

**Mitochondriale Biogenese:
Komponenten und Mechanismen
der Proteinsortierung in die Matrix und Innenmembran der
Mitochondrien**

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

von
Frank Baumann

München

2002

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert und Herrn Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, am 11.6.2002

A handwritten signature in blue ink, reading "Frank Baumann". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Dissertation eingereicht am 13.6.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 22.07.2002

Nil tam difficile est, quid quaerendo investigari non possit.

[Terenz]

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktionsweise der Mitochondrien	2
1.2	Mitochondriale Proteine	3
1.3	Proteintransport in Mitochondrien	4
1.3.1	Mitochondriale Importsignale	5
1.3.2	Der Import in die mitochondriale Matrix	7
1.3.3	Der Import in die Innenmembran von Mitochondrien	10
1.4	Membraninsertion und Orientierung von Membranproteinen	13
1.5	Molekulare Chaperone in Mitochondrien	14
1.6	Fragestellung und Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1	Verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	18
2.1.2	Verwendete Plasmide	18
2.1.3	Plasmidreinigung	19
2.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNS	20
2.1.5	Amplifizieren von DNS-Fragmenten mittels „Polymerase-Kettenreaktion“	20
2.1.6	Klonierung von DNS-Fragmenten	21
2.1.6.1	Restriktionsverdau	21
2.1.6.2	Dephosphorylierung von DNS	21
2.1.6.3	Auffüllung von 5'-überstehenden Enden	22
2.1.6.4	Ligation	22
2.1.6.5	Elektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten	22
2.1.6.6	Elution von DNS aus Agarose mit Hilfe eines Gelextraktions-Kits	23
2.1.7	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	23
2.1.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	23
2.1.9	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien mittels Elektroporation	24
2.1.10	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien mittels CaCl ₂	24
2.1.11	Klonierungsstrategien	25
2.2	Hefegenetische Methoden	29
2.2.1	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.3	Herstellung transformationskompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	32
2.2.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels Li-Acetat-Methode	32
2.2.5	Nachweis von Mutationen im Genom von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.3	Proteinchemische Methoden	33
2.3.1	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	33
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.3.3	Coomassiefärbung von Gelen	34
2.3.4	Autoradiographie und Densitometrie	34
2.3.5	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	35
2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	35
2.3.7	Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine <i>in vitro</i>	35
2.3.7.1	Transkription	36
2.3.7.2	Translation in Retikulozytenlysat	36
2.3.7.3	Synthese von Vorstufenproteinen mit TNT©-Lysat-Kit	36
2.3.8	Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung von löslichen mitochondrialen Proteinkomplexen	37
2.3.9	Bestimmung des Faltungszustandes mitochondrial lokalisierter Proteine	38

2.3.9.1	Faltungstest für DHFR der Maus	38
2.3.9.2	Aggregationstest für Var1	38
2.4	Zellbiologische Methoden.....	39
2.4.1	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe.....	39
2.4.2	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> zur Isolation von Mitochondrien	39
2.4.3	Subfraktionierung von Hefezellen	40
2.4.4	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.4.5	Subfraktionierung von Mitochondrien.....	41
2.4.6	Import von Proteinen aus Retikulozytenlysat	42
2.4.7	Mitochondriale Sublokalisierung von <i>in vitro</i> importierten Proteinen.....	42
2.4.7.1	Nachbehandlung von Mitochondrien mit Protease	42
2.4.7.2	Herstellung von Mitoplasten durch osmotischen Schock	43
2.4.8	Herstellung von Translokationsintermediaten mit Methotrexat.....	43
2.4.9	Senkung der ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix.....	43
2.4.10	Bestimmung des Membranpotentials in isolierten Mitochondrien	44
2.4.11	Markierung mitochondrialer Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien	44
	(<i>in organello</i> Translation)	44
2.5	Immunologische Methoden.....	45
2.5.1	Kopplung synthetischer Peptide an Ovalbumin	45
2.5.2	Erzeugung polyklonaler Antiseren.....	45
2.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen („Western Blot“)	46
2.6	Chemikalien und Enzyme	46
2.7	Geräte und sonstige Materialien.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Ecm10 ist ein neues Mitglied der Familie der mitochondrialen Hsp70-Proteine ..	49
3.1.1	Ecm10 ist ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix	50
3.1.2	Untersuchungen zur Funktion von Ecm10.....	52
3.1.2.1	Mutationen in <i>SSC1</i> und <i>ECM10</i> führen zu synthetischen Wachstumsdefekten...	52
3.1.3	Funktionelle Charakterisierung von Ecm10.....	54
3.1.3.1	Ecm10 kann Ssc1 <i>in vivo</i> nicht ersetzen	54
3.1.3.2	Ecm10 kann Ssc1 beim Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix ersetzen.....	57
3.1.3.3	Ecm10 verhindert nicht die Aggregation von Ssc1-3	60
3.1.3.4	Ecm10 bindet an Importintermediate.....	61
3.1.3.5	Ecm10 bindet effizient an Mge1, jedoch nur schwach an Tim44.....	62
3.1.3.6	Ecm10 kann die Faltungsaktivität von Ssc1 nur unvollständig ersetzen	65
3.2	Insertion bitoper Membranproteine.....	69
3.2.1	Sortierung von Mrs2.....	69
3.2.1.1	Mrs2 enthält zwei unabhängige Importsignale.	71
3.2.1.2	Das interne Importsignal wird nicht zur Sortierung von Mrs2 benötigt	74
3.2.1.3	Mrs2 bildet ein lösliches Sortierungsintermediat.....	76
3.2.1.4	Die Membraninsertion von Mrs2 ist unabhängig von Oxa1 und Mba1.....	78
3.2.2	Sortierung von Yta10	80
3.2.2.1	Yta10 bildet eine in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Sortierungszwischenstufe.....	81
3.2.2.2	Die Bedeutung von Oxa1 für die Insertion von Yta10 in die Innenmembran	83
3.2.2.3	Die Insertion von Yta10 ist abhängig vom Membranpotential $\Delta\psi$	86

4	Diskussion	88
4.1	Proteinfaltung und Chaperone.....	88
4.1.1	Ecm10 als Mitglied der Hsp70-Familie	88
4.1.2	Struktureller Vergleich zwischen Ecm10 und Ssc1	90
4.1.3	Funktioneller Vergleich zwischen Ecm10 und Ssc1	92
4.1.4	Ausblick	95
4.2	Sortierung polytooper Innenmembranproteine	96
4.2.1	Der konservative Sortierungsweg bitoper Innenmembranproteine.....	96
4.2.2	Welche Komponenten vermitteln die Translokation von Intermembranraumdomänen?.....	97
4.2.3	Woher kommt die Energie für die Insertion?.....	99
4.2.4	Gibt es ein allgemeines Prinzip für die Insertion von Innenmembranproteinen?	100
4.2.5	Fazit und Ausblick	102
5	Zusammenfassung	104
6	Literatur	105

A _{xyz}	Absorption bei xyz nm
Abb.	Abbildung
AM	Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	american tissue culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
CC ₁ HL	Cytochrom c ₁ -Haemlyase
CCPO	Cytochrom c-peroxidase
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
COX	Cytochrom c-oxidase
<i>COXII</i>	Untereinheit 2 der Cytochrom c-oxidase
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
<i>DLDI</i>	D-Laktatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonikleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>ECM10</i>	mitochondriales Hsp70
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Feuchtgewicht
5-FOA	5-Fluor-Orotsäure
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein

IM	Innenmembran
IMR	Intermembranraum
LB	Medium nach Luria und Bertani
Mge1	Interaktionsfaktor von Ssc1
min	Minute
MIP	mitochondriale Intermediat-Peptidase
MOPS	n-Morpholinoethansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
mRNS	Boten-RNS
Mrs2	Mg ²⁺ -Transporter der mitochondrialen Innenmembran
mt	mitochondrial
MTSs	mitochondriale Zielsequenzen
NAD	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nuc	kernkodiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	³⁵ Schwefelisotop
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	Signalerkennungspartikel
<i>SSC1</i>	mitochondriales Hsp70
<i>SSQ1</i>	mitochondriales Hsp70
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor

Su9	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATPase von <i>N. crassa</i>
Su9ATPase	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATPase von <i>N. crassa</i>
t	Zeit
TBS	mit Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIM22-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TIM23-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
<i>TIM44</i>	Untereinheit der TIM23 Translokase
TOM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
ts	temperatursensitiv
U	Einheiten
Val	Valinomycin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose-Medium
YPG	Hefeextrakt/Pepton/Glycerin-Medium
YPGal	Hefeextrakt/Pepton/Galaktose-Medium
Yta10	AAA-Protease der mitochondrialen Innenmembran
$\Delta\psi$	Membranpotential

1 Einleitung

Zur Organisation und Koordination verschiedener biologischer und chemischer Prozesse sind eukaryotische Zellen in verschiedene Reaktionsräume (Kompartimente) unterteilt. Dabei werden diese Reaktionsräume oder Organellen durch Lipidmembranen voneinander abgegrenzt. Diese Membranen stellen sowohl für Makromoleküle, als auch für Ionen eine Barriere dar. Unterschiedliche chemische Milieus in den Organellen erhöhen die Bandbreite möglicher Reaktionen innerhalb einer Zelle. In eukaryotischen Zellen unterscheidet man zwischen Organellen, die nur von einer Membran umgeben sind, wie das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Peroxisomen und die Lysosomen, und solchen, die von zwei Membranen abgegrenzt werden, wie der Zellkern, die Chloroplasten und die Mitochondrien.

Der überwiegende Teil der Proteine der verschiedenen Zellorganellen wird von Genen im Zellkern kodiert und an cytosolischen Ribosomen synthetisiert. Die so entstehenden Polypeptidketten können zum einen noch während ihrer Synthese (kotranslational) oder erst nach Abschluss ihrer Synthese (posttranslational) an die ihnen vorbestimmte Stelle in ihrem Zielkompartiment transportiert werden. Daher besitzen Organellen spezifische Transportsysteme (Translokasen), die den korrekten Transport von Proteinen in das Organell sicherstellen. Die Mechanismen der Proteintranslokation in die verschiedenen Organellen weisen einige Gemeinsamkeiten auf (Übersichtsartikel: Rapoport *et al.*, 1996; Johnson, 1997; Neupert, 1997; Klösgen, 1997; Lübeck *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1991; Wickner und Leonard, 1996). Zu transportierende Proteine enthalten ein für das jeweilige Kompartiment spezifisches Erkennungssignal. Diese Erkennungssignale werden von Rezeptoren an der Oberfläche des jeweiligen Zellorganells erkannt, was in der Folge zu einer Translokation der Polypeptidkette oder Teilen von ihr über oder in die Lipidmembran des betreffenden Organells führt. Dieser Transport erfordert häufig eine entfaltete Konformation des Proteins (Eilers und Schatz, 1986; Rassow *et al.*, 1990; Arkowitz *et al.*, 1993; Schlenstedt *et al.*, 1994). Im Falle der kotranslationalen Translokation in das ER geschieht dies, indem die naszierende Kette direkt in die Translokase inseriert wird, ohne dass sie vorher die Gelegenheit zur Faltung hatte. Werden Polypeptidketten posttranslational über Membranen transportiert, stabilisieren meist Hilfsproteine wie Chaperone (siehe 1.5.) einen translationskompetenten, entfalteten Zustand (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Caplan *et al.*, 1992). Die Translokasen sind meist hochmolekulare Proteinkomplexe (Brundage *et al.*, 1990; Kiebler *et*

al., 1990; Waegemann und Soll, 1991; Deshaies *et al.*, 1991 Berthold *et al.*, 1995; Dekker *et al.*, 1997). Der posttranslationale Translokationsprozess benötigt eine treibende Kraft, die in Form der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten, eines Membranpotentials, eines pH-Gradienten oder der Bindung von Cofaktoren oder der Stabilisierung durch die Proteinfaltung auf der trans-Seite der Membran vorliegen kann. Viele der Erkennungssignale werden während oder nach der Translokation abgespalten. Chaperone innerhalb der Zellorganellen sind für die endgültige Faltung der importierten Polypeptidketten sowie auch für deren Einbau in höhermolekulare Komplexe verantwortlich (Craig *et al.*, 1993).

1.1 Aufbau und Funktionsweise der Mitochondrien

Mitochondrien sind in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommende Organellen und stammen ähnlich wie Chloroplasten von Eubakterien ab, die vor etwa einer Milliarde Jahren von eukaryotischen Zellen aufgenommen wurden (zur Übersicht siehe Herrmann, 1997; Gray *et al.*, 1999). Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei den Vorläufern der Mitochondrien um Vertreter der Gattung der α -Purpurbakterien (Whatley, 1981), zu denen z. B. die phototrophen Bakterien der Gattung *Rhodobacter* oder das aerobe Bakterium *Paracoccus denitrificans* gehören. Daraus ergibt sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen diesen Bakterien und Mitochondrien in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung und Funktionalität.

Die Mitochondrien enthalten zwei Lipidmembranen, die diese in vier Subkompartimente unterteilen: die Matrix, die sie umgebende Innenmembran und den Intermembranraum, der wiederum von der Außenmembran begrenzt wird. Die Außenmembran enthält das porenbildende, integrale Membranprotein Porin, das sie für kleinere Moleküle bis zu einer Größe von ca. 2 kDa durchlässig macht. Dagegen ist die Innenmembran völlig undurchlässig für Ionen und Makromoleküle, die nur mit Hilfe spezieller Transportproteine durch die Membran gelangen können.

Die mitochondriale Innenmembran bildet lange Ausstülpungen in die Matrix, die sogenannten Cristae, die unter anderem die Proteine der mitochondrialen Atmungskette enthalten. Daneben bilden einige Bereiche der Innenmembran die so genannte Grenzmembran, die sich in unmittelbarer Nähe zur Außenmembran befindet und von dieser teilweise nur ca. 3-5 nm entfernt ist. In diesen Bereichen können während des Imports von Proteinen aus dem Zytosol Kontaktstellen ausgebildet werden, die im Elektronenmikroskop sichtbar sind.

Mitochondrien werden nicht *de novo* synthetisiert. Vielmehr vermehren sie sich in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen autonom durch Abschnürungen aus bereits existierenden Organellen.

Sie spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen des Stoffwechsels, zum Beispiel bei der Hämsynthese, dem Fettsäureabbau und den Reaktionen der Harnstoffsynthese. Die Hauptfunktion der Mitochondrien besteht jedoch in der Bereitstellung von ATP und der damit gekoppelten Endoxidation von Substraten. Zunächst erfolgt im Citratzyklus die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Die dabei freigesetzten Elektronen werden auf NAD^+ oder FAD übertragen. Mit Hilfe des dabei gebildeten NADH bzw. FADH_2 werden die Elektronen dann in die Atmungskette eingeschleust, in deren Verlauf Protonen von der Matrixseite über die Innenmembran in den Intermembranraum gepumpt werden und auf diese Weise ein Membranpotential ($\Delta\psi$) generieren.

Neben ihrer wichtigen Funktion für den Stoffwechsel der Zelle kommt den Mitochondrien eine bedeutende Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltods, der sogenannten Apoptose zu (zur Übersicht siehe Bernardi *et al.*, 1999; Bernardi *et al.*, 2001).

Ihre große Bedeutung für die Zelle und den gesamten Organismus wird nicht zuletzt auch durch das Auftreten zahlreicher Erkrankungen, die auf mitochondriale Fehlfunktionen zurückzuführen sind, unterstrichen (zur Übersicht siehe Larsson und Luft, 1999; Wallace, 1999).

1.2 Mitochondriale Proteine

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, das nur für wenige Proteine kodiert. So werden in *Saccharomyces cerevisiae* lediglich die in Tab. 1 angegebenen 8 Proteine vom mitochondrialen Genom kodiert:

Tab. 1: Mitochondrial kodierte Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Gen	Kodiertes Protein	Lokalisation
<i>ATP6</i>	F _O -ATP-Synthase Untereinheit 6 (Komplex V)	Innenmembran
<i>ATP8</i>	F _O -ATP-Synthase Untereinheit 8 (Komplex V)	Innenmembran
<i>ATP9</i>	F _O -ATP-Synthase Untereinheit 9 (Komplex V)	Innenmembran
<i>COX1</i>	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit I (Komplex IV)	Innenmembran
<i>COX2</i>	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit II (Komplex IV)	Innenmembran
<i>COX3</i>	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit III (Komplex IV)	Innenmembran
<i>COB1</i>	Cytochrom b Untereinheit des Cytochrome bc1-Komplexes (Komplex III)	Innenmembran
<i>VARI1</i>	Untereinheit der kleinen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms	Matrix

Der überwiegende Teil der mitochondrialen Proteine wird im Zellkern kodiert und muss in die Mitochondrien importiert, in das entsprechende Subkompartiment sortiert und korrekt in die entsprechenden Proteinkomplexe assembliert werden. Dabei werden alle mitochondrial kodierten Proteine zusammen mit den kernkodierten Untereinheiten in gemeinsame Komplexe assembliert.

1.3 Proteintransport in Mitochondrien

Der Import kernkodierter Proteine in Mitochondrien stellt einen komplizierten Prozess dar. Er umfasst die spezifische Erkennung mitochondrialer Proteine nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen, den Transport dieser Proteine in die Mitochondrien und die korrekte Sortierung in die entsprechenden Subkompartimente innerhalb der Mitochondrien.

Diese Aufgabe wird durch ein Zusammenspiel mehrerer Proteinkomplexe erfüllt: (vgl. Abb. 1) des TOM-Komplexes (**T**ranslocase of the **O**uter **M**itochondrial membrane) in der Außenmembran, des TIM23-Komplexes (**T**ranslocase of the **I**nnner **M**itochondrial membrane) und des TIM22-Komplexes in der Innenmembran. Letzterer interagiert mit den löslichen Intermembranraumproteinen Tim9, Tim10 und Tim12 bzw. Tim8 und Tim13.

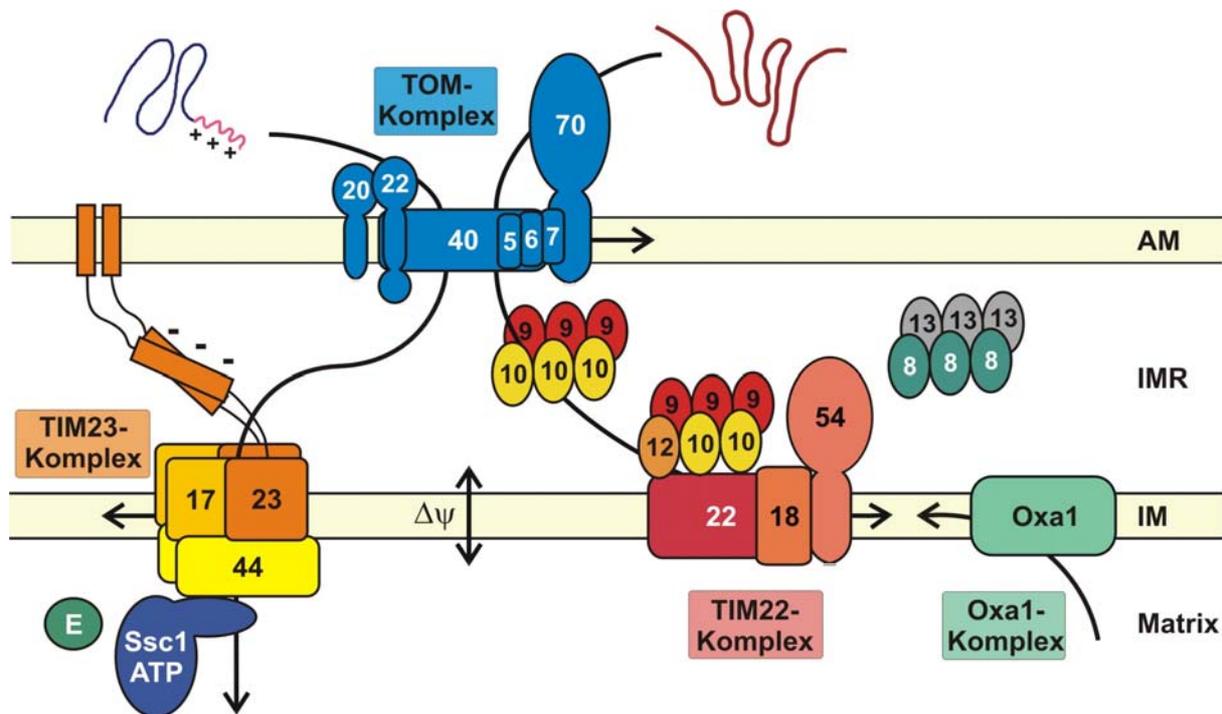


Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Translokasen.

Beschreibung siehe Text. TOM-Komplex: 70, Tom70; 40, Tom40; 22, Tom22; 20, Tom20; 7, Tom7; 6, Tom6; 5, Tom5; TIM23-Komplex: 17, Tim17; 23, Tim23; 44, Tim44; E, Mge1; TIM22-Komplex: 8, Tim8; 9, Tim9; 10, Tim10; 12, Tim12; 13, Tim13; 18, Tim18; 22, Tim22; 54, Tim54; Oxa1; IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum; AM, Außenmembran; $\Delta\psi$, Membranpotential

Zusätzlich verfügen Mitochondrien über den Oxa1-Komplex (Hell *et al.*, 1998), der u.a. die Insertion von in der mitochondrialen Matrix synthetisierten Proteinen in die Innenmembran vermittelt. Oxa1 ist homolog zu der bakteriellen Insertionskomponente YidC aus *E. coli* und zu Alb3 in Chloroplasten. Im Gegensatz dazu gibt es in Bakterien keine Homologen zu den TOM- und TIM-Proteinen. Diese Komplexe entstanden möglicherweise erst nach Aufnahme der bakteriellen Vorläufer der heutigen Mitochondrien in die eukaryotische Zelle.

1.3.1 Mitochondriale Importsignale

Eine wichtige Voraussetzung für die Translokation eines Proteins in Mitochondrien ist das Vorhandensein eines Importsignals, das die spezifische Erkennung mitochondrialer Proteine ermöglicht. Die Mehrzahl der im Zytosol synthetisierten mitochondrialen Proteine wird in Form von Vorstufenproteinen mit aminoterminalen Präsequenzen synthetisiert. Diese Präsequenzen bilden typischerweise amphipathische α -Helices aus, deren eine Seite positiv

geladene Aminosäurereste enthält, während die andere Seite hydrophob ist. Normalerweise enthalten Präsequenzen keine negativ geladenen Aminosäurereste (von Heijne, 1986b).

Wie am Beispiel der Proteine Bcs1 (Folsch *et al.*, 1996) und Hmi1 (Lee *et al.*, 1999) gezeigt wurde, müssen mitochondriale Importsignale nicht ausschließlich am Aminoterminus lokalisiert sein, sondern können auch intern oder sogar carboxyterminal vorliegen. Im Falle von Bcs1 besteht das Importsignal aus zwei Teilen: einer hydrophoben Domäne und einem carboxyterminal angrenzenden positiv geladenen Bereich, der ähnlich wie eine klassische aminoterminale Präsequenz in der Lage ist, eine amphipathische α -Helix auszubilden. Das Modell des Imports basiert auf der Annahme, dass beide Domänen zusammen eine haarnadelähnliche Struktur ausbilden können, die einer „verdickten“ amphipathischen Helix ähnelt.

Interne Sortierungssignale sind auch charakteristisch für Proteine der mitochondrialen Außenmembran (Übersichtsartikel: Shore *et al.*, 1995; Neupert, 1997), die Matrixproteine Cpn10 (Rospert *et al.*, 1993a) und Mtf1 (Sanyal und Getz, 1995) sowie zahlreiche Proteine der Innenmembran, z.B. der ADP/ATP-Transporter (Aac2). Weiterhin verfügt eine Reihe von Intermembranraumproteinen, zu denen Cytochrom c, Cytochrom c-Hämlyase, Cytochrom c₁-Hämlyase, Tim9, Tim10 und Tim12 zählen, über interne Zielsequenzen. Dabei ist in vielen Fällen die Natur dieses internen Signals nicht geklärt.

1.3.2 Der Import in die mitochondriale Matrix

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Proteinimports in die mitochondriale Matrix.

