *J Biol Chem.* 282, 27633-27639.

Meineke, B., Engl, G., **Kemper, C.**, Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H. und Rapaport, D. (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett.*, 582, 855-60.

Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S., und Rapaport, D. (2008). The integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require the known import components., *J. Cell Sci.* 121, 1990-1998.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, an dessen Institut diese Arbeit angefertigt wurde und bei dem ich ein hervorragendes wissenschaftliches Umfeld und interessante Gespräche und Seminare erfahren durfte, bedanken.

Bei Frau PD. Dr. Angelika Böttger möchte ich mich für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Doron Rapaport bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine vielfältigen Ideen und Anregungen, sowie seine konstruktive Kritik und Offenheit trugen ganz maßgeblich zur erfolgreichen Zusammenarbeit und zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ich bin ihm auch sehr dankbar, dass ich meine Ideen verwirklichen durfte.

Frau Petra Heckmeyer danke ich für ihre gute Mitarbeit in meinen Projekten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen jetzigen und früheren Kollegen Shukry, Jelena, Astrid, Barbara, Agathe, Sara, Jovana, Gerti, Birthe, Andreja, Dusan, Patrick, Max und Christian bedanken. Sie haben alle zum angenehmen Arbeitsklima beigetragen und für viele schöne Erlebnisse gesorgt.

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

Bei den Leuten der Werkstatt, der Spülküche und dem Tierstall möchte ich mich bedanken. Sie haben mir die Arbeit wesentlich erleichtert.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Margherita bedanken, die mich immer unterstützt und aufgebaut hat, wenn es mit den Versuchen mal nicht so gut gelaufen ist, wie ich das gern gehabt hätte.

Lebenslauf:

Christian Kemper

09.07.1977	Geboren in Gräfelfing bei München
1984-1988	Besuch der Grundschule an der Gotzmannstraße in München
1988-1997	Besuch des Gymnasiums Gröbenzell
1997	Abitur
09/1997-06/1998	Grundwehrdienst bei der Luftwaffe als Sanitätssoldat in Roth und Erding
10/1998-09/1999	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
10/1999-12/2004	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
09/2003-06/2004	Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Charles N. David an der Ludwig-Maximilians-Universität in München am Institut für Zoologie, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie: „Funktion des Phosphatidylserin Rezeptors in Hydra“
seit 02/2005	Dissertation im Labor von Prof Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich, Christian Kemper, versichere, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

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

München, den 24.06.08

Christian Kemper