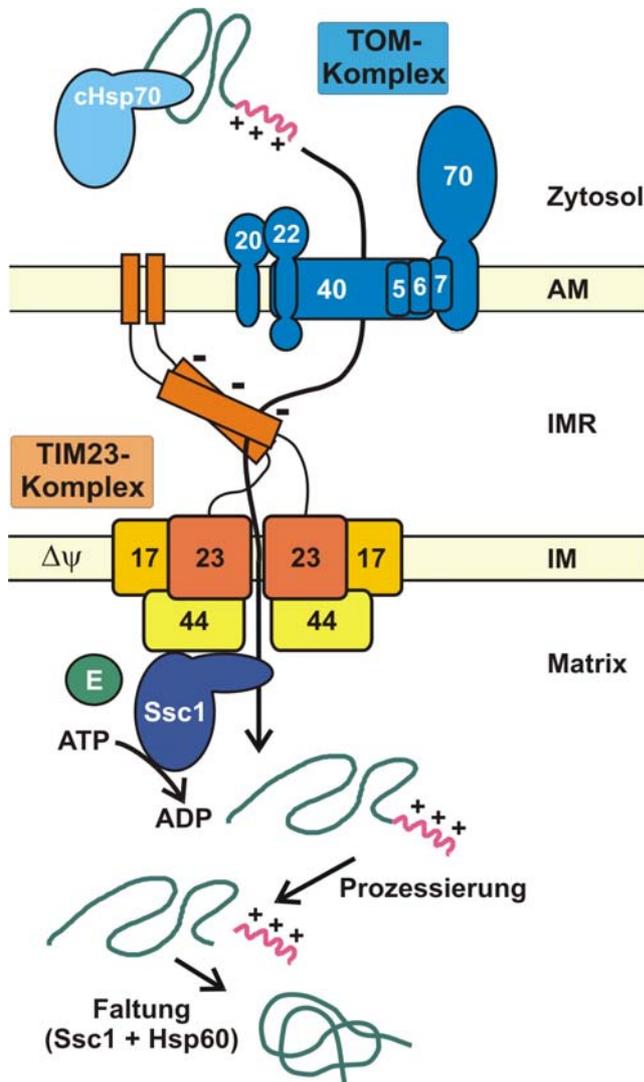


Abb. 2: Der generelle Importweg in die mitochondriale Matrix.

Beschreibung siehe Text. TOM-Komplex: 70, Tom70; 40, Tom40; 22, Tom22; 20, Tom20; 7, Tom7; 6, Tom6; 5, Tom5; TIM23-Komplex: 17, Tim17; 23, Tim23; 44, Tim44; E, Mge1; IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum; AM, Außenmembran; $\Delta\psi$, Membranpotential

Während ihrer Synthese im Cytosol werden mitochondriale Vorstufenproteine von Komponenten gebunden, die sie in einem teilweise entfalteten und somit importkompetenten Zustand halten. Zu diesen Komponenten gehören cytosolisches Hsp70 und Ydj1p (als Übersichtsartikel siehe Mihara und Omura, 1996), die einen Komplex mit dem Vorstufenprotein ausbilden.

Die Vorstufenproteine werden über ihre Importsignale von Rezeptoren auf der mitochondrialen Außenmembran erkannt und gebunden. Diese Rezeptoren sind Teil des TOM-Komplexes. Der TOM-Komplex besteht aus den Rezeptorkomponenten Tom5, Tom20,

Tom22, Tom70 und Tom71 sowie den die Translokationspore („general insertion pore“ oder GIP genannt) ausbildenden Komponenten Tom40, Tom6 und Tom7.

Nachdem die Präsequenz den Intermembranraum erreicht hat, vermittelt der TIM23-Komplex den weiteren Transport über die Innenmembran (vgl. Abb. 3). Der TIM23-Komplex bindet vorzugsweise an Vorstufenproteine mit abspaltbarer Präsequenz (Berthold *et al.*, 1995; Horst *et al.*, 1995, zur Übersicht siehe auch Bauer *et al.*, 2000).

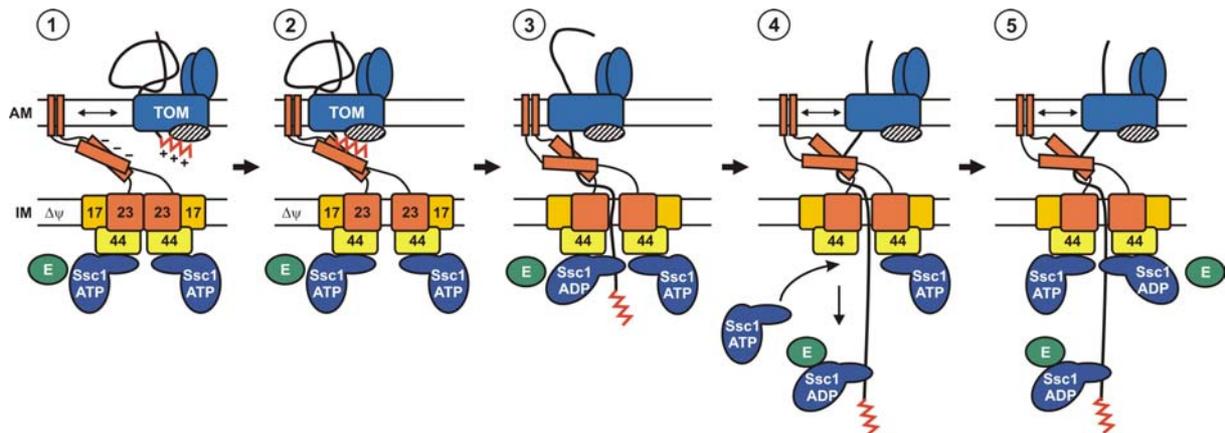


Abb. 3: Modell des Proteintransports über die Innenmembran.

(1) Ein Vorstufenprotein (rotgezackte Linie, Präsequenz) ist an die Trans-Seite (schraffiert) des TOM-Komplex gebunden. TIM23-Komplexe, die über den Aminoterminus von Tim23 an die Außenmembran (AM) geknüpft sind, „suchen“ nach Vorstufenproteinen. (2) Die Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Intermembranraumdomäne von Tim23 und der positiv geladenen Präsequenz destabilisiert die Bindung des Vorstufenproteins an den TOM-Komplex, die Präsequenz bindet an Tim23. Dies führt zu einer membranpotentialabhängigen Öffnung der Importpore im TIM23-Komplex und zur Translokation der Präsequenz über die Innenmembran (IM). (3-5) Der weitere Import in die Matrix wird nun durch ATP-abhängige Bindung an die Präsequenz und später auch an Teile des reifen Proteins von Ssc1 zusammen mit Mge1 (E) und Tim44 fortgeführt. (Modell des Brown'scher Sperrhakens, siehe auch Text).

Der TIM23-Komplex besteht aus equimolaren Mengen der integralen Membranproteine Tim17 und Tim23 sowie des membranassoziierten Matrixproteins Tim44 (Berthold *et al.*, 1995; Bauer *et al.*, 1996; Moro *et al.*, 1999). Außerdem sind die Chaperone mt-Hsp70 und Mge1p über Tim44 mit dem Komplex assoziiert (Dekker *et al.*, 1993; Bolliger *et al.*, 1994; Moro *et al.*, 1999; Kronidou *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994).

Für das Tim23-Protein der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass die aminoterminal Domäne die Außenmembran durchspannt und auf der Oberfläche der Mitochondrien exponiert ist (Donzeau *et al.*, 2000). Tim23 ist das einzige bekannte Protein, das sowohl in der Innenmembran als auch in der Außenmembran verankert ist. Gemäß dem in Abb. 3 dargestellten Modell scheint Tim23 somit eine enge Verknüpfung von Außen- und Innenmembran zu bewirken. Ein enger Kontakt zwischen Außen- und Innenmembran scheint

eine effiziente Übergabe des zu importierenden Proteins vom TOM-Komplex zum TIM23-Komplex zu begünstigen (Donzeau *et al.*, 2000). Die Funktion des TIM23-Komplexes ist nicht streng an eine Interaktion mit dem TOM-Komplex gekoppelt, da beide Translokationsapparate auch unabhängig voneinander Proteine importieren können (Mayer *et al.*, 1993; Segui-Real *et al.*, 1993).

Die vom TIM23-Komplex vermittelte Translokation der Vorstufenproteine über die mitochondriale Innenmembran in die Matrix ist von einem Membranpotential ($\Delta\psi$) über die Innenmembran abhängig. Dieses bewirkt die Dimerisierung der Intermembranraumdomäne von Tim23, welches auf diese Weise die Bindungsstelle für die Präsequenz ausbildet (Bauer *et al.*, 1996). Dieses Dimer dissoziiert nach der Bindung der Präsequenz und öffnet möglicherweise so die Translokationspore über die Innenmembran. Darüber hinaus wurde angenommen, dass das Membranpotential eine elektromotorische Kraft auf die positiv geladene Präsequenz ausübt, mittels derer der positiv geladene Proteinabschnitt auf die negativ geladene Matrixseite der Innenmembran gezogen wird (Schleyer *et al.*, 1982; Martin *et al.*, 1991). Die Rolle des Membranpotentials für den weiteren Verlauf des Imports ist bislang nicht geklärt. Des Weiteren sind die molekularen Mechanismen der Öffnung und des Schließens des TIM23-Komplexes unbekannt.

Nach dem Erreichen der Matrix wird die Polypeptidkette des Vorstufenproteins von Tim44/Ssc1 gebunden und festgehalten (vgl. Abb. 3), anschließend geht Ssc1 durch ATP-Hydrolyse in seine ADP-Form über, wodurch Tim44 von Ssc1 abdissoziiert. Das Vorstufenprotein bleibt dabei an Ssc1 gebunden (Schneider *et al.*, 1996), was ein Zurückgleiten der Polypeptidkette durch den Translokationskanal verhindert und einen gerichteten Transport ermöglicht (Modell des Brown'schen Sperrhakens). Erst nach dem Austausch von ADP gegen ATP verliert Ssc1 seine Affinität zum Vorstufenprotein, dissoziiert vom Vorstufenprotein ab und kann erneut einen Komplex mit Tim44 bilden. Für die vollständige Translokation eines Vorstufenproteins über die Innenmembran sind wiederholte Zyklen der Bindung und Dissoziation des Tim44/Ssc1-Komplexes an das Vorstufenprotein nötig (Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994).

Der Nukleotid-Austauschfaktor Mge1p reguliert die Nukleotidbindung von Ssc1. Mge1 bindet an Ssc1 und vermittelt die Dissoziation von ADP. Temperatursensitive Mutanten von Mge1p zeigen eine verlangsamte Dissoziation von Tim44 und Ssc1 (Laloraya *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1996; Voos *et al.*, 1994; Westermann *et al.*, 1995), was einen verlangsamten Importprozeß zur Folge hat.

Alternativ zum beschriebenen Modell des Brown'schen Sperrhakens wird das sogenannte „Einzug“-Modell diskutiert. Auf der Grundlage dieses Modells finden im an Tim44 gebundenen Ssc1 Konformationsänderungen statt, die durch die Hydrolyse von ATP vermittelt werden. Diese Konformationsänderungen bewirken eine Zugkraft auf die zu translozierende Polypeptidkette, so dass das Protein aktiv in die Matrix gezogen wird. (Glick, 1995; Pfanner und Meijer, 1995; Matouschek *et al.*, 1997).

Nach der Translokation in die Matrix wird die Präsequenz des Vorstufenproteins durch die Matrixprozessierungspeptidase (α , β -MPP) abgespalten (Hawlitschek *et al.*, 1988; Arretz *et al.*, 1991; Arretz *et al.*, 1994).

Während des Transportprozesses sind die Proteine vollständig entfaltet. Erst nach Erreichen der Matrix erfolgt deren Faltung in ihre native Konformation. Dieser Prozess ist ATP-abhängig und wird durch Ssc1 sowie von Mdj1p und Mge1p unterstützt. Bei vielen Proteinen ist zusätzlich das mitochondriale Hsp60/Cpn10-System an der Faltung der importierten Proteine beteiligt (Hoehfeld und Hartl, 1994; Rowley *et al.*, 1994b; Westermann *et al.*, 1995; Rassow *et al.*, 1995; Rospert *et al.*, 1996).

1.3.3 Der Import in die Innenmembran von Mitochondrien

Neben der mitochondrialen Matrix ist die Innenmembran ein weiteres wichtiges Subkompartiment von Mitochondrien. Bisher wurden drei Importwege für Innenmembranproteine gefunden:

Innenmembranproteine ohne aminoterminaler Präsequenz wie Tim17, Tim23 und Proteine der großen Klasse der Transporterfamilie werden mit Hilfe des TIM22-Komplexes in die Innenmembran inseriert (Abb. 4) (Voos *et al.*, 1999; Tokatlidis und Schatz, 1999; Bauer *et al.*, 2000, Koehler, 2000). Für die Translokation über die Außenmembran binden die Carrierproteine zunächst an den Rezeptor Tom70 des TOM-Komplexes (Söllner *et al.*, 1990; Hines *et al.*, 1990; Schlossmann *et al.*, 1994; Brix *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1999; Endres *et al.*, 1999) und werden dann durch die Importpore in den Intermembranraum geleitet, wo sie zunächst mit dem TIM9.10-Komplex interagieren (Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1998), um dann zum TIM22-Komplex weitergeleitet zu werden (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997; Sirrenberg *et al.*, 1998). Um den Import und die Insertion abzuschließen, ist außerdem ein Membranpotential in Form eines pH-Gradienten erforderlich (Endres *et al.*, 1999).

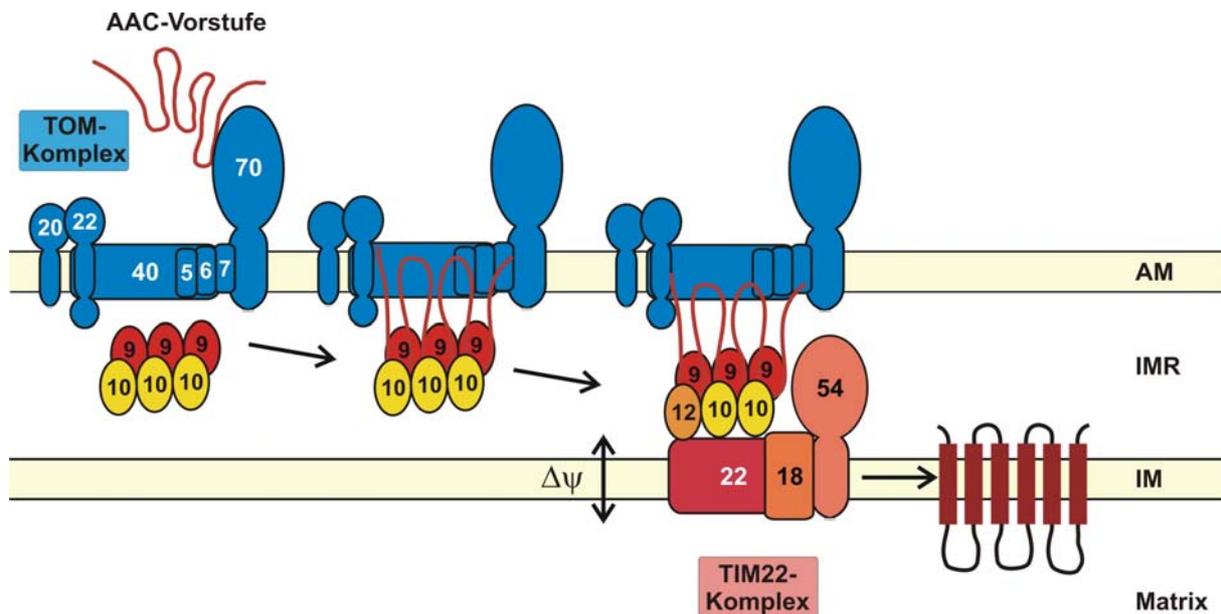


Abb. 4: Schematische Darstellung des Imports des ADP/ATP-Carriers (AAC).

Beschreibung siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die Molekülmasse der jeweiligen Komponente in kDa. IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum; AM, Außenmembran; $\Delta\psi$, Membranpotential

Eine weitere Gruppe integraler Membranproteine wird mit Hilfe der Tim23-Translokase in die Innenmembran sortiert. Dabei folgen diese Vorstufenproteine dem sogenannten „Stop-Transfer-Mechanismus“. Die Insertion in die Innenmembran erfolgt, nachdem die Translokation innerhalb des TIM23-Komplexes abgestoppt wurde (van Loon und Schatz, 1987, Kaput *et al.*, 1982). Dieser Mechanismus wurde jedoch nur für monotopie Proteine wie für die Untereinheit Va der Cytochrom c-Oxidase (CoxVa) (Gartner *et al.*, 1995; Cyr *et al.*, 1994) oder die D-Laktatdehydrogenase (DLD1) (Rojo *et al.*, 1998) gezeigt. Beide Proteine besitzen nur eine Transmembrandomäne, wobei der Aminoterminus des Proteins in die Matrix ragt. Auf diese Weise können auch Proteine inseriert werden, deren Aminoterminus in den Intermembranraum ragt: Bcs1 bildet eine haarnadelförmige Struktur, die aus einer Transmembrandomäne und einer daran anschließenden amphipathischen α -Helix entsteht. Nach dem Import in den TIM23-Komplex der Innenmembran verlässt die Transmembrandomäne diesen lateral in die Lipidschicht, während der carboxyterminale Rest in die Matrix transloziert wird (Folsch *et al.*, 1996).

Darüber hinaus wurde eine dritte Gruppe von Membranproteinen beschrieben, die zunächst über beide Membranen hinweg in die mitochondriale Matrix transportiert werden, um anschließend von der Matrix aus in die Innenmembran zu inserieren. Da hier die Insertionsrichtung der Richtung der Translokation von Proteinen in Bakterien entspricht, wurde dieser Mechanismus „Konservativer Sortierungsweg“ genannt (Hartl *et al.*, 1986).

Unter den Proteinen, die nach diesem Mechanismus in die Innenmembran integriert werden, finden sich sowohl monotope Proteine wie Su9(1-112)-DHFR (Rojo *et al.*, 1995) und Su9-CoxII(1-74)-DHFR (Herrmann *et al.*, 1995), als auch das polytope Protein Oxa1 (Herrmann *et al.*, 1997). Diese Proteine werden mit einer aminoterminalen mitochondrialen Präsequenz synthetisiert, die nach Import in die mitochondriale Matrix proteolytisch durch die Matrixprozessierungspeptidase (MPP) abgespalten wird. Anschließend erfolgt von der Matrixseite aus die Insertion in die Innenmembran. Für diese Insertion wird ein Membranpotential über die Innenmembran benötigt, wobei vor allem der pH-Gradient von Bedeutung zu sein scheint (Rojo *et al.*, 1995). Die Membraninsertion von Su9(1-112)-DHFR, Su9-CoxII(1-74)-DHFR und Oxa1 ist abhängig von Oxa1 (Hell *et al.*, 1998). Kürzlich wurde mit Mba1 eine zweite Komponente identifiziert, die neben Oxa1 für den effizienten Export des Aminoterminus von Cox2, der mitochondrial kodierten Untereinheit 2 der Cytochrom c-Oxidase, benötigt wird (Preuss *et al.*, 2001). Mba1 scheint aber auch unabhängig von Oxa1 Einfluss auf die Insertion von Innenmembranproteinen auszuüben (Preuss *et al.*, 2001).

Bisher ist nur wenig über den Insertionsmechanismus polytope Innenmembranproteine bekannt. Oxa1 ist das einzige polytope Protein mit Präsequenz, dessen Sortierungsweg genauer untersucht wurde. Für Proteine mit zwei membranspannenden Abschnitten und einer dazwischen liegenden Intermembranraumdomäne, wurde vorgeschlagen, dass beide Enden der Polypeptidkette von der Intermembranraumseite aus in die Innenmembran inserieren (Arnold *et al.*, 1998). Dem gemäss wurde postuliert, dass derartige Proteine zwei unabhängige Insertionssignale enthalten: Eine Präsequenz, die für die Insertion des Aminoterminus verantwortlich ist, sowie einen Abschnitt in der Polypeptidkette, der eine Haarnadelstruktur einnehmen kann und so die Insertion des Carboxyterminus ermöglicht. Diese Situation wurde im Falle des Vorstufenproteins von Cytochrom c_1 gefunden. Cytochrom c_1 wird jedoch nach der Insertion in die Innenmembran zwischen den beiden Transmembransegmenten proteolytisch gespalten, so dass die reife Polypeptidkette als monotope Protein mit dem Carboxyterminus in die mitochondriale Matrix und mit dem Aminoterminus in den Intermembranraum ragt.

1.4 Membraninsertion und Orientierung von Membranproteinen

Die Orientierung von Proteinen der bakteriellen und mitochondrialen Innenmembran wird durch die Ladungsverteilung beiderseits der Transmembrandomäne bestimmt. In Bakterien konnte die sog. „Positiv Inside“-Regel postuliert werden, wonach basische Aminosäurereste häufiger in cytoplasmatischen als in periplasmatischen Domänen gefunden werden (von Heijne, 1986a; Dalbey, 1990). Später konnte diese Regel auch auf die Topologie von Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), der Chloroplasten und der Mitochondrien ausgeweitet werden (von Heijne, 1992; Wallin und von Heijne, 1998).

Die „Positiv Inside“-Regel beruht wahrscheinlich darauf, dass Membranproteine aufgrund der basischen Aminosäurereste mit der negativen Oberfläche der Membran wechselwirken und so auf der cis Seite der Membran zurück gehalten werden (Gallusser und Kuhn, 1990). Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Membranpotential. Die periplasmatische Seite der bakteriellen Plasmamembran ist positiv geladen, während die cytosolische negativ ist. Wird das Membranpotential zerstört, so kann es zu einer Umkehr der Topologie von Membranproteinen kommen (Andersson und von Heijne, 1994).

Die „Positiv Inside“-Regel gilt auch für viele Proteine der Thylakoidmembran von Chloroplasten und der Innenmembran von Mitochondrien (Gavel *et al.*, 1991; Gavel und von Heijne, 1992). Beispielsweise verfügt eine Reihe kernkodierter mitochondrialer Innenmembranproteine nur über wenige positive Ladungen innerhalb ihrer Matrixdomänen. Dafür werden saure Reste in den Intermembranraumdomänen bevorzugt, wie dies bereits im Falle von Su9(1-112)-DHFR gezeigt werden konnte. Entscheidend für den Export des Aminoterminus aus der Matrix ist die negative Nettoladung der Domäne (Rojo *et al.*, 1999). Eine Umkehr der an die Transmembrandomäne angrenzenden Ladungen führt folgerichtig zur inversen Topologie. Offensichtlich spielt auch hier die Energetisierung der Membran eine entscheidende Rolle.

1.5 Molekulare Chaperone in Mitochondrien

Als Chaperone werden Proteine bezeichnet, die an Proteine mit instabilen nicht-nativen Konformationen reguliert binden und diese wieder freisetzen. Sie können dadurch eine Aggregation oder Falschfaltung des betroffenen Proteins verhindern. Dabei werden vor allem hydrophobe Abschnitte der Polypeptidkette gebunden, wodurch das Auftreten unproduktiver intra- und intermolekularer Wechselwirkungen vermieden wird. Chaperone verfügen über keine Faltungsinformation für ihre Substratmoleküle (siehe auch Pelham, 1986; Ellis, 1987; Ellis und Hemmingsen, 1989; Hartl *et al.*, 1992; Hartl *et al.*, 1994; Becker und Craig, 1994; Hartl, 1995). Da im Allgemeinen nur entfaltete Proteine von der Translokationsmaschinerie über die mitochondrialen Membranen transportiert werden können, kommt Chaperonen eine wesentliche Rolle bei Translokationsprozessen zu. Einerseits stabilisieren sie den translokationskompetenten Zustand vor Beginn des Transportes, andererseits vermitteln sie die korrekte Faltung nach Abschluss des Transportes im jeweiligen Zielkompartiment. Innerhalb der großen Familie von Chaperonen gibt es Gruppen, die hochspezifisch nur wenige Substratmoleküle erkennen und solche, die eine große Vielzahl verschiedenster Substratmoleküle binden. Zu letzteren gehört das Hsp70/Hsp40- und das Hsp60-System. Da sich die Chaperone bereits früh in der Entwicklungsgeschichte bildeten, sind funktionelle Vergleiche auch über die Grenzen verschiedenster Organismen hinweg möglich. Die Vertreter der Hsp70- und Hsp40-Familien haben die Aufgabe, die Falschfaltung neu gebildeter und unreifer Proteine zu verhindern, spielen daneben aber auch eine wichtige Rolle beim Transport von Proteinen durch Membranen und beim Proteinabbau. Dabei wurden grundlegende Einblicke in die Funktionsweise der Substratbindung und -freisetzung am Beispiel des prokaryotischen Hsp70-Homologen DnaK gewonnen (Langer *et al.*, 1992).

Auch Vertreter der Hsp60-Familie oder Chaperonine wurden sowohl in Prokaryoten, als auch in Mitochondrien, in Chloroplasten sowie im eukaryotischen Cytosol gefunden (Hartl *et al.*, 1992; Hartl *et al.*, 1994; Hartl, 1995). Sie ermöglichen die Faltung ihrer Substrate, indem sie diese mit einer zylindrischen Kavität umgeben und so ein lokal unterschiedliches äußeres Milieu um das Substratprotein schaffen. Wie Hsp70 werden sie durch ATP reguliert.

Bisher wurden die folgenden Komponenten des mitochondrialen Chaperonsystems identifiziert und näher charakterisiert: Ssc1 (mt Hsp70), Mge1, Mdj1, Hsp60/10, Hsp78 und Ssq1.

Die Bedeutung von Ssc1 für den Import von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Matrix wurde bereits unter 1.3.2 beschrieben. In Hefe ist *SSC1* ein essentielles Gen (Craig *et*

al., 1987; Craig *et al.*, 1989). Ssc1 vermittelt die Proteinfaltung und den Proteinabbau in der Matrix (Kang *et al.*, 1990; Gambill *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1994). Außerdem verhindert es, wie am Beispiel vom Var1 gezeigt werden konnte, die Aggregation von Proteinen nach Hitzestress (Herrmann *et al.*, 1994b). Weiterhin spielt Ssc1 eine wichtige Rolle für die Aktivität der mitochondrialen Endonuklease Endo.*Sec1* (Nakagawa *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 1992). Ssc1 besitzt wie alle Hsp70-Proteine eine 44 kDa große aminoternale ATPase-Domäne, die aber im intakten Protein nicht durch Substratbindung stimuliert werden kann (Chappell *et al.*, 1987). Bisher existieren nur Daten über die Struktur des sehr ähnlichen bakteriellen Homologen DnaK. Die räumliche Struktur seiner ATPase-Domäne ähnelt der von Aktin (Flaherty *et al.*, 1991). Gemäß dem derzeitigen Arbeitsmodell bewirkt die ATP-Bindung eine Konformationsänderung, die auf die Substratbindungsdomäne übertragen wird. Die carboxyterminale Substratbindungsdomäne selbst besitzt keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Strukturen (Morshauer *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1996). Wahrscheinlich besteht sie in Ssc1, wie für DnaK gezeigt, aus zwei 4-strängigen β -Faltblättern und einer α -Helix. Sie interagiert bevorzugt mit Peptiden in linearer Konformation (Landry *et al.*, 1992), wobei hydrophobe Aminosäurereste bevorzugt werden (Flynn *et al.*, 1991).

Vor kurzem wurde mit Ssq1 ein weiteres Homologes zu Ssc1 beschrieben (Knight *et al.*, 1998). Bislang wurde postuliert, dass dieses in Hefe nicht essentielle Protein eine besondere Rolle bei der Biogenese von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Zentren spielt (Voisine *et al.*, 2000; Lutz *et al.*, 2001). Seine räumliche Struktur dürfte der von Ssc1 stark ähneln.

Mge1 ist ein Nukleotidaustauschfaktor, der analog zu seinem bakteriellen Homologen GrpE die Abspaltung von ADP von Ssc1 reguliert (Liberek *et al.*, 1991). Aus diesem Grunde scheint Mge1 essentiell für die Faltung und Aggregationshemmung von Matrixproteinen zu sein (Ikeda *et al.*, 1994; Westermann *et al.*, 1995). Für das bakterielle Homologe, GrpE, konnte eine dimere Struktur im Komplex mit DnaK nachgewiesen werden (Schönfeld *et al.*, 1995). Dieser Komplex, bestehend aus zwei Molekülen GrpE und einem Molekül DnaK, zerfällt in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP (Zylicz *et al.*, 1987).

Mdj1 ist ein Mitglied der Familie der Hsp40-Proteine und hat eine hohe Sequenzähnlichkeit zum bakteriellen DnaJ. Es schützt Proteine vor Hitzedenaturierung. Zum Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien wird es nicht benötigt (Rowley *et al.*, 1994a; Westermann *et al.*, 1996). Durch seine Wechselwirkung mit Mge1 und Ssc1 (Deloche *et al.*, 1997) kann es bei der Faltung mitochondrialer Vorstufenproteine mitwirken (Rospert *et al.*, 1996). Wie alle „J-Proteine“ verfügt Mdj1 ebenfalls über eine aus 70 Aminosäureresten bestehende „J-Domäne“. Auf Basis der NMR-Spektroskopie konnte die Struktur dieser für

alle Homologen charakteristischen Domäne für DnaJ (*E. coli* Homologes von Mdj1) aufgeklärt werden (Szyperski *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1995). Sie besteht aus 4 α -Helices, von denen drei eine Struktur mit einem hydrophoben Kern bilden. An sie schließt sich ein Glycin- und Phenylalanin-reicher Abschnitt an, dessen Länge in den verschiedenen Homologen stark variiert. In Lösung ist dieser Bereich sehr flexibel und ohne definierte Struktur und übernimmt wahrscheinlich die Funktion eines Gelenkes zwischen der J-Domäne und der carboxyterminalen Domäne (Caplan *et al.*, 1993). Im mittleren Bereich von *E. coli*-DnaJ und seinen Homologen befindet sich ein Motiv, das in vierfacher Wiederholung die Sequenz CxxCxGxG enthält (C, Cystein; G, Glycin; x, meist geladener oder polarer Aminosäurerest). Dieses Sequenzmotiv bildet eine zu Zinkfingern ähnliche Struktur und ist an der Bindung entfalteter Substratproteine beteiligt (Szabo *et al.*, 1996). Die Interaktion von Mdj1 mit Ssc1 dürfte ähnlich der von DnaJ mit DnaK sein und über die „J-Domäne“ und den Carboxyterminus von Ssc1 erfolgen (Cyr *et al.*, 1994).

Hsp60/Hsp10 ist homolog zu GroEL/GroES aus *E. coli* und in Hefe essentiell (Reading *et al.*, 1989). Eine seiner bisher bekannten Aufgaben besteht in der ATP-abhängigen Faltung vieler Proteine nach deren Import sowie ihrer Assemblierung in verschiedene Proteinkomplexe (McMullin und Hallberg, 1988; Reading *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989; Ostermann *et al.*, 1989; Koll *et al.*, 1992; Rospert *et al.*, 1993b; Rospert *et al.*, 1996). Hsp60/Hsp10 bilden eine doppelte Ringstruktur, wobei jeder Ring aus 7 Untereinheiten aufgebaut ist (Dubaque *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997). Hsp10 schließt zeitweise einen dieser Ringe und moduliert so die ATPase-Aktivität von Hsp60 (Dubaque *et al.*, 1997).

Ein Vertreter einer weiteren Chaperonfamilie, der ClpB-Homologen, ist Hsp78 (Schmitt *et al.*, 1995). Es hat eine mit Ssc1 überlappende Funktion und scheint vor allem unter Hitzestressbedingungen die Aggregation von Proteinen zu verhindern (Leonhardt *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1995).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält 14 Gene, die für Hsp70-Proteine kodieren. Neun Proteine dieser Familie sind im Cytosol lokalisiert, zwei befinden sich im ER (Kar2 und Lhs1), weitere zwei in der mitochondrialen Matrix (Ssc1 und Ssq1).

Das 14. Hsp70-Protein, YEL030w, zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Ssc1 (82 % Identität). In einem großangelegten genetischen Selektionsansatz wurde gefunden, dass die Inaktivierung von YEL030w zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber der Zelloberflächen angreifenden Chemikalie Calcofluor Weiß führt (Lussier *et al.*, 1997). Daher wurde es als „Extra Cellular Mutant“, *ECM10*, bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden: Wo ist Ecm10 lokalisiert? Welche Funktion übernimmt Ecm10 in Hefe? Können Ssc1 und Ecm10 in bestimmten Bereichen funktionell überlappen? In welchen Bereichen gibt es diese Funktionsüberlappung?

Des Weiteren sollte die Sortierung und Topogenese kernkodierter Proteine der mitochondrialen Innenmembran genauer untersucht werden. Es sollten die folgenden Fragen geklärt werden: Gibt es ein allgemeines Prinzip für den Import und die Topogenese von kernkodierten Proteinen der mitochondrialen Innenmembran? Welche Rolle spielen interne Signale für polytope Membranproteine? Was ist die Bedeutung von Oxa1 für diese Proteine? Welche energetischen Voraussetzungen sind für den Import und die Topogenese von Innenmembranproteinen notwendig?

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

In der Regel wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Φ 80 lacZ Δ M15) Δ [lacZYA-argF] U196 recA1 end A1 hsd R17 r⁺ m⁺ supE44 thi gyrA relA1) zur Transformation mit rekombinanten Abkömmlingen der Plasmide pGEM3 bzw. pGEM4 (Melton *et al.*, 1984) verwendet. Zur Transformation von Expressionsplasmiden für Hefe wurde der *E. coli* Stamm MH1 (bezogen von Lindner und Hall, EMBO-Lab-Course, 1992, Basel) bzw. BL21-CodonPlus (*E. coli* B F-ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]) eingesetzt.

2.1.2 Verwendete Plasmide

Die Klonierungsstrategien für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind unter 2.1.11 beschrieben.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pGEM3- pGEM4-Plasmide	Melton <i>et al.</i> , 1984
SSB13	S. Bednarek, Madison, WI, USA
pFB1 (pGEM3 ECM10)	diese Arbeit
pFB2 (pGEM3 ECM10::Trp1)	diese Arbeit
pYES2.0 (Su9 His8 MDJ1)	Benedikt Westermann, München
pFB3 (pYES Su9 His8 ECM10)	diese Arbeit
pFB4 (pYES Su9 His8 SSC1)	diese Arbeit
pYX 132	Novagen, Madison, WI 53711USA
pFB5 (pYX 132 ECM10)	diese Arbeit
pFB6 (pYX 132 SSC1)	diese Arbeit
pFB7 (pGEM4 MRS2 FL)	diese Arbeit
HelC37 DHFR ^{mut}	Lee <i>et al.</i> , 1999
pFB8 (pGEM4 MRS2 (1-344)-DHFR ^{mut})	diese Arbeit
DHFR Hel37C	Lee <i>et al.</i> , 1999
pFB9 (pGEM4 DHFR MRS2 (337-470))	diese Arbeit
pFB10 (pGEM4 DHFR MRS2 ^{mut} (337-470))	diese Arbeit
pFB11 (pGEM4 MRS2 FL ^{mut})	diese Arbeit
pYX142	Novagen, Madison, WI 53711USA
pFB12 (pYX142 Mrs2 FL HA)	diese Arbeit
pFB13 (pYX142 Mrs2 FL ^{mut} HA)	diese Arbeit
pGEM4 YTA10(1-265)-DHFR ^{mut}	Klaus Leonhard, München

2.1.3 Plasmidreinigung

a) In kleinem Maßstab:

Bakterien einer Kolonie wurden in 2 ml LB^{Amp}-Medium resuspendiert, über Nacht bei 37°C geschüttelt und in ein Reaktionsgefäß abgeschüttelt, wobei der Rücklauf bei 4°C aufbewahrt wurde. Die Bakterien wurden für 1 min bei 9000 g bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und in 100 µl der Lösung 1 resuspendiert, 5 min bei RT geschüttelt, 100 µl Lösung 2 zugemischt, 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend 150 µl Lösung 3 zugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und ausgefallene Proteine und Zell-DNS 10 min bei 18000 rpm in einer Sigma-Zentrifuge sedimentiert. Die Plasmid-DNS aus dem Überstand wurde mit 1 ml 100 % Ethanol für 10 min bei -80°C gefällt und für 20 min bei 18500 rpm und 4°C sedimentiert. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und anschließendem Trocknen im Vakuum wurde die Plasmid-DNS in 50 µl Wasser resuspendiert. Zur Identifizierung der gesuchten rekombinanten Klone wurde die Plasmid-DNS mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Zu den Ansätzen wurde 5x-Stop-Puffer ad 1x zugemischt und die DNS elektrophoretisch aufgetrennt.

b) In großem Maßstab (Midi-Prep):

Hierfür wurden 40 ml LB^{Amp}-Medium mit den transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (JA20, 5 min, 5000 rpm, RT), in 4 ml der Lösung E1 aufgenommen, 4 ml der Lösung E2 zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4,4 ml der Lösung E3 zugemischt und ausgefallene Proteine und genomische DNS abzentrifugiert (JA20, 10 min, 12000 rpm, RT). Der Überstand wurde auf eine mit Lösung E4 äquilibrierte Genomed Jetstar-Säule geladen, diese zweimal mit je 10 ml der Lösung E5 gewaschen und die Plasmid-DNS mit 5 ml der Lösung E6 eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde die DNS ausgefällt, abzentrifugiert (JA20, 30 min, 12000 rpm, 4°C), mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl H₂O aufgenommen.

LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8 g/l NaCl (für LB-Platten zusätzlich 1,5 % Agar zusetzen); für LB ^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugeben
Lösung 1:	50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl; 2 mg/ml Lysozym (frisch), pH 8,0
Lösung 2:	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS, frisch hergestellt
Lösung 3:	3 M Na-Acetat, pH 4,5
E1:	10 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
E2:	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
E3:	3,2 M K-Acetat, pH 5,5
E4:	600 mM NaCl; 100 mM Na-Acetat, pH 5,0
E5:	800 mM NaCl; 100 mM Na-Acetat, pH 5,0
E6:	1250 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
5x-Stop-Puffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 15 % (w/v) Ficoll 400; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylenxyolanol; 0,5 % SDS

2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine A_{260} von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngige DNS bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNS (linearer Bereich: 0,1-1 A_{260}). Ein Maß für die Reinheit der Präparation ist der Quotient A_{260}/A_{280} . Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.5 Amplifizieren von DNS-Fragmenten mittels „Polymerase-Kettenreaktion“

Bei der „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR) wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide („Primer“) und DNS-Synthese mit der hitzebeständigen Taq-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eine exponentielle Synthese von DNS-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht (Saiki *et al.*, 1988). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt zusätzlich zu dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM der Desoxynukleosidtriphosphate, 105-106 DNS-Moleküle des Matrizenstranges, 10 bis 50 pmol der Oligonukleotide und 2 U Taq-DNS-Polymerase. Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem

programmierbaren Thermostaten inkubiert. Ein typischer Reaktionsverlauf bestand aus einer Vorinkubation für 4 min bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der Matrizenstränge, dann aus 30 Zyklen, die sich aus 1 min bei 94°C, 2 min bei 40 bis 50°C (Binden der Oligonukleotide) und 2 min bei 72°C (Polymerase-Reaktion) zusammensetzten und schließlich aus einer Nachinkubation für 4 min bei 72°C, um die DNS-Synthese zu vervollständigen. Die Bildung des zu amplifizierenden Fragmentes wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.1.6 Klonierung von DNS-Fragmenten

2.1.6.1 Restriktionsverdau

Die spezifische Spaltung von DNS mit Restriktionsendonuklease erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern. Es wurden ca. 1-2 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNS eingesetzt und 90 min oder über Nacht bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert.

2.1.6.2 Dephosphorylierung von DNS

Von den Enden linearisierter DNS-Fragmente kann die 5'-Phosphatgruppe enzymatisch von Kälberdarmphosphatase (CIP) entfernt werden. Für die Dephosphorylierung enthielt ein Reaktionsansatz ca. 5 µg gespaltene DNS in 44 µl H₂O, 5 µl 10x Phosphatasepuffer und 1 µU Kälberdarmphosphatase (1 U/µl). Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C für Fragmente mit überhängenden Enden, bzw. für 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C für Fragmente mit glatten Enden wurde erneut 1 µl Enzymlösung zugegeben und nach einer weiteren Inkubation für die gleiche Zeit und bei gleicher Temperatur wurde dem Ansatz 6 µl STE-Puffer zugemischt. Daran schloss sich die Inaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 65°C an und eine Phenol/Chloroform-Extraktion, bei der die Probe je einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) und mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) ausgeschüttelt wurde. Die DNS wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-acetat und dem dreifachen Volumen Ethanol für 30 min bei -80°C gefällt. Die gewaschene und getrocknete DNS wurde in H₂O gelöst.

10x Phosphatasepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; 20 mM Spermidin

STE-Puffer: 1 M NaCl; 10 mM EDTA; 100 mM Tris/HCl, pH 8,0

2.1.6.3 Auffüllung von 5'-überstehenden Enden

Um 5'-überstehende Enden von DNS-Fragmenten aufzufüllen, wurde das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aus *E. coli* benutzt (Henikoff und Cohen, 1984). Dazu wurden 5-10 µg DNS in 10 µl 20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 7 mM MgCl₂ gelöst und je 1 µl 0,125 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 0,1 U Klenow-Enzym zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C für 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl 5x Stop-Puffer beendet.

5x-Stop-Puffer: 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 15 % (w/v) Ficoll 400; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylenxylanol; 0,5 % SDS

2.1.6.4 Ligation

Um zwei DNS-Fragmente mit der aus dem T4-Phagen isolierten DNS-Ligase zu verknüpfen, wurden typischerweise 50 bis 200 ng Vektor-DNS mit einem etwa fünffachen Überschuss an Fragment in dem vom Hersteller (BRL) mitgelieferten Puffer mit 1 U T4-Ligase in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16°C oder für 4-6 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.6.5 Elektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten

Zur gelelektrophoretischen Analyse wurden Agarose-Flachgele mit 30 bzw. 100 ml Bettvolumen benutzt. Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und bei 65°C aufbewahrt. Die Agarosekonzentration variierte von 0,8 bis 2 % (w/v); es wurde Ethidiumbromid ad 0,4 mg/ml zugesetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TAE. Die Spannung betrug 15 V/cm.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 7,5; 20 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA

2.1.6.6 Elution von DNS aus Agarose mit Hilfe eines Geextraktions-Kits

Um nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente diese wieder aus den Agarosegelen zu extrahieren, wurden die Fragmente unter UV-Licht aus den Gelen ausgeschnitten und in dem vom Hersteller angegebenen 3-fachen Volumen des Lösungspuffers (QG) bei 50°C im Verlauf von 10 min aufgelöst. Danach wurde die so erhaltene Lösung in die DNS-bindende QIAquick Säule überführt. Die Bindung erfolgte während der Zentrifugation mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Nach waschen mit dem ethanolhaltigen Waschpuffer (PE) wurde die Membran der Säule mit 30 µl Elutionspuffer (EB) versetzt und für 10 min bei RT stehengelassen. Anschließend erfolgte die Elution mittels Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm

Lösungspuffer (QG): Qiagen

Waschpuffer (PE): Qiagen

Elutionspuffer (EB): 10 mM Tris/HCl pH 8,5

2.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien

Es wurden 500 ml LB-Medium aus einer Übernachtskultur von etwa 5 ml angeimpft und bis zu einer A_{578} von 0,5 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 0°C und 5000 rpm abzentrifugiert (Beckman JA10-Rotor). Die Zellen wurden nacheinander in 500, dann in 250 und schließlich in 50 ml 10 % Glycerin gewaschen (kalt!), in 500 µl 1 % Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots unterteilt und bei -70°C aufbewahrt.

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8 g/l; für LB^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugeben

2.1.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Ähnlich der Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Bakterien wurden 500 ml LB-Medium aus einer Übernachtskultur von etwa 5 ml angeimpft und bis zu einer A_{578} von 0,5

wachsen gelassen. Die Bakterien wurden anschließend für 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 0°C und 4000 rpm abzentrifugiert (Beckman JA10-Rotor). Die sedimentierten Zellen wurden in 8 ml 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert, mit 2 ml 75 % Glycerin (v/v) versetzt, in 250 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8 g/l; für LB^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugeben

2.1.9 Transformation von *E. coli*-Bakterien mittels Elektroporation

Die Transformation von Bakterien mittels Elektroporation beruht darauf, dass die Zellmembran der Bakterien durch kurzzeitige Stromstöße für DNS durchlässig wird. Vor der Elektroporation wird die zu transformierende DNS (meist der Ligationsansatz, s.o.) für 10 min bei 65°C vorinkubiert und 1 µl zu 40 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt. Dieser Ansatz wird in einer speziellen Transformationsküvette einem kurzen Spannungsstoß von 2,5 kV, 400 Ω und 25 µF ausgesetzt. Anschließend wird der Ansatz sofort in 1 ml kaltes SOC-Medium gemischt, für 40 min bei 37°C geschüttelt, auf eine LB^{Amp}-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl; 0,19 g/l KCl

SOC-Medium: 100 ml SOB-Medium + 1 ml 2 M Glukose + 1 ml 1 M MgCl₂; 1 M MgSO₄

LB-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8 g/l NaCl; 1,5 % Agar; für LB^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben

2.1.10 Transformation von *E. coli*-Bakterien mittels CaCl₂

Nach langsamem Auftauen eines 250 µl Aliquots siehe 2.1.8. auf Eis wurden 5-8 µl DNS (meist Ligationsansatz) zugesetzt und nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei 4°C kurzfristig für 2 min auf 42°C erhitzt. Die Zellen wurden daraufhin erneut für 10 min auf Eis stengelassen dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für weitere 40 min auf 37°C inkubiert, bevor sie auf eine LB^{Amp}-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht stengelassen wurden.

LB-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8 g/l NaCl; 1,5 % Agar; für LB^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben

2.1.11 Klonierungsstrategien

Für die Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro* wurden Derivate der Plasmide pGEM3 und pGEM4 (Promega) verwendet, die die betreffende DNS unter Kontrolle des SP6-Promotors enthielten. Die ligierten Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm MH1 transformiert (siehe 2.1.9 und 2.1.10). Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide sind in der Tab. 3 zusammengestellt.

pFB1 (pGEM3 ECM10):

Mit Hilfe der Primer ECM10pGEM-5' und ECM10pGEM-3' wurde die für Ecm10 codierende Sequenz amplifiziert. Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SacI* geschnitten und in pGEM3 ligiert.

pFB2 (pGEM3 ECM10::TRP1)

Das Plasmid pFB1 wurde mit dem Restriktionsenzym *ClaI* geschnitten, wobei ein Fragment von 1169bp aus der *ECM10*-Sequenz entfernt wurde. Dieses Fragment wurde durch einen DNS-Abschnitt, der für das *TRP1*-Gen kodiert, ersetzt.

pFB3 (pYES Su9 His8 ECM10)

Für die Expression von Ecm10 mit einer aminoterminalen His₈-Verlängerung wurde ein Konstrukt von B. Westermann (pYES2.0 Su9 His8 MDJ1) verwendet. Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *BglIII* und *SacI* geschnitten, und dabei die MDJ1-Sequenz entfernt. Mit den Primern ECM10pYES5' und ECM10pGEM-3' wurde der DNS-Abschnitt für das reife Ecm10 amplifiziert mit *BamHI* und *SacI* geschnitten und in das vorbereitete Plasmid subkloniert. Mit Hilfe dieses Konstruktes kann ein chimäres Protein unter der Expressionskontrolle des Gal1-Promotors exprimiert werden. Es besteht aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase aus *Neurospora crassa* einer 8 Histidinreste umfassenden Verlängerung und der reifen Form (ab Aminäurerest 27 des Vorstufenproteins) des Ecm10.

pFB4 (pYES Su9 His8 SSC1)

Für die Herstellung eines Expressionsplasmides von Ssc1 mit einer N-terminalen His8-Verlängerung wurde wie für pFB3 beschrieben vorgegangen. Mit den Primern SSC1pYES5' und SSC1pYES3' wurde der DNS-Abschnitt für das reife Ssc1 amplifiziert, mit *Bgl*III und *Sac*I geschnitten und in das vorbereitete Plasmid subkloniert. Mit Hilfe dieses Konstruktes kann ein chimäres Protein unter der Expressionskontrolle des Gal1-Promotors exprimiert werden, das aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase aus *Neurospora crassa* einer 8 Histidinreste umfassenden Verlängerung und der reifen Form (ab Aminäurerest 21 des Vorstufenproteins) des Ssc1 besteht.

pFB5 (pYX132 ECM10)

Zur Expression von *ECM10* in Hefezellen wurde auf die Hefepiasmidserie pYX132 zurückgegriffen. Die für *ECM10* kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der Primer ECM10pYX5' und ECM10pGEM-3' amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *Mfe*I und *Sac*I geschnitten. Das Fragment wurde in das zuvor mit *Eco*RI und *Sac*I linearisierte Plasmid pYX132 ligiert.

pFB6 (pYX132 SSC1)

Zur Expression von *SSC1* in Hefezellen wurde in ähnlicher Weise verfahren wie oben für *Ecm10* beschrieben. Die für *SSC1* kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der Primer SSC1pYX5' und SSC1pYES-3' amplifiziert und mit den Restriktionsemzymen *Eco*RI und *Sac*I geschnitten. Das Fragment wurde in das zuvor mit *Eco*RI und *Sac*I linearisierte Plasmid pYX132 ligiert.

pFB7 (pGEM4 MRS2 FL)

Mit Hilfe der Primer MRS2N1 und MRS2C1 wurde die *MRS2*-Sequenz amplifiziert, das resultierende Produkt mit *Eco*RI und *Sal*I geschnitten und in pGEM4 ligiert.

pFB8 (pGEM4 MRS2 (1-344)-DHFR^{mut})

Mit Hilfe der Primer MRS2N1 und MRS2C2 wurden die ersten 1044bp der *MRS2*-Sequenz amplifiziert. Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten und in pGEM4 *Hel*C37-DHFR^{mut} ligiert, das bereits die Basensequenz für DHFR^{mut} enthielt.

pFB9 (pGEM4 DHFR-MRS2 (337-470))

Mit Hilfe der Primer MRS2N2 und MRS2C3 wurden die letzten 381 bp der *MRS2*-Sequenz amplifiziert. Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* geschnitten und in pGEM4 DHFR-Hel37C an Stelle der Hel37C-Sequenz ligiert.

pFB10 (pGEM4 DHFR-MRS2^{mut} (337-470))

Mit Hilfe der Primer MRS2M3 und MRS2M4 wurde die gesamte pFB9-Sequenz amplifiziert. Anschließend wurden die Enden des Amplifikates mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut und das DNS-Fragment intramolekular mit sich selbst ligiert.

pFB11 (pGEM4 MRS2 FL^{mut})

Es wurden zwei separate PCR-Ansätze mit dem pFB7-Plasmid als Matrize durchgeführt. Bei der Durchführung mit der Primerkombination MRS2N1 und MRS2M2 wurde ein 1040 bp-Fragment amplifiziert, das mit *EcoRI* und *SacI* verdaut in pGEM4 ligiert wurde. In dieses Plasmid wurde das bei der PCR mit der Primerkombination MRS2M1 und MRS2C1 aus pFB7 erhaltene 480 bp-Fragment ligiert, das zuvor mit *SacI* und *SalI* verdaut worden war.

pFB12 (pYX142 Mrs2 FL HA)

Zur Expression von MRS2 mit einem Hämagglutininepitop (HA-Tag) in Hefezellen wurde auf die Hefepiasmidserie pYX142 verwendet. Die *MRS2*-Sequenz wurde mit Hilfe der Primer MRS2N1 und MRS2pYXC1 amplifiziert und mit den Restriktionsemzymen *EcoRI* und *SalI* geschnitten. Das Fragment wurde in pYX142 ligiert.

pFB13 (pYX142 Mrs2 FL^{mut} HA)

Zur Expression von MRS2^{mut} mit einem Hämagglutininepitop (HA-Tag) in Hefezellen wurde die Hefepiasmidserie pYX142 verwendet. Die MRS2^{mut}-Sequenz wurde mit Hilfe der Primer MRS2N1 und MRS2pYXC1 mit pFB11 als Matrize amplifiziert und mit den Restriktionsemzymen *EcoRI* und *SalI* geschnitten. Das Fragment wurde in pYX142 ligiert.

Tab. 3: Oligonukleotide

ECM10pGEM-5'	(5'-GGG AAGCTT ACCATGTTACCATCATGGAAAGCC-3')
ECM10pGEM-3'	(5'-GGG GAGCTC TTATTTATTTTCTCTCCCGTTC-3')
ECM10pYES5'	(5'-GG GATCC CAGTCAACCAAAATTCCAGATG-3')
SSC1pYES5'	(5'-GGG AGATCT CAGTCAACCAAGGTTCAAGG-3')
SSC1pYES3'	(5'-CCCC GAGCTC TTTTTACTGCTTAGTTTCACCAG-3')
ECM10pYX5'	(5'-GGG CAATTG ACCATGTTACCATCATGGAAAGCC-3')
SSC1pYX5'	(5'-GGG GAATTC ACCATGCTTGCTGCTAAAACATAC-3')
MRS2N1	(5'-GGG GAATTC GCCACCATGAATCGGCGTCTCCTGG-3')
MRS2C1	(5'-GGG GTCGAC TCAATTTTCTTGTCTTCTATCAAC-3')
MRS2C2	(5'-GGG GATCC TTCACTCTCCTCGATGAAATTC-3')
MRS2N2	(5'-GGG TCTAGA TAAGAATTTTCATCGAGGAGAGTG-3')
MRS2C3	(5'-GGG AAGCTT TCAATTTTCTTGTCTTCTATCAAC-3')
MRS2M1	(5'-GGG GAGCTC CAATTTTAATTCTTTAAGATCCGTG-3')
MRS2M2	(5'-GGG GAGCTC GGTGATATAAAGGGCAGAAAC-3')
MRS2M3	(5'-GGG GATATC CAATTTTAATTCTTTAAGATCCGTG-3')
MRS2M4	(5'-GGG GATATC GGTGATATAAAGGGCAGAAAC-3')
Mrs2pYXC1	(5'-GGG GTCGAC GATTTTCTTGTCTTCTATCAACC-3')

2.2 Hefegenetische Methoden

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Die folgenden Hefestämme wurden benutzt, bzw. im Zuge dieser Arbeit hergestellt:

Tab. 4: Verwendete Hefestämme

Abkürzung	Stamm	Genotyp	Referenz
D273-10B,	D273-10B	Wildtyp	ATCC, Nr. 24657
W303-1A	W303-1A	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Rothstein und Sherman, 1980
Bwt	PK82	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52</i>	Gambill <i>et al.</i> , 1993
YPH 499	YPH 499	<i>a ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3</i>	Sikorski und Hieter, 1989
YPH 500	YPH 500	α <i>ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3</i>	Sikorski und Hieter, 1989
YPHEcm10His ₆	YPH500 Ecm10His ₆	α <i>ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3 ecm10 :: ECM10his₆ TRP1</i>	diese Arbeit
<i>ssc1-3</i>	PK83	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-3(LEU2)</i>	Gambill <i>et al.</i> , 1993
<i>Δecm10</i>	YPH500ΔECM10	α <i>ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3 ecm10 :: TRP1</i>	diese Arbeit
<i>ssc1-3/Δecm10</i>	PK83 ΔECM10	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-3(LEU2) ecm10 :: TRP1</i>	diese Arbeit
<i>ssc1-3/His₈Ecm10</i>	PK83 pFB3	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-3(LEU2) His₈Ecm10(URA3)</i>	diese Arbeit
<i>ssc1-3/His₈Ssc1</i>	PK83 pFB4	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-3(LEU2) His₈Ssc1(URA3)</i>	diese Arbeit
JD100	JD100	α <i>leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-1(LEU2)</i>	J. Davis and E. Craig
JD100 Ecm10	JD100 pFB5	α <i>leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-1(LEU2) ECM10 (TRP1)</i>	diese Arbeit
JD100 Ssc1	JD100 pFB6	α <i>leu2-3,112 lys2 Atrp1 ura3-52 ssc1-1(LEU2) SSC1 (TRP1)</i>	diese Arbeit
YPHSsc1/Ecm10	YHH499 Ssc1/ECM10	<i>a ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3 SSC1/ECM10 :: HIS3</i>	diese Arbeit
W306	BY4743	<i>a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<i>Δmrs2</i>	Y31631	<i>a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; mrs2::kanMX4/mrs2::kanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
<i>Δmrs2 -</i>	W306 11H pYX142	<i>a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; mrs2::kanMX4/mrs2::kanMX4</i> mit Plasmid pYX142 (LEU2)	diese Arbeit
<i>Δmrs2 / Mrs2</i>	W306 11H pFB12	<i>a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; mrs2::kanMX4/mrs2::kanMX4</i> mit pFB12	diese Arbeit
<i>Δmrs2 / Mrs2^{mut}</i>	W306 11H pFB13	<i>a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; mrs2::kanMX4/mrs2::kanMX4</i> mit pFB13	diese Arbeit
<i>Δoxa1</i>	aW303ΔOXA1	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 oxa1 :: HIS3</i>	Hell <i>et al.</i> , 1997
<i>Δoxa1 / Δmba1</i>	bW303/YPH499	<i>a ade3 his3(4) leu2 lys4 trp1 ura3 oxa1 :: HIS3 mba1 :: HIS3</i>	Preuss <i>et al.</i> , 2001
<i>Δyta10</i>	YHA101	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 yta10 :: URA3</i>	Tauer <i>et al.</i> , 1994
<i>oxa1^{TS}</i>	aW303OXA-TS	<i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 oxa1-1</i>	Hell <i>et al.</i> , 1997

a) Herstellung des Hefestammes **YPHEcm10His₆** mit carboxyterminalem His₆-Epitop an Ecm10

Zur Herstellung eines Hefestammes, der das Protein Ecm10 mit einem carboxyterminalen Hexahistidylepitop exprimiert wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde von dem Plasmid SSB13 ein DNS-Abschnitt amplifiziert, der die Sequenz für 6 Histidylreste, ein STOP-Kodon, eine Terminationssequenz sowie das Hefe *URA3*-Gen enthielt. Dazu wurden die Primer HH15 und HH16 eingesetzt. Das Amplifikat wurde in Hefezellen des Wildtypstammes YPH500 transformiert und ersetzte nach homologer Rekombination das Endogene *ECM10*-Gen. Zur Selektion wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Urazil kultiviert. Isolierte Klone wurden mittels PCR (2.2.5) analysiert.

HH15: (5'-AAGAACAGTGACAATCCTGAAACTAAGAACGGGAGAGAAAATAAAG
AAGAACAAAAGCTT-3')

HH16: (5'-CGTTGAAAGGATATATGGTTTACGCTTACTATTTTCGTTTGATGTAAGC
GGCCAGTGCCAAGC-3')

b) Herstellung des Hefestammes **YPH Ssc1/Ecm10** mit chromosomalem Austausch des Carboxyterminus von Ssc1 gegen den von Ecm10

Zur Herstellung eines Hefestammes, der ein chimäres Protein aus Ssc1 und Ecm10 exprimiert, wurde in ähnlicher Weise wie unter a) beschrieben vorgegangen:

Zunächst wurde aus pRS413 das *HIS3*-Gen amplifiziert. Dazu wurden die Primer HH64 und HH65 eingesetzt. HH64 enthielt am 5'-Ende die Basensequenz von Basenpaar 1855 bis 1902 des *SSC1*-Gens sowie die Basenpaare 1882 bis 1935 des *ECM10*-Gens, während HH65 an seinem 5'-Ende einen zum 3'-Ende des *SSC1*-Gens homologen Bereich von 40 Basenpaaren beinhaltete. Das Amplifikat wurde in Zellen des Wildtypstammes YPH499 transformiert. Mit Hilfe homologer Rekombination kann das Amplifikat in das Chromosom integriert werden und das 3'-Ende des *SSC1*-Gens ersetzen. Zur Selektion wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Histidin kultiviert. Isolierte Klone wurden mittels PCR (2.2.5) analysiert.

HH64: (5'- GAATTGCAAACCTTCCTCGATGAAATTGTTTGAACAATTATACAAGAA
CAGTGACAATCCTGAAACTAAGAACGGGAGAGAAAATAAATAAGCAGA
TTGTACTGAGAG-3')

HH65: (5'- CCCGCTTAATGCGAGGAAACAGTACTTATATAAACGATATATGTTTG
GGATCCGTCGAGTTCAAG -3')

c) Disruption des ECM10-Gens zur Erzeugung von **YPH500 Δ ECM10** und **PK83 Δ ECM10**

Für die Disruption des *ECM10*-Gens wurde das unter 2.1.11 beschriebene Disruptionsplasmid pFB2 eingesetzt. Das Plasmid wurde mit *EcoRI* linearisiert und in die Hefestämme YPH500 und PK83 transformiert. Dabei wurde über homologe Rekombination eine TRP1-Kassette anstelle des *ECM10*-Gens in das zelluläre Genom integriert. Zur Selektion wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Tryptophan kultiviert. Isolierte Klone wurden mittels PCR (2.2.5) analysiert.

d) Herstellung der Hefestämme ***ssc1-3/His₈Ecm10***; ***ssc1-3/His₈Ssc1***; **JD100 *Ecm10***; **JD100 *Ssc1***; ***Δ mrs2 -***; ***Δ mrs2 /Mrs2***; ***Δ mrs2 /Mrs2^{Mut}***

Alle oben genannten Stämme wurden gemäß der unter 2.2.4 beschriebenen Methode durch Transforamtion der Plasmide pFB3 – pFB6 sowie pFB12 und pFB13 hergestellt und durch Wachstumskontrolle auf Selektivmedium sowie Nachweis der Expressionsprodukte mittels Western Blot (2.5.3) verifiziert.

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte wie von (Rose *et al.*, 1990; Guthrie und Fink, 1991) beschrieben. Das Standard-Medium war YPD. Als nichtfermentierbare Kohlenstoffquelle wurde Glycerin statt Glukose verwendet. Um die Expression von Genen zu induzieren, die unter Kontrolle des GAL1-Promotors waren, wurde YPGal-Medium verwendet. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurde SD-Medium herangezogen, das den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert war. Um bei diploiden Stämmen Sporulation zu induzieren, wurde Minimal-Sporulationsmedium verwendet, das mit ¼ der für SD-Medium angegebenen Menge von Aminosäuren supplementiert wurde. Die Selektion gegen das URA3-Gen erfolgte auf 5-FOA-Medium. Zur Kultivierung auf festen Medien wurde 2 % Bacto-Agar hinzugefügt. In flüssigen Medien erfolgte die Kultivierung unter Schütteln (130 rpm) in Erlenmeyerkolben.

Standardtemperatur für die Kultivierung von *S. cerevisiae* war 30°C. Für temperatursensitive Mutanten war 24°C die permissive und 37°C die nicht-permissive Temperatur.

YPD-Medium: 1 % Bacto-Hefe-Extrakt, 2 % Bacto-Pepton, 2 % Glukose

YPG-Medium: 1 % Bacto-Hefe-Extrakt, 2 % Bacto-Pepton, 3 % (v/v) Glycerin

- YPGal-Medium: 1 % Bacto-Hefe-Extrakt, 2 % Bacto-Pepton, 2 % Galaktose
- SD-Medium: 0,17 % Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren; 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 % Glukose; nach dem Autoklavieren wurden noch die entsprechenden Marker zugesetzt. (20 mg/ml Adenin, 20 mg/ml Uracil, 20 mg/ml Tryptophan, 20 mg/ml Histidin, 30 mg/ml Leucin, 30 mg/ml Lysin)
- 5-FOA-SD-Medium: 0,17 % Yeast Nitrogen Base; 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% 5-Fluor-Orotsäure; 0,05 g/l Uracil; 2 % Glukose; 2 % Agar; nach dem Autoklavieren wurden noch die entsprechenden Marker zugesetzt.

2.2.3 Herstellung transformationskompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Von einer frisch bewachsenen YPD-Platte wurde eine 50 ml YPD Flüssigübernachtskultur des zu transformierenden Hefestamms angeimpft und bis zu einer A_{578} von etwa 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Bactifuge 5 min 3000rpm) mit Wasser sowie 0,1 M Lithiumacetat gewaschen und in 500 μl 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen wurden in 50 μl Aliquots geteilt und anschließend sofort transformiert.

2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Li-Acetat-Methode

Die unter 2.2.3 erhaltenen Zellen wurden sedimentiert und nacheinander mit den folgenden Lösungen überschichtet: 1. 240 μl PEG, 2. 36 μl 1 M Li-Acetat (pH 8,0), 3. 50 μl Lachsspermien-DNS, 4. 34 μl wässrige DNS-Lösung (je nach Bedarf Plasmid-DNS oder PCR-Produkt). Die Zellen wurden mit Hilfe eines Rüttlers für 1 min bei maximaler Einstellung resuspendiert und 30 min bei 30°C oder im Falle von ts-Mutanten bei permissiver Temperatur inkubiert. Nach einer Temperaturerhöhung auf 42° für die Dauer von 20–25 min wurden die Zellen von der Transformationslösung abgetrennt, nach Wiederaufschlännen in Wasser auf SD-Platten ausplattiert und für 3-4 Tage inkubiert.

PEG-Lösung: 50 % (w/v) PEG3350 (autoklavieren)

Li-Acetat: 1 M Li-Acetat (pH stellt sich automatisch auf 8,0 ein, autoklavieren)

- SD-Platten: 0,17 % Yeast Nitrogen Base; 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 % Glukose; 2 % Agar; nach dem Autoklavieren wurden noch die entsprechenden Markeramino-säuren zugesetzt.
- 5-FOA-SD-Platten: 0,17 % Yeast Nitrogen Base; 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % 5-Fluor-Orotsäure; 0,05 g/l Uracil; 2 % Glukose; 2 % Agar; nach dem Autoklavieren wurden noch die entsprechenden Marker zugesetzt.

2.2.5 Nachweis von Mutationen im Genom von *S. cerevisiae*

Chromosomale Manipulationen wurden nach der von (Huxley *et al.*, 1990) beschriebenen Methode unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (2.1.5) kontrolliert. Dabei ermöglichten Primer, die auf der 5'-Seite und der 3'-Seite des zu untersuchenden Gens hybridisieren, die Synthese eines Fragments, über dessen Größe die korrekte Integration der Markerkassette verfolgt werden konnte. Die Größe unterscheidet sich dabei nach erfolgter Integration von der in der Wildtyp-Situation.

Pro Hefestamm wurde eine möglichst geringe Menge eines Zellklons in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 μl einer Zymolyaselösung (1 mg/ml in H_2O) zugesetzt und für 10 min bei RT stehengelassen um die Zellwand der Hefezellen durchlässig zu machen. Nach Isolierung der Sphäroplasten durch Zentrifugation wurden diese für 5 min bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und in 25 μl PCR-Mix resuspendiert. Nach dem Überschichten mit Mineralöl wurde der folgende PCR-Zyklus angewendet: Zunächst erfolgte eine einmalige Inkubation für 2 min bei 94°C danach die folgenden drei Inkubationsschritte: 1. 30 sec 94°C, 2. 30 sec 50°C, 3. 30 sec 72°C. Diese wurden 25-mal wiederholt und abschließend die Proben auf 4°C gekühlt. Die noch enthaltenen Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation abgetrennt und 10 μl des amplifikathaltigen klaren Überstandes auf einem Agarosegel analysiert.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden aus wässrigen Lösungen durch Zusatz von 12 % Trichloressigsäure (TCA) und 30 min Inkubation auf Eis gefällt. Die Proben wurden für 20 min bei 26.000 g

abzentrifugiert, mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und im jeweils benötigten Puffer aufgenommen.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach (Laemmli, 1970). Hierfür wurden Glasplatten von 160 x 180 mm und Abstandhalter von 1 mm Dicke verwendet. Die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid wurde zwischen 10 und 18%, bzw. 0,1 und 0,6 % Endkonzentration variiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA für 2-3 h. Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder auf Nitrocellulose transferiert.

Trennlösung: 10-16 % Acrylamid; 0,1-0,6 % Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS (zur Polymerisation 0,1 % APS; 0,03 % TEMED)

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

Bodengellösung: 20 % Acrylamid; 0,1-0,6 % Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS (zur Polymerisation 0,05 % AMPS; 0,25 % TEMED)

10x-Gellaufpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 8,3; 3,8 M Glycin; 1 % (w/v) SDS

2.3.3 Coomassiefärbung von Gelen

Die Gele wurden für 15 min in 0,1 % Coomassie Brillant Blau R-250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure und anschließend für 1 bis 2 h in 50 % Methanol; 10 % Essigsäure inkubiert.

2.3.4 Autoradiographie und Densitometrie

Radioaktiv markierte Proteine, die auf Nitrocellulose transferiert worden waren, wurden nach Trocknen unter einer Rotlicht-Wärmelampe bei RT auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie).

Die Intensitäten von Banden auf den Röntgenfilmen wurden durch Densitometrie mit Hilfe eines Scanners bzw. mit Hilfe des TINA-Imagers gemessen.

2.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981; Kyhse-Anderson, 1984). Hierfür wurde das Gel auf eine mit Blotpuffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen mehreren Lagen aus befeuchtetem Filterpapier zwischen zwei Graphitplatten platziert, die als Elektroden dienen. Es wurde für 1,5 bis 2 h bei 160 mA transferiert. Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit Wasser gewaschen und in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt.

Blotpuffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS

Ponceau S-Färbelösung: 0,2% Ponceau S in 3 % TCA

2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt. Ihr liegt die Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 an Proteine zugrunde. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes wird von 465 nm auf 595 nm verschoben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit je 1 ml einer 1:5 verdünnten Farbstofflösung (Biorad) gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe einer Eichkurve, gewonnen aus der Messung einer Standardverdünnungsreihe mit IgG aus Rind (Biorad), in die Konzentration umgerechnet.

2.3.7 Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine *in vitro*

Um mitochondriale Vorstufenproteine mit [³⁵S] zu markieren, wurde die jeweilige cDNS mit Hilfe der SP6-RNS-Polymerase in mRNS transkribiert (Pelham und Jackson, 1976)

und diese dann in Kanninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976).

2.3.7.1 Transkription

Es wurden 120 µl Premix, 10 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G und 10-20 µg DNS gemischt, mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und 4,5 µl RNasin (40 U/µl) und 1,5 µl SP6-Polymerase (25 U/µl) zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min bei -80°C wurde die ausgefällte RNS abzentrifugiert (30000 g, 30 min, 2 °C), der Überstand abgenommen, die RNS bei 30°C vorsichtig getrocknet und in 50 µl H₂O, 1 µl RNasin (40 U/µl) gelöst.

10X-Translationssalze: 400 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 60 mM Mg-Acetat; 20 mM Spermidin
Premix: 1 ml 10x-Translationssalze; 20 µl 50 mg/ml BSA; 200 µl 0,5 M DTT;
50 µl 100 mM ATP; 50 µl 100 mM CTP; 50 µl 100 mM GTP; 50 µl
100 mM UTP; H₂O ad 10 ml

2.3.7.2 Translation in Retikulozytenlysat

Um *in vitro* Vorstufenprotein zu translatieren, wurden 23 µl Kanninchen-Retikulozytenlysat, 0,5 µl RNasin, 1 µl Aminosäuren-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 4 µl [³⁵S]Methionin (10 mCi/ml) und 5 µl RNS gemischt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 30°C inkubiert, und 0,2 M Methionin wurde zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min wurde der Translationsansatz in der Ultrazentrifuge bei 45000 rpm, 2°C für 30 min sedimentiert, um die durch ihre hydrophoben Domänen leicht aggregierenden Anteile der Transkripte, die ohnehin nicht mehr importierbar sind, zu entfernen. Zuletzt wurde der so behandelte Translationsansatz aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.7.3 Synthese von Vorstufenproteinen mit TNT©-Lysat-Kit

Neben den oben beschriebenen Methoden zur Herstellung von mit [³⁵S]-Methionin markierten Vorstufenproteinen wurde auch der kommerziell vertriebene TNT©-Lysat-Kit der Firma Promega eingesetzt. Dieser ermöglicht die Translation von DNS ohne vorherige

Isolation von mRNS. Dazu wurde über Genomed Jetstar-Säulen aufgereinigte Plasmid-DNS mit Konzentrationen zwischen 0,8 bis 1,2 mg/ml DNS eingesetzt. Gemäß einem Standardansatz wurden 50 µl TNT[®]-Kanninchen-Retikulozytenlysat mit 4 µl TNT[®]-Reaktionspuffer, 2 µl TNT[®]-SP6-RNS-Polymerase, 2 µl Aminosäuremischung ohne Methionin (enthält alle proteinogenen Aminosäuren in einer Konzentration von 1 mM), 4 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) 2 µl TNT[®]-RNaseinhibitor und 28 µl H₂O in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden 8 µl DNS (0,8 bis 1,2 mg/ml) hinzugegeben und für 1,5 h bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 16 µl 0,2 M Methionin und 32 µl 1,5 M Saccharose beendet. Anschließend wurden aggregierte Anteile und Ribosomen mit unvollständigen Translationsprodukten durch Zentrifugation bei 45.000 rpm für 30 min bei 4°C sedimentiert und der lösliche Überstand aliquotiert und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

2.3.8 Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung von löslichen mitochondrialen Proteinkomplexen

Terminale Proteinsequenzen aus mindestens 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten erlauben eine einfache und selektive Aufreinigung an immobilisiertem Ni²⁺. Unter milden Bedingungen können auch größere Proteinkomplexe isoliert werden, die nur ein Protein mit entsprechender Oligohistidindomäne enthalten. Es wurden Mitochondrien (100 µg) bei 4°C für 30 min in Lysepuffer, der je nach Fragestellung 2 mM ATP 4 mM MgCl₂ oder 1 mM EDTA enthielt, solubilisiert. Nach Zentrifugation (20000 g 10 min 4°C), um unvollständig lysiertes Material abzutrennen, wurden die Extrakte für 2 h mit in Lysepuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Qiagen) bei 4°C inkubiert. Das sedimentierbare Material wurde zweimal mit Lysepuffer und einmal mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Zusatz von Laemmli-Puffer, der zusätzlich 500 mM Imidazol enthielt, eluiert und mit Hilfe von SDS-Page und Western Blot analysiert.

Lysepuffer: 0,2 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM Na-Acetat, 15 mM Imidazol, 1 mM PMSF

2.3.9 Bestimmung des Faltungszustandes mitochondrial lokalisierter Proteine

2.3.9.1 Faltungstest für DHFR der Maus

Die Bestimmung des Faltungszustandes für importierte Dihydrofolatreduktase (DHFR) erfolgte weitgehend gemäß der von Ostermann *et al.*, 1989 beschriebenen Methode. Das Fusionsprotein Su9(1-69)-DHFR bestehend aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase (ersten 69 Aminosäurereste) aus *Neurospora crassa* und der Dihydrofolatreduktase aus Maus (Pfanner *et al.*, 1987) wurde wie unter 2.4.6 beschrieben in isolierte Mitochondrien importiert. Nicht importiertes Protein wurde mit 100 µg/ml Trypsin entfernt (siehe 2.4.7.1). Die Mitochondrien wurden sedimentiert (4 min, 9000 g, 4°C) und in SHKCl bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit 0,5 % Triton X-100 für 15 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (10 min, 17.500 g, 4°C) wurden die Hälfte des Überstandes und der Sedimente für 10 min auf Eis mit 10 µg/ml Proteinase K in SHKCl behandelt. Das lösliche Protein befand sich im Überstand, das nativ gefaltete Protein war Proteinase K-resistent. Aggregiertes Protein wurde nur im Sediment gefunden und war Proteinase K-sensitiv. Nach Zusatz von 1 mM PMSF wurden die Proben TCA-gefällt (siehe 2.3.1) und durch SDS-PAGE (siehe 2.3.2), Radiographie und Densitometrie (siehe 2.3.4) analysiert.

SHKCl: 0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 80 mM KCl

2.3.9.2 Aggregationstest für Var1

Der Test für die Aggregation des mitochondrial kodierten Var1-Proteins wurde in der von (Herrmann *et al.*, 1994a) beschriebenen Weise durchgeführt. Nach *in organello*-Translation (siehe 2.4.11) wurden die Mitochondrien in Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei 4°C getaumelt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 30000 g zentrifugiert, das sedimentierte Material direkt in Probenpuffer aufgenommen und die löslichen Anteile des Überstands durch Zusatz von TCA gefällt (siehe 2.3.1).

Lysepuffer: 0,1 % TX100; 150 mM NaCl; 10 mM Tris; 5 mM EDTA; 2 mM PMSF

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

Die Präparation von Hefezelleextrakten erfolgte durch mechanischen Aufschluss von Hefezellen mit Hilfe von Glasperlen. Es wurde dabei in Anlehnung an (Ausubel *et al.*, 1991) 2 A₅₇₈ Zellen einer frischen Übernachtskultur durch kurze Zentrifugation gesammelt, in 20 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und mit ca. 2/3 des Volumens Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) versetzt. Es wurde 2 min mit einem Vortexmixer bei voller Leistung gemischt. Die Suspension wurde 3 min auf 95°C erhitzt und weitere 60 µl Laemmli-Puffer zugesetzt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben kurz abzentrifugiert (10000 g, 1 min, RT) um Glasperlen und nichtlysierte Zellen zu sedimentieren. Die so erhaltenen Überstände wurden anschließend mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

1xLaemmli-puffer: 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8

2.4.2 Anzucht von *S. cerevisiae* zur Isolation von Mitochondrien

Die Anzucht der Hefekulturen erfolgte in Laktatmedium. Dazu wurden Hefezellen aus einer Glycerin-Stammkultur auf YPGal-Platten ausgestrichen und bei 24°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur von 50 ml angeimpft, diese mit 140 rpm geschüttelt und über mehrere Tage passagiert, ohne dass die Zellen die logarithmische Wachstumsphase verließen. Hiervon wurde dann die Hauptkultur angeimpft, die nach Erreichen einer A₅₇₈ von 1 bis 1,5 geerntet wurde. Das Feuchtgewicht der Zellen betrug dann etwa 2,5 g/l.

Um Glycerin-Stammkulturen herzustellen, wurden Hefezellen direkt von einer frischen Agarplatte abgekratzt, mit 15% Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

Laktatmedium: 2,2 % (v/v)Laktat; 0,3 % Hefeextrakt; 0,1 % Galaktose; 0,1 % KH₂PO₄; 0,1 % NH₄Cl; 0,05 % CaCl₂; 0,05 % NaCl; 0,06 % MgSO₄; 0,0003 % FeCl₃; pH 5,5 mit KOH

2.4.3 Subfraktionierung von Hefezellen

Zur Untersuchung der Lokalisation von Proteinen wurden Mitochondrien wie unter 2.4.4 beschrieben isoliert und über einen Saccharose-Stufengradienten weiter aufgereinigt. Dazu wurden sie auf einen Gradienten bestehend aus 20 %, 30 %, 40 %, 50 % und 60 % Saccharose (w/w) in 20 mM Hepes pH 7,4, 80 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF geladen und zentrifugiert (240.000g, 15 min, 2°C, Beckman-SW41-Rotor). Die Mitochondrien in der Höhe zwischen der 40 % und der 50 % Saccharose-Stufe wurden gesammelt, durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 2°C) aufkonzentriert, mit SEH gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in SEH resuspendiert.

Die Isolierung von Mikrosomen und Cytosol erfolgte im Wesentlichen wie von (Caplan und Douglas, 1991) beschrieben. Hefezellen wurden wie unter 2.4.4 beschrieben sphäroplastiert, in Lysepuffer resuspendiert, mit einem Glashomogenisator aufgebrochen und zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 2°C). Der Bodensatz wurde nochmals in Lysepuffer resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationen wurden vereinigt, erneut bei 10.000 g zentrifugiert und der so erhaltene Überstand in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde auf einen 30 % Percoll-Gradienten (v/v) in Lysepuffer gegeben und zentrifugiert (76.000 g, 50 min, 2°C, Beckman-Ti50-Rotor). Die obere der beiden Banden dieses Gradienten wurde gesammelt und durch Zentrifugation (150.000 g, 1 h, 2°C Beckman-Ti50-Rotor) aufkonzentriert. Die mikrosomalen Membranen bildeten die eine Bande oberhalb des transparenten Percoll-Sediments und wurden gesammelt. Die zweite Hälfte des 10.000 g-Überstandes wurde bei 150.000 g zentrifugiert (1 h, 2°C, Beckman-Ti50-Rotor); der Überstand enthielt die löslichen cytosolischen Proteine.

SEH Puffer: 600 mM Sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

Lysepuffer: 20 mM Hepes/KOH pH 7,4, 600 mM Sorbitol, 1 mM DTT, 3 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, je 1 µg/ml Leupeptin, Aprotinin, Chymostatin

2.4.4 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung erfolgte nach der von (Daum *et al.*, 1982) beschriebenen Methode. Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA10, 5 min, 4000 rpm, RT), mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 25°C in 2 ml/g Feuchtgewicht (FG) Waschpuffer für 15 min geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g FG in 6,5 ml Zymolyasepuffer bei 25 oder 30 °C für 30 bis 60 min geschüttelt. Die Bildung von Sphäroplasten wurde durch osmotische Lyse in Wasser getestet. Hierfür wurden von Beginn der Inkubation an wiederholt 50 µl der sphäroplastenhaltigen Lösung in 2 ml H₂O gemischt und nach 2 min die A₅₇₈ gemessen. Sobald diese gegenüber dem Anfangswert auf 20 % gesunken war, wurden die Sphäroplasten geerntet (5 min, 3300 rpm, 2°C) und in 6,5 ml/g FG eiskaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch 15 Stöße in einem Glashomogenisator auf Eis aufgeschlossen und anschließend mit dem gleichen Volumen Homogenisierungspuffer versetzt. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 4000 rpm (JA20, 2°C) wurden die Mitochondrien aus dem Überstand mit 12000 rpm sedimentiert, in 10 ml kaltem SEH-Puffer gewaschen, mit SEH eine Proteinkonzentration von 10mg/ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Waschpuffer: 0,1 M Tris; 10 mM DTT (pH nicht eingestellt)

Zymolyasepuffer: 1,2 M Sorbitol; 4 mg Zymolyase pro g FG; 20 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 0,2 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA und 1 mM PMSF

SEH-Puffer: 600 mM Sorbitol; 1 mM EDTA; 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4

2.4.5 Subfraktionierung von Mitochondrien

Zur Erzeugung von Mitoplasten, d.h. Mitochondrien mit geöffneter Außenmembran, wurden Mitochondrien in eiskaltem hypotonischem Puffer sog. Schwellpuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurden Mitochondrien in eiskaltem isotonischen Puffer resuspendiert (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4).

Für die Proteasebehandlung von Mitoplasten wurde dem hypotonischen Puffer 50 bis 200 µg/ml Proteinase K zugesetzt. Zur Beendigung wurden 2 mM PMSF hinzugegeben.

Durch Carbonat-Extraktion wurden lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abgetrennt. Dazu wurden Mitoplasten in 0,1 M Na₂CO₃, 1 mM PMSF resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (226.000g, 40 min 2°C, Beckman-Ti50-Rotor). Das Sediment enthielt die integralen Membranproteine, während sich die löslichen und peripher mit der Membran assoziierten Proteine im Überstand befanden.

Vor der Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine mit TCA aus den Überständen gefällt 2.3.1.

Schwellpuffer: 2 mg/ml mitochondriales Gesamtprotein; 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

2.4.6 Import von Proteinen aus Retikulozytenlysat

Der Import von *in vitro* synthetisierten Vorstufenproteinen erfolgte je nach Bedarf in Importpuffer in An- oder Abwesenheit von 3 % BSA. Ein typischer Importansatz enthielt 60 µg Mitochondrien in einem Endvolumen von 900 µl. Der Import wurde durch Zugabe von 2 % (v/v) Lysat gestartet und erfolgte für unterschiedliche Zeiten bei 25 °C. Je nach Fragestellung wurden 2 mM NADH oder 2 mM ATP zugegeben. Anschließend wurden die Mitochondrien abzentrifugiert, mit 200 µl SHKCl gewaschen und in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Importpuffer: [3 % BSA (fettsäurefrei)]; 0,5 M Sorbitol; 80 mM KCl; 10 mM Mg-Acetat; 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 2,5 mM MnCl₂

SHKCl: 80 mM KCl; 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 600 mM Sorbitol

SDS-Probenpuffer: 2 % (w/v) Natriumlaurylsulfat; 10 % (v/v) Glycerin; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol.

2.4.7 Mitochondriale Sublokalisierung von *in vitro* importierten Proteinen

2.4.7.1 Nachbehandlung von Mitochondrien mit Protease

Um die Importeffizienz zu bestimmen, wurden die Mitochondrien nach dem Proteinimport mit Protease behandelt und nicht importierte Vorläuferproteine abgedaut. Dafür wurden dem Importansatz 20 bis 100 µg/ml Proteinase K und nach einer Inkubation von 30 min auf Eis 2 mM PMSF zugegeben. Gegebenenfalls wurde anstelle von Proteinase K auch Trypsin in einer Konzentration von 50 µg/ml bei 0°C für 15 min eingesetzt und anschließend durch Zusatz von 250 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI) abgestoppt.

2.4.7.2 Herstellung von Mitoplasten durch osmotischen Schock

Die Außenmembran von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* kann durch osmotischen Schock geöffnet werden (Glick, 1991). Dazu wurden Mitochondrien in Import- oder Translationspuffer mit 3% BSA resuspendiert (1 mg mitochondriales Protein/ml), langsam mit 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4 zehnfach verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um die Zugänglichkeit von Proteinen des Intermembranraumes zu überprüfen, wurden Mitoplasten mit Protease behandelt, wie es unter 2.4.7.1 für Mitochondrien beschrieben ist.

2.4.8 Herstellung von Translokationsintermediaten mit Methotrexat

Der gefaltete Zustand von DHFR kann durch das Dihydrofolatanalogon Methotrexat (MTX) und NADPH stabilisiert werden. Dies erlaubt es, stabile Translokationsintermediate von DHFR-Fusionsproteinen herzustellen, in denen die DHFR-Domäne nicht entfaltet und somit nicht importiert werden kann. Vor dem Import wurden die Fusionsproteine hierfür in Importpuffer in Anwesenheit von 1 μ M MTX und 2 mM NADPH für 10 min auf Eis vorinkubiert (1-5 % Retikulozytenlysat). Je nach Fragestellung enthielt der Ansatz zusätzlich noch 2 mM ATP. Die eigentliche Importreaktion wurde durch Zugabe von Mitochondrien bzw. Mitoplasten und 2 mM NADH gestartet.

2.4.9 Senkung der ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix

Zur Senkung des mitochondrialen Gehalts an Matrix-ATP wurde das Enzym Apyrase verwendet, das ATP zu AMP hydrolysiert. Nach Beendigung der normalen Importreaktion wurden Mitochondrien in Apyrasepuffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4)) reisoliert (4 mg/ml) und mit 80 U/ml Apyrase versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 25°C wurden die Mitochondrien je nach Fragestellung reisoliert und in Laemmli-Puffer lysiert oder mit entsprechendem Lysepuffer versetzt und für NiNTA-Fällungen eingesetzt.

2.4.10 Bestimmung des Membranpotentials in isolierten Mitochondrien

Der Fluoreszenzfarbstoff 3,3'-Dipropylthiodicarbocyanin Iodid (DiSC₃(5), Molecular Probes) wurde zur Messung des Membranpotentials in isolierten Mitochondrien eingesetzt. Dieser Farbstoff wird in Abhängigkeit vom Membranpotential in Mitochondrien aufgenommen, was eine Abnahme des emittierten Fluoreszenzsignals zur Folge hat. Die Höhe der Abnahme der Signalintensität korreliert direkt mit der Höhe des Membranpotentials. Zur Messung wurde ein SPEX FluoroMax Fluorimeter eingesetzt. Die Anregungswellenlänge war 620 nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde bei 670 nm gemessen.

Zur Messung wurden in einer Küvette 3 ml Puffer vorgelegt, zu denen DiSC₃(5) zu einer abschließenden Konzentration von 1 µM zugesetzt wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Nach Zusatz von 100 µg Mitochondrien nahm das Signal stark ab und stabilisierte sich auf einem bestimmten Niveau. Danach wurde NADH zur Stimulierung des Membranpotentials wie bei Standardimportreaktionen bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt und die weitere Absenkung des Fluoreszenzsignals verfolgt. Abschließend wurde durch Zusatz von 1 µM Valinomycin das Membranpotential zerstört, worauf die Fluoreszenz wieder anstieg. Die Differenz zwischen dem Signal vor und nach Valinomycinzusatz diente als relatives Maß für die Höhe des Membranpotentials.

Puffer: 0,6 M Sorbitol; 0,1 % (w/v) BSA; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA,
20 mM KH₂PO₄, pH 7,2
DiSC₃(5)-Lsg: 2 mM DiSC₃(5) in DMSO

2.4.11 Markierung mitochondrialer Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien (*in organello* Translation)

Zur radioaktiven Markierung mitochondrialer Translationsprodukte *in organello* wurde ein modifiziertes Protokoll nach (McKee und Poyton, 1984) eingesetzt. Dazu wurden 30 µg Mitochondrien in 50 µl Translationspuffer, der zusätzlich 5 U/ml Pyruvatkinase enthielt, für 5 min bei 25-30°C inkubiert. Danach wurden 2,5 µl [³⁵S]-Methionin (10 µCi/ml) zugegeben. Nach 10-20 min Inkubation bei 25-30°C wurde die Markierung durch Zugabe von 20 µl 200 mM unmarkiertem Methionin und 20 µg/ml Puromycin beendet. Die Mitochondrien wurden reisoliert (5 min 10000g, 4°C) mit 100 mM Methionin, 0,6 M

Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 80 mM KCl gewaschen und in Laemmli-Puffer lysiert oder je nach Fragestellung für weitere Behandlungen in entsprechenden Puffern eingesetzt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben nicht gekocht, sondern für 15 min bei 4°C geschüttelt, um die irreversible Aggregation hydrophober Proteine zu vermeiden.

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

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Kopplung synthetischer Peptide an Ovalbumin

Zur Herstellung epitopspezifischer Antikörper wurden chemisch synthetisierte Oligopeptide als Antigene verwendet. Die nach Merrifield, 1963, von der Firma Neosystem S.A., Straßburg, synthetisierten Peptide wurden über einen endständigen Cysteinylnrest an das aktivierte Trägerprotein Ovalbumin gekoppelt. Dazu wurden 2 mg mit Maleimid aktiviertes Ovalbumin (Pierce) in 200 μ l Wasser gelöst, unverzüglich mit 2 mg in 200 μ l in 50 mM KPi, pH 7,4 gelöstem Peptid versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugat wurde über eine PD10-Säule gereinigt. Das so erhaltene Antigen konnte in Portionen zu 200 μ g zur Immunisierung von Kanninchen eingesetzt werden.

2.5.2 Erzeugung polyklonaler Antiseren

Um polyklonale Antiseren zu gewinnen, wurden Kanninchen nach der von Knudsen, 1985 beschriebenen Methode immunisiert. Als Antigene wurden an Ovalbumin gekoppelte Oligopeptide eingesetzt. Die proteinhaltige Lösung wurde auf 1 mg/ml verdünnt. 200 μ l davon wurden mit 200 μ l Immunstimulanz (Titermax bzw. bei Folgeinjektionen Freund's inkomplettes Adjuvans) versetzt und ca. 1 min auf dem Rüttler homogen vermischt. Die so erhaltenen Emulsionen wurden an mehreren Stellen subkutan injiziert. 2 Wochen nach der

Erstinjektion wurde eine Folgeinjektion (bestehend aus Proteinlösung gemischt mit Freund's inkomplette Adjuvans) appliziert. Nach weiteren 10 Tagen wurden aus der Ohrvene 25-30 ml Blut entnommen. Nach dessen Gerinnung wurde daraus nach Zentrifugation (5 min 3000 g, 12 min 12.000 g) Serum gewonnen. Das darin enthaltene Komplementsystem wurde hitzeinaktiviert (56°C, 30 min). Die oben genannte Prozedur aus Folgeinjektion und Blutung wurde in regelmäßigen Abständen von 4-6 Wochen wiederholt.

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen („Western Blot“)

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer 30 min in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgte für 90 min die Immundekoration mit spezifischen Antisera, die je nach Titer zwischen 1:250 und 1:2000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt waren. Danach wurden die Membranen für 5 min in 0,05 % (w/v) Triton X-100 in TBS und zweimal für je 5 min in TBS gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Kaninchen-Immunglobulin G gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt worden war. Diese Antikörper wurden 1:5000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt und die Membranen für 30 bis 90 min darin inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) nachgewiesen (Vacherau, 1989). Die mit Substratlösung inkubierten Membranen wurden auf Röntgenfilmen zwischen 1 sec und 10 min exponiert.

1xTBS: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

2.6 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Buchler, Braunschweig:	ECL Reagens für Western Blots, Taq-DNA-Polymerase, [³⁵ S]-Methionin (1100-1400 Ci/mmol)

BioRad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege)
Biozym, Hameln:	SP6 Polymerase
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base (without amino acids)
Fluka, Buchs, CH:	Trichloressigsäure
Genomed, Bad Oeyenhausen:	„Jetstar“-Kit
Gerbu, Gaiberg	Acrylamid, Ampicillin
GIBCO-BRL, Karlsruhe:	Agarose (ultra pure, low endoosmosis)
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Nestle-Alete, München:	Magermilchpulver
New England Biolabs, Schwalbach:	Restriktionsenzyme
Pharmacia, Freiburg:	7-Methyl-Guanosintriphosphat (7mGpppG)
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Reticulocytenlysat, pGEM-Vektoren, TNT®-Lysat
Riedel de Haen, Seelze:	K-Acetat
Roche:	NTP, NADH, Proteinase K, DTT, Lysozym, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, dNTP, Oligomycin, Restriktionsenzyme, Tris
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembran (0,2 mm), Faltenfilter, Filterpapier
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Siliconlösung, Spermidin, TEMED
Sigma ARK, Darmstadt:	Oligonukleotide
Sigma, München:	Ammoniumperoxodisulfat (APS), BSA (fettsäurefrei), Glycerin, β -Mercaptoethanol, Molekulargewichtstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A

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

2.7 Geräte und sonstige Materialien

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Entwicklermaschine Gevamic® 60
Amersham Pharmacia, Freiburg:	Spannungsgeräte, Laserdensitometer, Densitometer, Chromatographiesysteme wie Äkta Prime®
Appligene, Heidelberg:	Agarosegel-Imaging-System „The Imager™“
Beckman Instruments, München:	Kühlzentrifugen J2-21 und Avanti J-25, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich Rotoren und Zentrifugenröhrchen
Bender und Hobein, München:	Mixer zum Vortexen
Biometra, Göttingen:	TRIO-Thermoblock
BioRad, München:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler
Eppendorf, Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße
Fuji:	Röntgenfilme, Phospho-Imager BAS-1500
Genser, Rothenburg:	Geltrockner Jet1
Heraeus Christ, Osterode:	Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge
Ika, Staufen:	Magnetrührer
JY HORIBA, Longjumeau, Frankreich:	Fluoreszenzphotometer SPEX FluoroMax
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada:	DNAMAN 4.1 (Molekularbiologische Software)
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
MWG-Biotech Ag, Ebersberg:	Primus 25 Personal Thermal Cycler System für PCR
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Semi-Dry-Blotkammern
Schleicher & Schüll, Dassel:	Whatman-3MM-Filterpapier
Schütt, Göttingen:	"Bioclav"-Autoklav
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-240 und UV-120-02
Sigma, München:	Tisch-Kühlzentrifugen
Werkstatt des Instituts, München:	Semidry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern

3 Ergebnisse

3.1 Ecm10 ist ein neues Mitglied der Familie der mitochondrialen Hsp70-Proteine

Das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält 14 Gene für Hsp70-Proteine, von denen 13 Proteine bereits charakterisiert bzw. lokalisiert worden waren. Für zwei Proteine dieser Klasse, Ssc1 und Ssq1, war eine Lokalisation in der mitochondrialen Matrix gezeigt worden (Craig *et al.*, 1989; Strain *et al.*, 1998). Ecm10 ist das 14. Protein dieser Klasse und zeigt die höchste Ähnlichkeit zu den beiden mitochondrialen Hsp70-Proteinen (Abb. 5). Seine Funktion und subzelluläre Lokalisation ist unbekannt.

Ecm10 Sc	MLPSWKAFKAHNL.....RIITRFQSTKIPDAVIGIDLGTNSAV	41
Ssc1 ScMLAAKNILNRSLSLSSFRITATRLQSTKVGCSVIGIDLGTNSAV	44
Ssq1 ScMLKSGRLNFKLKNINSRLYSTNPQLTKKIVIGIDLGTNSAV	42
DnaK EcMGKIIIGIDLGTNSAV	16
Ecm10 Sc	AMFBG...KVRLLIENAGSRRTTPSVVAFKDG.....ERLVGHPA	79
Ssc1 Sc	AMFBG...KVRLLIENAGSRRTTPSVVAFKDG.....ERLVGHPA	82
Ssq1 Sc	AYTRDSNDKKSATLIENBGGRTTPSVVAFDVKSSPQNKDQMKTLVGMFA	92
DnaK Ec	AMFBG...TTRVLIENAGSRRTTPSIIAVTODG.....ETLVGHPA	54
Ecm10 Sc	KROSVMNSNTLFAKRLIGRFDDAEVQVDINQVPEKIVKH.SNCAWV	128
Ssc1 Sc	KROAVVNSNTLFAKRLIGRFDDAEVQVDIKQVPEKIVKH.SNCAWV	131
Ssq1 Sc	KRONANNSNTLFAKRLIGRFNDRVQVDMAVMPKIVKCESNCAWV	142
DnaK Ec	KROAVVNSNTLFAKRLIGRFDDAEVQVDVSIPEKIVHAAD.NCAWV	103
Ecm10 Sc	EAR.NRTYSPAQGGFVLNKMRTEAAYLAKSVKNVAVTVPAYFNDAORQ	177
Ssc1 Sc	EAR.GOTYSPAQGGFVLNKMRTEAAYLAKSVKNVAVTVPAYFNDAORQ	180
Ssq1 Sc	STSNGLIQSPQIASILLKYLKQISEBYLGEKVNLAIVTVPAYFNDAORQ	192
DnaK Ec	EYK.GOKMAEPOISAEVLLKMKKTAEPYLGEEVTEAVTVPAYFNDAORQ	152
Ecm10 Sc	ATKDAGQILGLAVRVVNEPTAAALVGLDKSE.PKVIAVFDLGGGTFDI	226
Ssc1 Sc	ATKDAGQIVGLAVRVVNEPTAAALVGLEKSD.SKVVAVFDLGGGTFDI	229
Ssq1 Sc	ATKDAGKLAGLAVRVVNEPTAAALSFGILDKRNNGLIAVFDLGGGTFDI	242
DnaK Ec	ATKDAGQILGLVRRILNEPTAAALVGLDKGTGRTIIVFDLGGGTFDI	202
Ecm10 Sc	SILLIDNG...LPEVKSITNGDTHLGGDFDLYLLOEILISHKKE...T	268
Ssc1 Sc	SILLIDNG...LPEVKSITNGDTHLGGDFDLYLLEIVSRKTE...T	271
Ssq1 Sc	SILLIDEDG...LPEVKSITNGDTHLGGDFDNLVNYLIDTIIHNPEIL	288
DnaK Ec	SILLIDVDEGKTEPEVLAITNGDTHLGGDFDRLINYLVEEKKL...Q	248
Ecm10 Sc	GIDLSDNRMAVQRIREAAEKAKIQLSSTLSTENLPPITADAAGPKHIRM	318
Ssc1 Sc	GIDLSDNRMAVQRIREAAEKAKIQLSSTVSTENLPPITADAAGPKHIRM	321
Ssq1 Sc	REBITKMRRTMQRKLDVSEERAKIQLSHVAKTFELPEVYKSK...HLRV	334
DnaK Ec	GIDLSDNDPAMQRIREAAEKAKIQLSQAQQTVDNLPYITADATGPKHIRM	298
Ecm10 Sc	PFSRVOLENITAPLIDRTVDVKKKALDARITASDISEVLLVGGMRMPK	368
Ssc1 Sc	KFSRAQFETLTAPLVKRTVDVKKKALDADGLSTSDISEVLLVGGMRMPK	371
Ssq1 Sc	PMTEEELDNMILSLINRTIPPVKQALDADLEPEDIDEVLLVGGMRMPK	384
DnaK Ec	KVTRAKLESVLEDEVNSLEPEKVALDADGLSVSDIDVLLVGGMRMPK	348
Ecm10 Sc	VADIVAKLFGKDPASKAVNPDDEVALGAAGCAAVLGSVTVLILLDVTPL	418
Ssc1 Sc	VVEIVKSLFGKDPASKAVNPDDEVALGAAGCAAVLGSVTVLILLDVTPL	421
Ssq1 Sc	IRSVVADLFGKDPNSNPNPDDEVALGAAGCGGILGSIKIVILLDVTPL	434
DnaK Ec	VQKRVAEFEGKDPBRKAVNPDDEVALGAAGCGVITLPEVVKLILLDVTPL	398
Ecm10 Sc	LGIEITGGVFTRLIPRNTIIPKKSQIFSTAAAGCQTSVEVIRFOGERBLV	468
Ssc1 Sc	LGIEITGGVFTRLIPRNTIIPKKSQIFSTAAAGCQTSVEVIRFOGERBLV	471
Ssq1 Sc	LGIEITGGVFTRLIPRNTIIPKKSQIFSTAAAGCQTSVEVIRFOGERBLV	484
DnaK Ec	LGIEITGGVFTRLIPRNTIIPKKSQIFSTAAAGCQTSVEVIRFOGERBLV	448
Ecm10 Sc	KENKLIENFTLACHPPEKGTPOHVTFFDIDAGHINVSARKATLAKKDS	518
Ssc1 Sc	RENKLIENFTLACHPPEKGTPOHVTFFDIDAGHINVSARKATLAKKDS	521
Ssq1 Sc	RNNKLIENFTLACHPPEKGTPOHVTFFDIDAGHINVSARKATLAKKDS	534
DnaK Ec	ANNSLIGQENFTLACHPPEKGTPOHVTFFDIDAGHINVSARKATLAKKDS	498
Ecm10 Sc	ITVAGASGLSDIEIDRMVNEAERYKNDRARRNALETANKADOLANDTEN	568
Ssc1 Sc	ITVAGASGLSENEEQMVNDAEKFKSQDEARKQALETANKADOLANDTEN	571
Ssq1 Sc	ITVIPNSGLSEBEAKLIEEANANRAQDNLIRORLELISKADIMISITEN	584
DnaK Ec	ITIKASSGLNEPEQKMRDAEANAEDRKFEEVLOTNRQGHILHSIR.	547
Ecm10 Sc	SIKRFFGKLDKTD.SORLKDQISSRELVSRQAGDE...VNDDVGTKI	614
Ssc1 Sc	SIKRFQKVDKAE.AQKVRDQTSKELVARVCGGSE...VNAELKTKI	617
Ssq1 Sc	LFRKRFKLLISSKEYSNIVEDKALRQAKNFKANBNDMSIDVNGIKKAI	634
DnaK Ec	...KQVIEAGDKLP.ADDKTAIESALTALETALKGED.....KAALTEAKM	588
Ecm10 Sc	DNLRITSSMKLFPOLYKN.....SDNPETKNGRENK.....	644
Ssc1 Sc	EELQTSMSKLFPEOLYKN.....DSNNNNNNNGNNAESGETKQ..	654
Ssq1 Sc	DALGRALKLFPQATKN.....QQNQK.....	657
DnaK Ec	QELAQVSKLMEIAQQQHAQQQTAGADASANNNAKDDVVDARFEEVVDKK	638

Abb. 5: Sequenzvergleich von Ecm10 mit den mitochondrialen Hsp70-Proteinen Ssc1 und Ssq1 sowie dem bakteriellen Homologen DnaK.

Die Aminosäuresequenzen der Hefeproteine Ecm10, Ssc1, Ssq1 und des *E. coli*-Homologen DnaK wurden mit Hilfe des Programms DNAMAN 4.11 erstellt. Konservierte Aminosäurereste wurden schwarz unterlegt, partiell konservierte Reste entsprechend dem Grad ihrer Ähnlichkeit farbig unterlegt.

Das für Ecm10 kodierende Gen, YEL030w, war zuvor von Lussier *et al.*, 1997 im Rahmen einer genetischen Untersuchung nach Mutanten mit einer höheren Sensitivität gegen die zelloberflächenangreifende Chemikalie Calcofluor Weiß beschrieben worden. Daher wurde das Gen auch als „Extra Cellular Mutant 10, *ECM10*, bezeichnet.

3.1.1 Ecm10 ist ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix

Aufgrund der Ähnlichkeit von Ecm10 zu Ssc1 und Ssq1 konnte eine mitochondriale Lokalisation vermutet werden. Darüber hinaus legte die Aminosäuresequenz das Vorhandensein einer aminoterminalen Präsequenz nahe. Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Ecm10 wurde ein Hefestamm hergestellt (YPHEcm10His₆), in dem Ecm10 mit einem carboxyterminalen Hexahistidylepitop unter der Kontrolle seines endogenen Promotors chromosomal exprimiert wurde. Dieses Epitop ermöglichte es, das Protein Ecm10-His₆ spezifisch neben Ssc1 immunochemisch nachzuweisen.

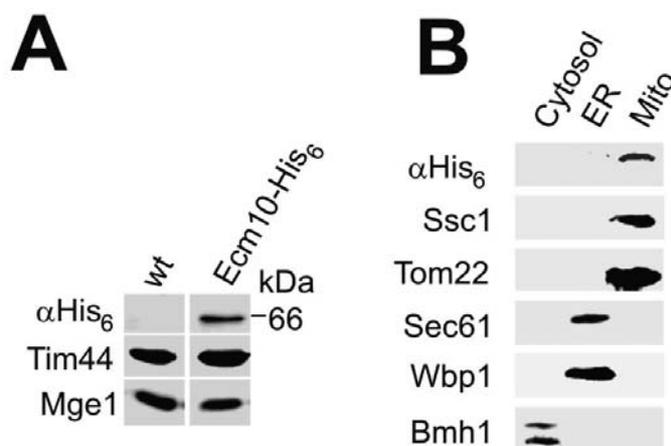


Abb. 6: Ecm10 befindet sich in Mitochondrien.

A: Ecm10-His₆ kann spezifisch nachgewiesen werden. Es wurden 50µg mitochondriales Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Immundekoration analysiert. Dabei wurde eine aus dem Wildtyp stammende Probe mit einer Probe aus dem YPHEcm10His₆-Stamm verglichen, der Ecm10-His₆ exprimiert. Für den spezifischen Nachweis wurde ein monoklonales Antiserum gegen das His₆-Epitop sowie zur Ladekontrolle Antiseren gegen die mitochondrialen Proteine Tim44 und Mge1 eingesetzt. **B:** Ecm10-His₆ ist ein mitochondriales Protein. Subzelluläre Fraktionierung von Hefezellen und Anreicherung für die verschiedenen Zellkompartimente. Nach SDS-PAGE wurden die einzelnen Kompartimentanreicherungen unter Nachweis der folgenden Markerproteine gezeigt: Bmh1 (cytosolisches Protein), Wbp1 (Endoplasmatisches Retikulum, ER), Sec61 (Endoplasmatisches Retikulum, ER), Tom22 (Mitochondrien, Mito), Ssc1 (Mitochondrien, Mito).

Wie aus Abb. 6A ersichtlich ist, konnte Ecm10-His₆ in Zellextrakten, die aus dem Stamm YPHEcm10His₆ gewonnen wurden, mit Hilfe des spezifischen Antiserums gegen das Hexahistidyl-Epitop nachgewiesen werden. Bei der Auftrennung auf einem SDS-

Polyacrylamidgel migriert das Ecm10-His₆-Protein als Bande mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 66 kDa. Diese ist etwas geringer als die anhand der Aminosäuresequenz berechnete „theoretische“ Masse von 70 kDa, was auf eine aminoternale Prozessierung von Ecm10 oder ein durch den isoelektrischen Punkt (pI 5,8) bedingtes verändertes Laufverhalten des Proteins zurückzuführen sein könnte.

Um Ecm10 in der Zelle zu lokalisieren, wurden Hefezellen des Stammes YPHEcm10His₆ subfraktioniert und die Anteile durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immundekoration analysiert (Abb. 6B). Ecm10-His₆ konnte spezifisch in den Mitochondrien enthaltenden Fraktionen nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Annahme einer Lokalisierung von Ecm10 in Mitochondrien.

Für den weiteren Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Ecm10 wurden *in vitro*-Importexperimente mit isolierten Hefemitochondrien durchgeführt. Dazu wurde mit [³⁵S]-Methionin markiertes Ecm10 in Retikulozytenlysat synthetisiert. Das Vorstufenprotein wies eine apparente Molekülmasse von 68 kDa (v) auf (Abb. 7, Spur1). Dies entspricht in etwa der auf Basis der Aminosäuresequenz errechneten Molekülmasse von 70 kDa.

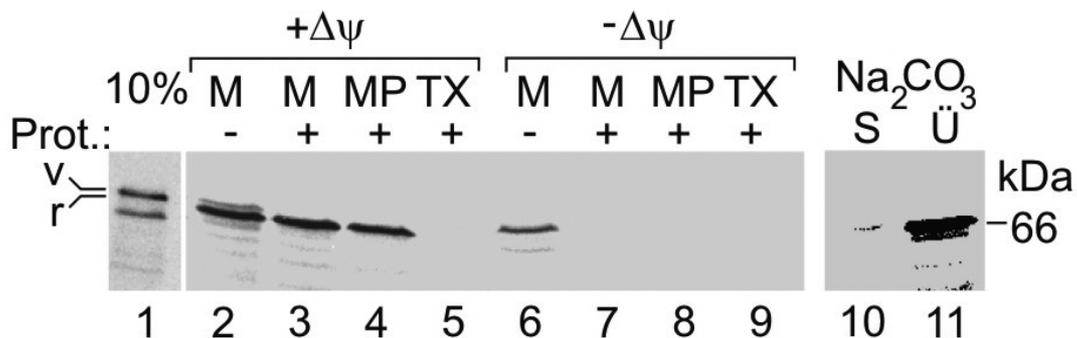


Abb. 7: Ecm10 befindet sich in der mitochondrialen Matrix.

Mit [³⁵S] Methionin markiertes Ecm10 (v) wird für 25 min bei 25°C in isolierte Mitochondrien importiert. Durch Zusatz von 5µM Valinomycin (Spuren 6-9) wurde das Membranpotential zerstört. Nach dem Import wurden die Ansätze geteilt und wie angegeben (PK) mit 50µg/ml Proteinase K behandelt (Spuren 3 und 7) oder zusätzlich entweder einer hypotonischen Schwellung (Spuren 4 und 8) oder einer Lyse mit 1 % Triton X-100 (TX Spuren 5 und 9) unterworfen. In den Spuren 10 und 11 wird die Rückgewinnung nach Import und Carbonatextraktion dargestellt (S, Sediment; Ü, Überstand). Zum Vergleich wurden 10 % der eingesetzten Menge in Spur 1 aufgetragen. r: reifes Ecm10 nach MPP-Prozessierung, v: Ecm10 mit Präsenz vor MPP-Prozessierung, M: Mitochondrien; MP: Mitoplasten.

Nach dem Import wurde es zu einer reifen Form (r) mit einer apparenten Molekülmasse von 66 kDa prozessiert (Spur 2-3), die dem endogenen Ecm10 entspricht (vgl.

Abb. 6). Das gereifte Ecm10 war auch nach selektiver Öffnung des Intermembranraumes der Mitochondrien durch osmotischen Schock vor dem Abbau durch von außen zugesetzte Protease geschützt. Nach Vorinkubation mit dem Ionophor Valinomycin konnte Ecm10 nicht in Mitochondrien importiert werden. Somit zeigt der Import die für Matrixproteine typische Membranpotentialabhängigkeit. Nach einer im Anschluss an den Import durchgeführten Behandlung mit ungepuffertem Natriumcarbonat konnte Ecm10 nur im Überstand, nicht aber in der Sedimentationsfraktion der Membranproteine detektiert werden (Abb. 7, Spur 10/11). Daraus kann geschlossen werden, dass Ecm10 ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix ist. Somit ist Ecm10 neben Ssc1 und Ssq1 das dritte Hsp70-Protein in diesem Subkompartiment. Ein Vergleich der unter normalen Wachstumsbedingungen vorhandenen Mengen von Ecm10 und Ssc1 mittels Western Blot verdeutlichte, dass Ecm10 in deutlich geringeren Mengen vorliegt als Ssc1 (Faktor 10-100 nicht gezeigt). Demnach ist Ecm10 kein abundantes Protein der mitochondrialen Matrix.

3.1.2 Untersuchungen zur Funktion von Ecm10

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass *ECM10* kein essentielles Gen ist (Smith *et al.*, 1996.) Seine Deletion führt zu keinerlei Wachstumsdefekten. Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen Ecm10 und Ssc1 legte eine ähnliche Funktion beider Proteine nahe.

3.1.2.1 Mutationen in *SSC1* und *ECM10* führen zu synthetischen Wachstumsdefekten

Zunächst wurde eine mögliche Funktionsüberlappung zwischen Ecm10 und Ssc1 auf genetischem Wege untersucht. Da *SSC1* in Hefe ein essentielles Gen ist, wurde auf die thermolabile Mutante *ssc1-3* zurückgegriffen, die eine Punktmutation im Bereich der ATPase-Domäne trägt (Gambill *et al.*, 1993). Dieses mutierte *ssc1-3*-Gen bewirkt, dass Ssc1-3 bei 37°C aggregiert und funktionsuntüchtig wird. Aber auch bei permissiver Temperatur ist Ssc1-3 im Vergleich zum Wildtyp-Protein nicht voll funktionsfähig. Vor dem genetischen Hintergrund dieses thermolabilen *ssc1-3*-Gens wurde *ECM10* disruptiert und der Wachstumsphänotyp des resultierenden Hefestammes *ssc1-3Δecm10* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert.

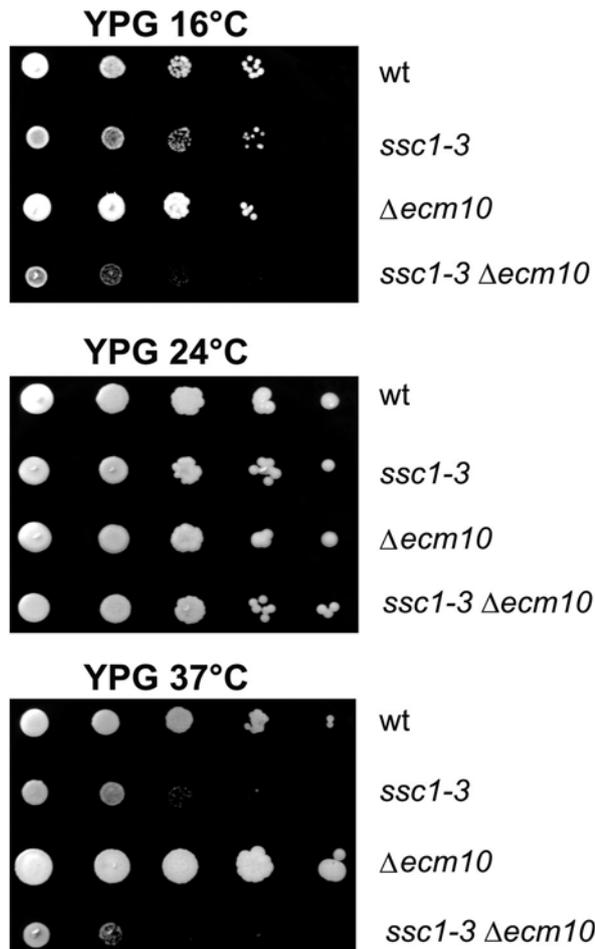


Abb. 8: Ecm10 wird im *ssc1-3*-Stamm für das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei niedriger Temperatur benötigt.

Wildtyp (wt) *ssc1-3*, Δ *ecm10* und *ssc1-3* Δ *ecm10* Zellen wurden auf YP-Medium mit 2 % Glycerin (YPG) bei 24°C über Nacht angezogen. Von diesen Kulturen wurden 1:10 Verdünnungen auf YPG-Platten ausgebracht und bei den angegebenen Temperaturen für 4 Tage inkubiert.

Das Wachstum der Stämme YPH500 (wt), *ssc1-3*, Δ *ecm10* und *ssc1-3* Δ *ecm10* wurde auf YPD- (nicht gezeigt) und YPG-Festmedium bei 16°C, 24°C und 37°C gemessen. Ein im Vergleich zu Wildtyp- und *ssc1-3*-Zellen verändertes Wachstum von *ssc1-3* Δ *ecm10* ist dann zu erwarten, wenn Ecm10 und Ssc1 überlappende Funktionen besitzen, oder wenn Ecm10 den Faltungszustand des mutierten *ssc1-3*-Proteins beeinflusst. Bei nicht permissiver Temperatur zeigte *ssc1-3* auf YPD-Medium ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindertes Wachstum. Gleiches galt auch für die Doppelmutante *ssc1-3* Δ *ecm10*. Bei 16°C und bei 24°C wuchsen alle Stämme mit vergleichbarer Geschwindigkeit (nicht gezeigt). Das Wachstum der untersuchten Stämme auf YPG ist mit dem Wachstum auf YPD vergleichbar (Abb. 8). Allerdings zeigte der Δ *ecm10*-Stamm im Vergleich zum Wildtypstamm bei 37°C ein leicht verbessertes Wachstum. Im Gegensatz zur Inkubation auf glukosehaltigem Medium zeigte der Stamm *ssc1-3* Δ *ecm10* auf Medium mit Glycerin bei 16°C ein im Vergleich zum Wildtyp sowie zu den Einzelmutanten *ssc1-3* und Δ *ecm10* deutlich verlangsamtes Wachstum. Ecm10 ist somit notwendig für das Wachstum der *ssc1-3*-Mutante bei niedrigen Temperaturen auf

nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis für ein Überlappen der Funktionen von Ecm10 und Ssc1.

3.1.3 Funktionelle Charakterisierung von Ecm10

Die Funktion von Ssc1 ist in *S. cerevisiae* essentiell. Da Ecm10 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Ssc1 besitzt, sollte untersucht werden, ob oder inwieweit Ssc1 durch Ecm10 ersetzt werden kann.

3.1.3.1 Ecm10 kann Ssc1 *in vivo* nicht ersetzen

Um von vornherein Probleme eines unterschiedlichen Expressionsniveaus von Ecm10 und Ssc1 umgehen zu können (vgl. 3.1.1), sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von Ecm10 *in vivo* Ssc1 funktionell ersetzen konnte. Da Hefezellen ohne Ssc1 nicht lebensfähig sind, wurde auf die im Folgenden beschriebene Methode des „Plasmid-Shufflings“ zurückgegriffen (Sikorski und Boeke, 1991):

Soll ein essentielles Gen gegen eine Variante ausgetauscht werden, so wird zunächst das zu tauschende Gen auf einem Plasmid (Schutzplasmid), gegen das später selektioniert werden kann, in die Zelle eingeführt. Anschließend wird das chromosomale Gen deletiert. Der so erhaltene Stamm überlebt mit Hilfe des Schutzplasmides. In einem zweiten Schritt wird nun das Testplasmid mit der zu untersuchenden Erbinformation in die Zelle eingebracht. Im letzten Schritt kann jetzt gegen das Schutzplasmid selektioniert werden. Je nachdem, ob die zu testende Erbinformation funktionell ist oder nicht, werden lebensfähige oder gar keine Zellen erhalten. Dies ist Abb. 9 schematisch dargestellt.

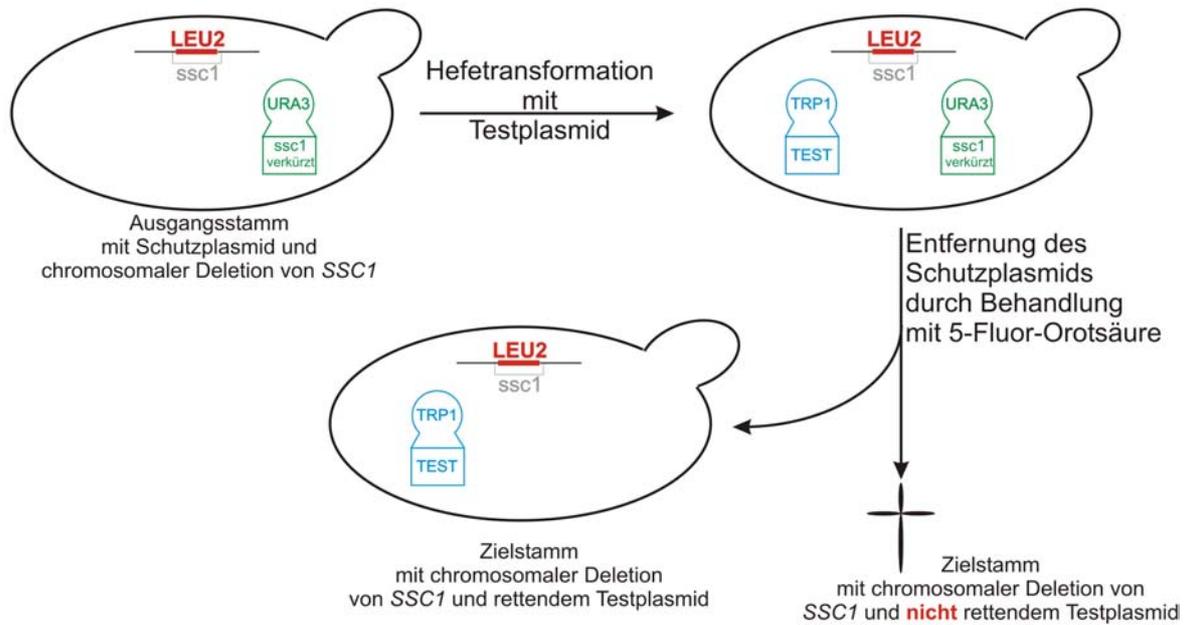


Abb. 9: Schematische Darstellung des „Plasmid shufflings“

Zur Beschreibung siehe Text

Zur Untersuchung der Funktionsüberlappung von *Ecm10* und *Ssc1* wurde von dem haploiden Hefestamm JD100 ausgegangen. Dieser enthält eine chromosomale Deletion von *SSC1* und gleichzeitig auf dem Schutzplasmid neben dem *URA3*-Gen eine um die letzten 19 Aminosäurereste verkürzte Form von *Ssc1*. Diese carboxyterminal verkürzte Variante von *Ssc1* ist voll funktionsfähig. Die Zellen dieses Stammes wurden entweder mit einem Testplasmid, welches das *ECM10*-Gen oder das *SSC1*-Gen unter der Expressionskontrolle des Trioseisomerasepromotors (TPI) enthielt transformiert (vgl. JD100 *Ecm10* und JD100 *Ssc1* 2.2.1).

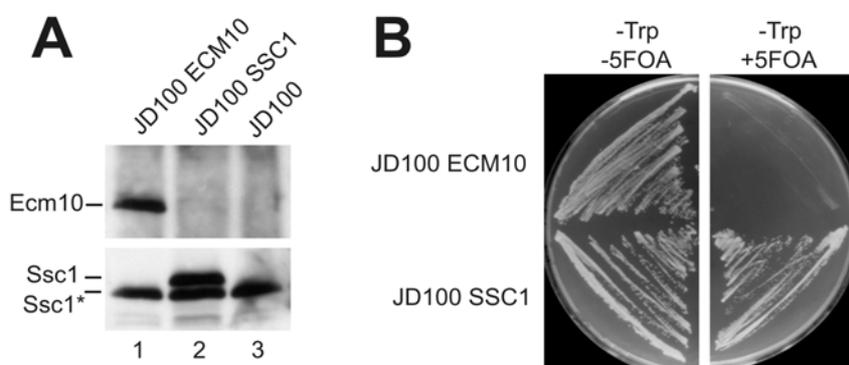


Abb. 10: *Ecm10* kann *Ssc1* *in vivo* nicht ersetzen.

A. Gesamtzellextrakte der angegebenen Hefestämme wurden gemäß 2.4.1 isoliert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Dabei wurden ein polyklonaler Antikörper gegen den

Carboxyterminus von *Ecm10* und ein polyklonaler Antikörper gegen das gesamte *Ssc1* eingesetzt. **B.** Die unter **A** analysierten Hefestämme wurden für 4 Tage in Abwesenheit oder Gegenwart von 5 Fluor-Orotsäure (5FOA) bei 30°C inkubiert.

Um die Expressionsniveaus der beiden Testplasmide zu analysieren, wurden Gesamtzellextrakte aus den transformierten Zellen durch Immundekoration analysiert (siehe Abb. 10A). Die nach der Transformation mit den Testplasmiden erhaltenen Stämme sollten über die carboxyterminal verkürzte Version von Ssc1 sowie zusätzlich über das jeweils Plasmid-kodierte überexprimierte Ecm10 bzw. Ssc1 verfügen. Wie in Abb. 10A gezeigt ist, war mit Hilfe des gegen den Carboxyterminus von Ecm10 gerichteten Antikörpers eine deutliche Überexpression des Proteins nachweisbar. Die normale Menge des endogenen Ecm10 lag unterhalb der Nachweisgrenze (vgl. Spur 1 zu 2 und 3 oberes Feld von Abb. 10A). Durch Dekoration mit dem für Ssc1 spezifischen Antikörper (Abb. 10A unteres Feld) konnten nur die beiden Varianten des Ssc1 nachgewiesen werden. Die in allen drei Stämmen vorhandene untere Bande (Ssc1*) stellte das durch das Schutzplasmid kodierte carboxyterminal verkürzte Ssc1 dar, während die nur in Spur 2 sichtbare obere Bande das auf dem Testplasmid kodierte Volllängenprotein repräsentierte. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl Ecm10 als auch Ssc1 korrekt exprimiert wurden.

Im zweiten Schritt der Methode des Plasmid-shufflings wurde die Funktionalität des überexprimierten Ecm10 bzw. Ssc1 untersucht. Dazu wurden die plasmidhaltigen Zellen mit 5-Flour-Orotsäure (5FOA) behandelt, was zum selektiven Verlust des *URA3*-Schutzplasmides führte.

Wie in Abb. 10B für zwei Stämme beispielhaft gezeigt ist, konnten ausschließlich solche Zellen die 5FOA-Behandlung überleben, deren Testplasmid das *SSC1*-Gen kodierte. Da im ersten Schritt nachgewiesen worden war, dass auch Ecm10 nach der Transformation überexprimiert wurde, scheint somit klar, dass Ecm10 Ssc1 *in vivo* nicht ersetzen kann.

In einem letzten Schritt sollte der Abschnitt der Proteinsequenz, der für die unterschiedliche Funktionalität von Ecm10 gegenüber Ssc1 verantwortlich sein könnte genauer lokalisiert werden. Daher sollte der Carboxyterminus von Ssc1, dessen Aminosäuresequenz von jener von Ecm10 etwas abweicht (vgl. Abb. 5), gegen den Carboxyterminus von Ecm10 ausgetauscht werden. Um die Problematik einer Überexpression zu umgehen, wurde die chromosomale Kopie von *SSC1* mittels homologer Rekombination direkt manipuliert. Die entsprechend der unter 2.2.1 beschriebenen Methode erhaltenen haploiden Zellen des Hefestammes YPH Ssc1/Ecm10 exprimierten nunmehr ein chimäres Ssc1, bei dem die letzten 19 Aminosäurereste gegen die 15 letzten Aminosäurereste von Ecm10 ersetzt worden waren. Falls die Anwesenheit des veränderten Carboxyterminus die Wechselwirkung von Ssc1 mit seinen Substraten und/oder Cofaktoren beeinträchtigt, so sollte dies zu einem veränderten Wachstumsphänotyp führen.

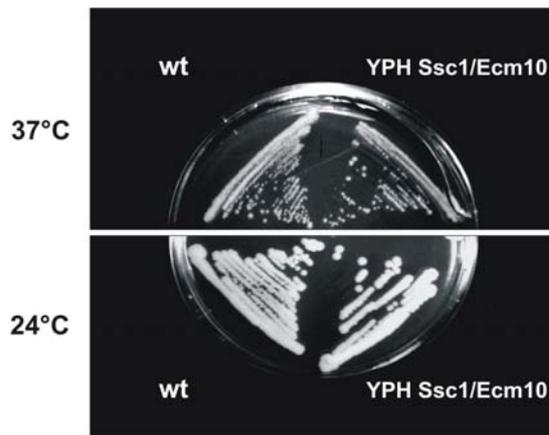


Abb. 11: Der Carboxyterminus von Ecm10 stört nicht die Funktion von Ssc1.

Der Wildtyp-Hefestamm YPH499 (wt) sowie der Mutantenstamm YPH Ssc1/Ecm10 wurde bei 24°C bzw. 37°C auf YPG-Medium für 3 Tage inkubiert.

Wie aus Abb. 11 ersichtlich zeigten die erhaltenen Transformanten unabhängig von der Temperatur und der eingesetzten Kohlenstoffquelle (nicht gezeigt) einen im Vergleich zum Wildtyp normalen Wachstumsphänotyp. Somit scheint der unterschiedliche Carboxyterminus nicht dafür verantwortlich zu sein, dass Ecm10 die Funktion von Ssc1 *in vivo* nicht übernehmen kann.

3.1.3.2 Ecm10 kann Ssc1 beim Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix ersetzen

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, dass Ssc1 *in vivo* nicht durch Ecm10 ersetzt werden kann, sollte im Folgenden geklärt werden, welche einzelnen Funktionen von Ssc1 *in vitro* durch überexprimiertes Ecm10 übernommen werden können. Für den Import von Polypeptidketten in die Matrix sind mehrere Zyklen der ATP-abhängigen Bindung von Ssc1 an die zu translozierende Polypeptidkette nötig. Die ATP-abhängige Wechselwirkung zwischen den essentiellen Proteinen der Translokationsmaschinerie Ssc1, Tim44 und Mge1 erlaubt den vektorialen Transport durch die Innenmembran der Mitochondrien (zur Übersicht siehe Neupert, 1997). Um zu testen, ob eine Überproduktion von Ecm10 zur Übernahme der Funktion von Ssc1 beim Proteinimport führt, wurde Ecm10 in der *ssc1-3*-Mutante überexprimiert (*ssc1-3Ecm10[↑]*). In diesem Stamm wird Ecm10 unter der Kontrolle des regulierbaren GAL1 Promotors exprimiert. Um Ecm10 eindeutig neben Ssc1-3 immunchemisch nachweisen und aufreinigen zu können, wurde eine Variante von Ecm10 überexprimiert, deren reife Form ein aminoterminales Oktahistidylepitop trägt. Da sich gereiftes Ecm10 und Ssc1 in ihrer Aminosäuresequenz lediglich am Carboxyterminus unterscheiden, wurde kein carboxyterminales Epitop eingeführt.

Die Punktmutation in Ssc1-3 führt zur Aggregation des Proteins infolge einer Inkubation bei 37°C. Damit verliert das mutierte Protein seine Fähigkeit, an translozierende

Polypeptidketten zu binden. Für die Importexperimente in isolierte Mitochondrien der Mutanten wurden das gut charakterisierte Fusionsprotein Su9(1-69)-DHFR sowie das Matrixprotein Yfh1 eingesetzt. Su9(1-69)-DHFR besteht aus den ersten 69 Aminosäureresten der Untereinheit 9 der F₁-ATPase aus *Neurospora crassa* und der Dihydrofolatreduktase (DHFR). Da Su9(1-69)-DHFR unter den normalen Importbedingungen - wenn nur geringe Mengen des radioaktiv markierten Vorstufenproteins transloziert werden müssen - sehr schnell und effizient importiert wird, wurde in Konkurrenz zu dem mit [³⁵S]-Methionin markierten Vorstufenprotein gleichzeitig unmarkiertes, rekombinant aus *E. coli* gereinigtes Protein importiert. Für den effizienten Import wird eine voll funktionsfähige Importmaschinerie benötigt. Nach Inaktivierung von Ssc1-3 durch Vorinkubation bei 37°C für 10 min wurden die Mitochondrien bei 25°C für die angegebenen Zeitabschnitte inkubiert und reisoliert. Anschließend wurde nicht importiertes Material durch Inkubation mit Proteinase K entfernt.

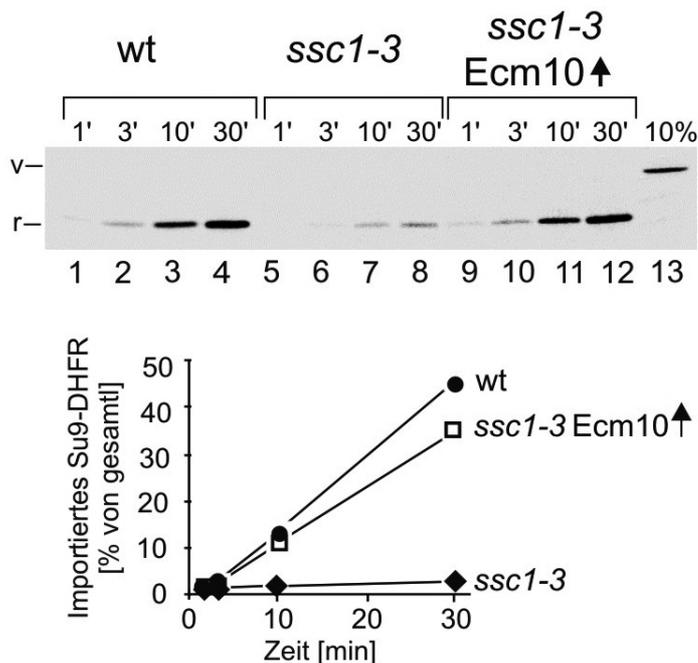


Abb. 12: Überexprimiertes *Ecm10* ermöglicht den Import von *Su9(1-69)-DHFR* in *ssc1-3*-Mitochondrien.

Mitochondrien aus Wildtypzellen (wt, Spuren 1-4), *ssc1-3* Zellen (*ssc1-3*, Spuren 5-8) und *ssc1-3* Zellen, die eine aminoterminal His₈-getaggte Version von *Ecm10* über-produzieren (*ssc1-3Ecm10*[↑], Spuren 9-12) wurden isoliert. Nach Induktion des temperatursensitiven Phänotyps durch Vorinkubation für 10 min bei 37°C und anschließend für

5 min bei 25°C mit einem ATP-regenerierenden System wurde der Import von gereinigtem Su9(1-69)-DHFR Vorstufenprotein (50µg/ml) bei 25°C durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mit Proteinase K behandelt. Zum Vergleich wurden in Spur 13 10 % des pro Importreaktion eingesetzten Materials aufgetragen. Die Signale für das importierte gereifte Protein wurden densitometrisch quantifiziert und graphisch als Anteil des insgesamt pro Reaktion eingesetzten Vorstufenproteins dargestellt.

Nach 30 min waren fast 50 % des zugesetzten Vorstufenproteins in Wildtyp-Mitochondrien importiert (Abb. 12 Spuren 1-4). Dagegen wurden im gleichen Zeitraum weniger als 5 % des Proteins in *ssc1-3*-Mitochondrien importiert. Dieses Ergebnis steht im

Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung von *ssc1-3* von Gambill *et al.*, 1993 (Abb. 12 Spuren 5-8). Im Gegensatz dazu war die Importeffizienz des Vorstufenproteins in Mitochondrien, die aus *ssc1-3Ecm10*[↑] isoliert worden waren mit der Importeffizienz in Wildtyp-Mitochondrien vergleichbar (Abb. 12 Spuren 9-12). Dies bedeutet, dass überexprimiertes Ecm10 die Importeffizienz von Su9(1-69)-DHFR auf Wildtypniveau steigern kann.

Auch Yfh1 wird in der Zelle als Vorstufenprotein an cytosolischen Ribosomen hergestellt und nach dem Import in die mitochondriale Matrix zwischen den Aminosäuren 20 und 21 sowie 50 und 51 von MPP prozessiert (Branda *et al.*, 1999). Da Yfh1 sehr kompakt gefaltet vorliegt, benötigt es zu seinem Import eine voll funktionsfähige Ssc1-Importmaschinerie (Geissler *et al.*, 2000).

Mit [³⁵S]-Methionin markiertes Yfh1 wurde unter den gleichen Bedingungen wie für den Import von Su9(1-69)-DHFR beschrieben in isolierte Mitochondrien importiert (Abb. 13).

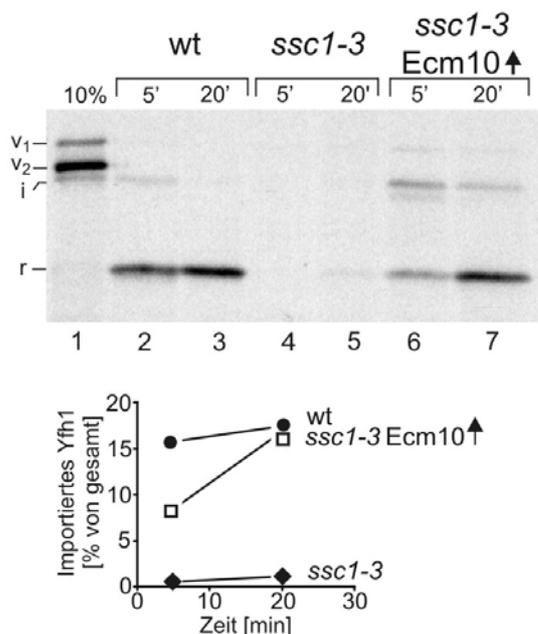


Abb. 13: Überexprimiertes Ecm10 ermöglicht den Import von Yfh1 in *ssc1-3*-Mitochondrien.

Mitochondrien aus Wildtyp- (wt), *ssc1-3*- und *ssc1-3Ecm10*[↑]-Zellen wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde radioaktiv markiertes Yfh1 (v) über die angegebenen Zeiträume bei 25°C importiert. Nach Abschluss des Imports wurden die Proben mit Proteinase K behandelt. Zum Vergleich wurden in Spur 1 10 % des pro Importreaktion eingesetzten Materials aufgetragen. Die Signale für das importierte gereifte Protein (r) wurden densitometrisch quantifiziert und graphisch als Prozent des gesamten Vorstufenproteins dargestellt. (r) gereiftes Yfh1, (v₁) Vorstufenform, (v₂) aminoterminal verkürzte Vorstufenform, die aufgrund der fehlenden Präsequenz nicht in Mitochondrien importiert wird, (i) Prozessierungsintermediat

Die Importeffizienz von Yfh1 in Mitochondrien war geringer als die von pSu9(1-69)-DHFR. Ähnlich wie von Geissler *et al.*, 2000 beschrieben, waren nach 20 min ca. 20 % des Yfh1-Vorstufenproteins in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Der Import von Yfh1 in *ssc1-3*-Mitochondrien unterblieb nahezu vollständig. Die Überexpression von Ecm10 konnte diesen Defekt weitgehend ausgleichen und es wurden annähernd Wildtyp-Mengen

importiert. Im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien war die initiale Importrate von Yfh1 in *ssc1-3Ecm10[↑]*-Mitochondrien verlangsamt (Spuren 2 und 7). Nach 20 min waren allerdings ähnliche Mengen von Yfh1 importiert worden. Somit konnte unabhängig voneinander an zwei Vorstufenproteinen gezeigt werden, dass die Überexpression von Ecm10 die Importdefekte in *Ssc1-3*-Mitochondrien fast vollständig beseitigen kann.

3.1.3.3 Ecm10 verhindert nicht die Aggregation von Ssc1-3

Im Folgenden sollte geklärt werden, auf welche Weise Ecm10 den Proteinimport in *ssc1-3*-Mutanten wiederherstellt. Wie bereits erwähnt, kommt es infolge der thermischen Vorbehandlung von *ssc1-3* zu einer Aggregation des mutierten Proteins. Möglicherweise ist Ecm10 in der Lage, diese Aggregation von Ssc1-3 zu verhindern und würde somit indirekt die Importfähigkeit wiederherstellen. Um diese These zu überprüfen, wurde das Aggregationsverhalten von Ssc1-3 in An- und Abwesenheit von überexprimiertem Ecm10 analysiert.

Dazu wurden isolierte Mitochondrien unter den Vorinkubationsbedingungen der unter 3.1.3.2 beschriebenen *in vitro* Importexperimente (10 min, 37°C) oder bei 0°C inkubiert und anschließend mit 0,1 % Triton X-100 lysiert. Die aggregierten Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation von den löslichen Bestandteilen getrennt und anschließend durch Immundekoration unter Verwendung von Antikörpern gegen Ssc1 bzw. das Histidylepitop analysiert und quantifiziert (Abb. 14).

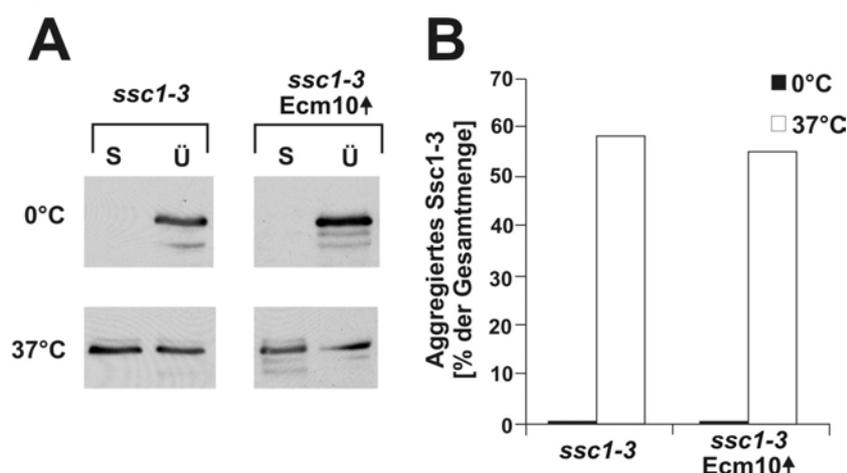


Abb. 14: Überexprimiertes Ecm10 schützt Ssc1-3 nicht vor Aggregation.

Mitochondrien aus *ssc1-3*-Zellen (*ssc1-3*) und *ssc1-3*-Zellen, die Ecm10 überproduzieren (*ssc1-3Ecm10[↑]*), wurden isoliert und in Importpuffer aufgenommen. Die Reaktionen wurden geteilt; ein Teil wurde für 10 min bei 37°C, der andere bei 0°C inkubiert. Nach Reisolation wurden die Mitochondrien in 0,1 % Triton lysiert, die unlöslichen Anteile (S) sedimentiert und die Proteine des Überstandes (Ü) mit TCA gefällt.

Ssc1-3 aggregierte dabei nur nach Vorinkubation bei 37°C. Die Aggregatbildung wurde durch die Überexpression von Ecm10 nicht verhindert. Unter diesen Bedingungen aggregierte auch ein Teil des überexprimierten Ecm10 (nicht gezeigt).

Damit scheint es unwahrscheinlich, dass Ecm10 indirekt den Importdefekt von *ssc1-3*-Mitochondrien supprimiert, indem es die Aggregation von Ssc1-3 verhindert und dieses in einem funktionellen Zustand erhält.

3.1.3.4 Ecm10 bindet an Importintermediate

Neben einem Membranpotential ist in der Matrix lokalisiertes ATP notwendig für den Import mitochondrialer Vorstufenproteine. ATP wird von Ssc1 benötigt, um gemäß dem Modell eines molekularen Sperrhakens die Polypeptidkette mit Hilfe mehrerer Zyklen des direkten Bindens und Freilassens des Vorstufenproteins durch Ssc1 vollständig über die Innenmembran zu transportieren. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ecm10 in der Lage ist, aggregiertes Ssc1-3 während des Importes teilweise zu ersetzen, sollte nun geklärt werden, ob Ecm10 ebenfalls an translozierende Polypeptidketten binden kann.

Da in *ssc1-3Ecm10*[↑] Ecm10 mit einem Oktahistidylepitop exprimiert wird, sollte mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie untersucht werden, inwieweit Vorstufenproteine noch während des Imports zusammen mit Ecm10 isoliert werden können. Zum Vergleich wurde neben *ssc1-3Ecm10*[↑] ein Hefestamm *ssc1-3Ssc1*[↑] eingesetzt, in dem Ssc1 mit einem aminoterminalen Oligohistidylepitop überexprimiert wird. Wildtyp-, *ssc1-3Ssc1*[↑]- und *ssc1-3Ecm10*[↑]-Mitochondrien wurden bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 10 min mit radioaktiv markiertem Su9(1-69)-DHFR inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben mit Apyrase behandelt, um ATP zu depletieren und somit die Wechselwirkung zwischen Substrat und Hsp70 zu stabilisieren. Im Anschluss daran wurden die Mitochondrien reisoliert und entweder in Gegenwart von ATP und Magnesium oder ohne Zusatz von ATP lysiert. His-Ecm10 und His-Ssc1 sowie deren Bindungspartner wurden durch Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose aus dem Proteingemisch isoliert. Die Bestimmung der mit den gereinigten Proben koeluiierenden Menge des radioaktiven Vorstufenproteins Su9(1-69)-DHFR erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie.

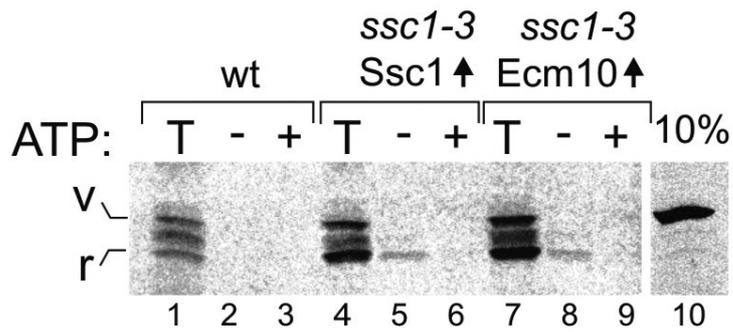


Abb. 15: *Su9(1-69)-DHFR* bindet an *Ecm10* und an *Ssc1*

Mitochondrien aus Wildtyp- (wt, Spuren 1-3), *ssc1-3Ssc1*↑- (Spuren 4-6) oder *ssc1-3Ecm10*↑-Zellen (Spuren 7-9) wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 10 min bei 25°C mit ³⁵S-markiertem *Su9(1-69)-DHFR*

inkubiert. Spur 10 zeigt 10 % des pro Importreaktion eingesetzten Materials. Nach ATP-Depletion durch Inkubation für 10 min bei 25°C in Gegenwart von 50 mU/ml Apyrase wurden die Ansätze geteilt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und entweder direkt der SDS-PAGE unterworfen (T, gesamt) oder in Abwesenheit (-ATP, Spuren 2, 5, 8) bzw. in Gegenwart von 2 mM ATP (+ATP, Spuren 3, 6, 9) lysiert. Der so erhaltene Extrakt wurde nach Zentrifugation mit NiNTA-Agarose inkubiert. Die Agarosekugeln wurden gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht. Die mit T gekennzeichneten Spuren zeigen 10 % des für die Bindung an Ni-NTA verwendeten Materials.

Wie in Abb. 15 gezeigt, koeluierte reifes *Su9(1-69)-DHFR* Protein sowohl mit His-*Ssc1*, als auch mit His-*Ecm10*. Demgegenüber wurde kein radioaktiv markiertes Vorstufenprotein aus Wildtypextrakten isoliert (Spuren 2 und 3). Die Bindung an *Ssc1* und *Ecm10* erfolgte nur in Abwesenheit von ATP (Spuren 6 und 9).

Dies zeigt, dass sowohl His-*Ssc1*, als auch His-*Ecm10* an importierte Polypeptidketten binden. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass überexprimiertes *Ecm10* durch ATP-abhängige Bindung an das Vorstufenprotein die reduzierte Importaktivität von *Ssc1-3* wiederherstellt.

3.1.3.5 *Ecm10* bindet effizient an *Mge1*, jedoch nur schwach an *Tim44*

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass *Ecm10* durch ATP-abhängige Bindung von Vorstufenproteinen teilweise die Funktion von *Ssc1* in der mitochondrialen Translokationsmaschinerie übernehmen kann. Daher sollte geklärt werden, inwieweit eine Wechselwirkung zwischen *Ecm10* und *Tim44* bzw. *Mge1* besteht.

Zunächst sollte die mögliche ATP-abhängige Wechselwirkung von *Ecm10* mit *Mge1* nachgewiesen und näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Extrakte aus Wildtyp- und *ssc1-3Ecm10*↑-Mitochondrien gewonnen und mit oder ohne ATP inkubiert. Die

Wie aus Abb. 16A erkennbar ist, wurde nur aus *ssc1-3Ecm10*[↑]-Mitochondrien ein Protein mit einer apparenten Molekülmasse von ca. 65 kDa isoliert (vgl. Abb. 16A Spuren 8 und 9). Abb. 16B zeigt, dass dieses Protein mit Hilfe eines gegen das Histidylepitop gerichteten monoklonalen Antikörpers als Ecm10 identifiziert werden konnte.

Neben Ecm10 wurden aus *ssc1-3Ecm10*[↑]-Mitochondrien zwei weitere Proteine spezifisch aufgereinigt (vgl. Abb. 16A Spur 8); das kleinere davon (apparente Molekülmasse 22 kDa) jedoch nur in Abwesenheit von ATP (vgl. Abb. 16A Spur 9). Mit Hilfe des Western Blots konnte es als Mge1 identifiziert werden (Abb. 16B Spuren 4-6). Da Mge1 nur in Anwesenheit des überexprimierten Ecm10 angereichert wurde und nicht an inaktiviertes Ssc1-3 bindet (Schneider *et al.*, 1994), konnte so eine ATP-abhängige Bindung von Mge1 an Ecm10 nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der ATP-abhängigen Bindung von Mge1 an Ssc1 (Schneider *et al.*, 1994) und legt den Schluss nahe, dass Mge1 auch als Nukleotidaustauschfaktor für Ecm10 fungiert.

Neben Mge1 wurde ein weiteres Protein (*) mit Ecm10 gereinigt (Abb. 16A, Spuren 8 und 9). Dieses hatte eine apparente Molekülmasse von ca. 45 kDa. Die Natur dieses Proteins ist unbekannt. Die Anwesenheit von Tim44 konnte durch Immundekoration ausgeschlossen werden.

Für die Funktion von Ssc1 beim Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix ist neben der Interaktion mit Mge1 auch die Interaktion mit Tim44 erforderlich. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ecm10 an importierte Vorstufenproteine bindet, die Importaktivität in *ssc1-3Ecm10*[↑]-Mitochondrien wiederherstellt und ATP-abhängig mit Mge1 in Wechselwirkung tritt, lag der Schluss nahe, dass Ecm10 wie Ssc1 auch mit Tim44 interagiert. Eine schwache Bindung zwischen Ecm10 und Tim44 konnte während des Imports des Vorstufenproteins Su9(1-69)-DHFR beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese Bindung konnte auch zu einem am Aminoterminus mit einem Histidylepitop versehenen Ssc1 aus *ssc1-3Ssc1*[↑]-Mitochondrien nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da in beiden Fällen nur geringe Mengen von Tim44 gebunden wurden, könnte ein störender Einfluss des Histidylepitops eine Rolle spielen.

Somit interagiert Ecm10 neben Mge1 auch mit Tim44. Die Wechselwirkungen zu beiden Komponenten werden durch ATP reguliert. Dies deutet darauf hin, dass Ecm10 bei der Translokation von mitochondrialen Vorstufenproteinen eine mit Ssc1 vergleichbare Rolle übernehmen kann.

3.1.3.6 Ecm10 kann die Faltungsaktivität von Ssc1 nur unvollständig ersetzen

Neben seiner Funktion bei der Translokation von Polypeptidketten über die mitochondriale Innenmembran spielt das Chaperon Ssc1 auch eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung von Polypeptidketten in der Matrix. Nachdem im Abschnitt 3.1.3.4 gezeigt werden konnte, dass Ecm10 direkt an die translozierenden Polypeptidketten binden kann, sollte im Folgenden geklärt werden, ob Ecm10 die Faltung eines in die Matrix importierten Proteins fördern kann.

Dazu wurden geringe radioaktiv markierte Mengen des bereits beschriebenen Vorstufenproteins Su9(1-69)-DHFR bei nicht permissiver Temperatur in *wt-*, *ssc1-3-* und *ssc1-3Ecm10[↑]*-Mitochondrien importiert (siehe auch Abschnitt 3.1.3.2). Nach Abschluss des Imports und Entfernung von Importintermediaten durch Inkubation mit Protease wurden die Mitochondrien lysiert und durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Neben der Löslichkeit des importierten Proteins ist die Unempfindlichkeit der DHFR-Domäne gegenüber Proteaseverdau ein direktes Maß für den Grad ihrer Faltung (Rowley *et al.*, 1994b). Nur die korrekt gefaltete DHFR-Domäne ist unter den gewählten Bedingungen proteaseresistent. Daher wurde anschließend der Faltungszustand der DHFR-Domäne durch Proteasebehandlung kontrolliert. Die Autoradiografie und ihre quantitative Analyse sind in Abb. 17 dargestellt.

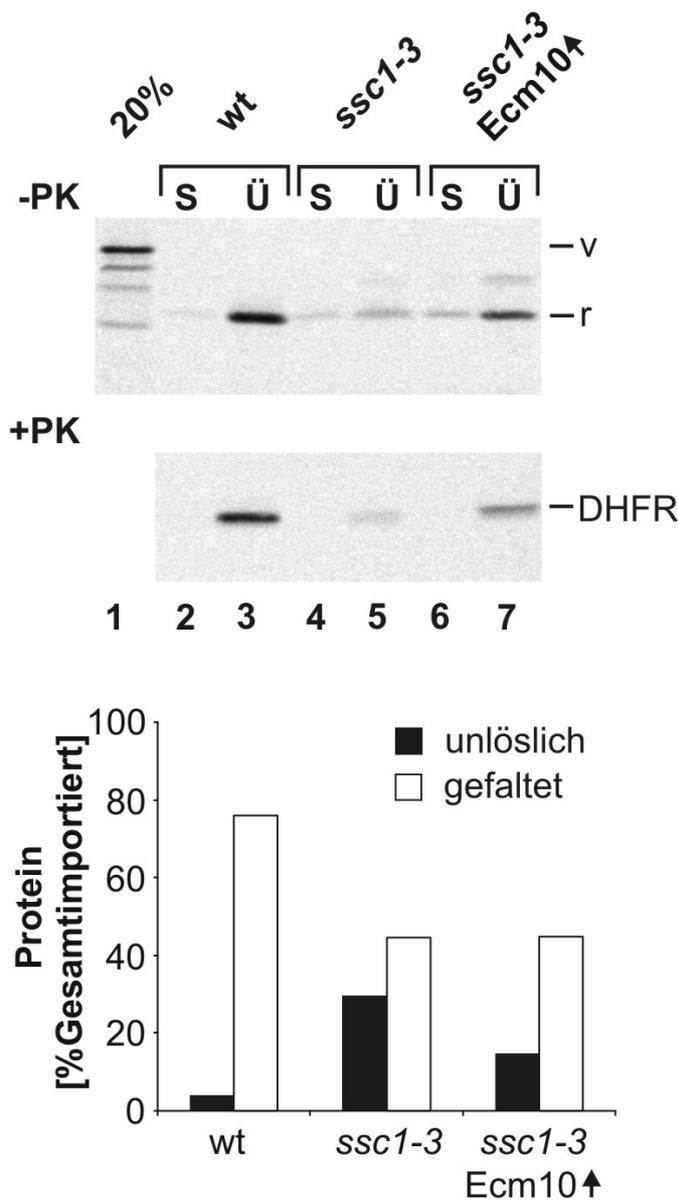


Abb. 17: *Ecm10* kann die Faltungsaktivität von *Ssc1* nur unvollständig ersetzen.

Das Vorstufenprotein Su9(1-69)-DHFR wurde für 10 min bei 37°C in isolierte Mitochondrien aus den angegebenen Stämmen importiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 0,1 mM Valinomycin wurden die Ansätze mit 50 µg/ml Trypsin 15 min auf Eis inkubiert und anschließend die Protease durch die Zugabe eines 50-fachen Überschusses von STI inhibiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und in 0,5 % Triton X-100-haltigem SHKCl für 15 min bei 0°C lysiert. Die Ansätze wurden geteilt und 10 min bei 17500g zentrifugiert. Eine Hälfte der Sedimente wurde direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen, während eine Hälfte der Überstände mit TCA behandelt und die gefällten Proteine in Laemmli-Puffer resuspendiert wurde (-PK). Die jeweils andere Hälfte der Überstände bzw. der Sedimente wurde mit 100 µg/ml Proteinase K für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend mit TCA behandelt und die gefällten Proteine in Laemmli-Puffer resuspendiert (+PK). Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen Sediment und insgesamt importiertem Protein ohne PK-Behandlung (unlöslich) bzw. das Verhältnis zwischen

Überstand mit PK-Behandlung zu insgesamt importiertem Protein ohne PK-Behandlung (gefaltet) ermittelt, (S: Sediment; Ü: Überstand)

In Mitochondrien, die kein funktionelles *Ssc1* enthielten, war die Menge an importiertem Su9(1-69)-DHFR im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien auf ein Fünftel reduziert. Ungefähr ein Drittel davon wurde nach der Lyse der Mitochondrien sedimentiert (vgl. auch Gambill *et al.*, 1993). Die Überexpression von *Ecm10* führte zu einer Verringerung des Anteils an aggregiertem Protein auf 15 %. Wie oben beschrieben, ist neben der Löslichkeit des importierten Proteins die Unempfindlichkeit der DHFR-Domäne gegenüber Proteasen ein direktes Maß für den Grad ihrer Faltung (Rowley *et al.*, 1994b). Nach

Proteinase K-Behandlung konnte diese Domäne nur in den Überständen nachgewiesen werden, die das lösliche Protein enthielten. In Mitochondrien aus dem *ssc1-3Ecm10[↑]*-Stamm befand sich mehr importiertes Protein in der löslichen Form als in Mitochondrien ohne Überexpression von Ecm10. Allerdings blieb ein größerer Anteil des importierten Su9(1-69)-DHFR-Proteins proteaseempfindlich (vgl. Abb. 17 Spur 3 –PK und +PK zu Spur 7 –PK und +PK). Ähnlich wie im *ssc1-3*-Stamm wurde nur ca. die Hälfte des importierten Proteins so gefaltet, dass es gegenüber der Proteasebehandlung unempfindlich war.

Ecm10 steigert also die Importrate und die Löslichkeit des Vorstufenproteins, kann aber nicht im gleichen Maße die Faltung des importierten Materials fördern.

Um die Faltungsaktivität von Ecm10 unabhängig von seiner Rolle beim Proteinimport zu untersuchen, wurde dessen Einfluss auf die Aggregation des löslichen Matrixproteins Var1 infolge einer Hitzeschockbehandlung geprüft. Var1 ist eine ribosomale Untereinheit und das einzige lösliche Protein, das in *S. cerevisiae* mitochondrial kodiert ist. Daher kann seine Synthese in isolierten Mitochondrien beobachtet werden. Funktionelles Ssc1 verhindert die Aggregation von unter Hitzeschockbedingungen neu synthetisiertem Var1. Ssc1-3 besitzt diese Faltungsaktivität nicht mehr (Herrmann *et al.*, 1994b).

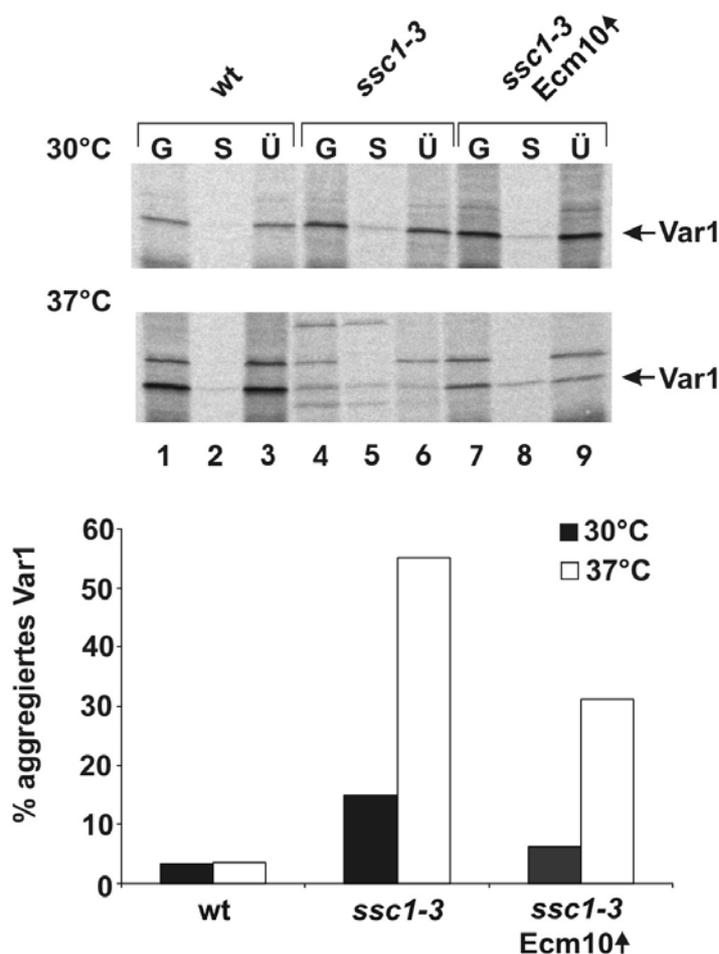


Abb. 18: Ecm10 kann die Aggregation von Var1 nur unvollständig verhindern.

Wildtyp- (wt), *ssc1-3*- und *ssc1-3Ecm10[↑]*-Mitochondrien wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde je ein Teil der vorbehandelten Mitochondrien in *in organello*-Translationspuffer verdünnt und wie angegeben bei 30°C oder 37°C in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin für 30 min inkubiert. Die Ansätze wurden geteilt und eine Hälfte 10 min auf Eis mit 0,1 % Triton X-100 lysiert. Nach 15 min Zentrifugation wurden die unlöslichen Anteile direkt in Laemmli-Puffer resuspendiert (S). Die Proteine der löslichen Überstände und der unlysierten Fraktionen wurden zunächst mit TCA gefällt. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Autoradiographie erfolgte die quantitative Analyse durch Densitometrie des Autoradiogramms.

Isolierte Wildtyp-, *ssc1-3*- und *ssc1-3Ecm10*[↑]-Mitochondrien wurden zur Inaktivierung von Ssc1-3 bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien für 30 min bei 30°C oder 37°C in Translationspuffer mit [³⁵S]-Methionin inkubiert. Zur Bestimmung des Anteils an aggregiertem Var1 wurden die Mitochondrien lysiert und aggregiertes Material durch Zentrifugation sedimentiert. Wie aus Abb. 18 ersichtlich, liegt Var1 in Wildtyp-Mitochondrien nahezu ausschließlich in löslicher Form vor (Spur 2). In Mitochondrien aus beiden Mutantenstämmen neigt Var1 zur Aggregation (Spuren 5 + 8). Diese Neigung war stärker ausgeprägt, wenn die Translation bei 37°C durchgeführt worden war (unteres Feld Spuren 5 + 8). Die Aggregation von Var1 in *ssc1-3*-Mitochondrien konnte durch das überexprimierte Ecm10 nicht verhindert werden (Abb. 18 unteres Feld, vgl. das Verhältnis von Spur 5/6 zu Spur 8/9).

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Ecm10 über eine im Vergleich zu Ssc1 nur geringe Faltungsaktivität verfügt. Einschränkend muss allerdings darauf verwiesen werden, dass das in diesen Experimenten eingesetzte überexprimierte Ecm10 mit einem Oligohistidyl-Epitop am Aminoterminus versehen war. Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, ob diese Veränderung einen nennenswerten Einfluss auf die Faltungsaktivität von Ecm10 hat.

3.2 Insertion bitoper Membranproteine

Neben der Matrix ist die Innenmembran ein weiteres wichtiges Kompartiment der Mitochondrien. Viele Proteine der Innenmembran sind Untereinheiten hochmolekularer Multienzymkomplexe, die eine Reihe wichtiger chemischer Reaktionen katalysieren. Eine Vielzahl dieser Proteine wird durch eine oder mehrere hydrophobe Domänen in der Innenmembran verankert. Da die Erbinformation für die meisten von ihnen aus dem mitochondrialen Genom in den Zellkern verlagert wurde, müssen auch diese Proteine nach ihrer Synthese im Cytosol in die Mitochondrien transportiert und korrekt sortiert werden. Wie eingangs erläutert, wurden dazu bisher drei verschiedene Wege beschrieben: die Insertion aus dem Intermembranraum mit Hilfe des TIM22-Komplexes, die konservative Sortierung über die Matrix sowie eine Stop-Transfer-Insertion aus dem TIM23-Komplex. Bis auf Oxa1 sind alle bisher bekannten konservativ sortierten Proteine monotope Membranproteine, die nur eine membranspannende Domäne (Transmembrandomäne) enthalten. Nur wenig ist über den Import und die Sortierung von Innenmembranproteinen mit mehr als einer Transmembrandomäne (polytope Membranproteine) bekannt. Am Beispiel bitoper Membranproteine, die mit Hilfe des TIM23-Komplexes importiert werden, sollte die Frage nach einem allgemeinen Modell für die Sortierung dieser Untergruppe von Innenmembranproteinen geklärt werden.

3.2.1 Sortierung von Mrs2

Mrs2 ist ein Magnesiumtransporter der mitochondrialen Innenmembran. Es gehört zu einer konservierten Familie von bakteriellen und mitochondrialen Proteinen mit ähnlicher Topologie (Bui *et al.*, 1999). Seine Topologie umfasst zwei Transmembrandomänen, wobei sowohl der Aminoterminus, als auch der Carboxyterminus in die Matrix ragen (Bui *et al.*, 1999). Daher wurde Mrs2 in der vorliegenden Arbeit als Modellprotein zur Untersuchung der Topogenese polytope Membranproteine der mitochondrialen Innenmembran eingesetzt. Sowohl die bakteriellen Homologen als auch Mrs2 enthalten einen kurzen, negativ geladen Sequenzabschnitt zwischen den beiden Transmembrandomänen (vgl. Abb. 19A).

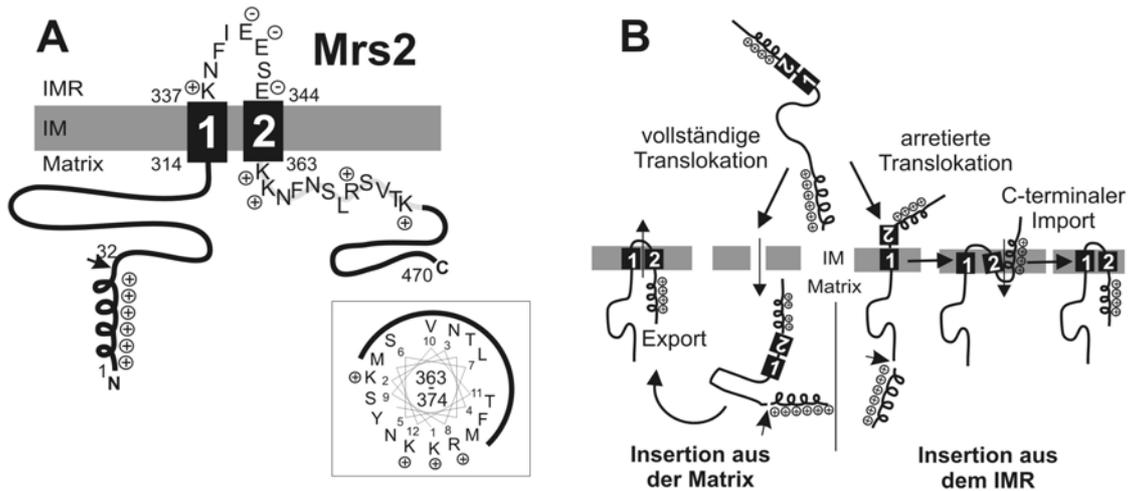


Abb. 19: Schematische Darstellung möglicher Import- und Sortierungswege von Mrs2

A. Die Nummerierung bezeichnet die Aminosäurereste des Proteins. Die Transmembrandomänen sind als schwarze Kästen dargestellt. Für die Intermembranraumdomäne und den sich carboxyterminal an die zweite Transmembrandomäne anschließenden Bereich ist die Aminosäuresequenz mit den Ladungen der einzelnen Aminosäurereste angegeben. Der Pfeil bezeichnet die vorhergesagte Prozessierungsstelle. Im Kasten ist eine α -helikale Projektion der Aminosäurereste 363 bis 374 wiedergegeben. Dabei veranschaulicht die durchgezogene Linie die hydrophobe Oberfläche der Helix. **B.** Zwei alternative Sortierungswege zur Topogenese von Mrs2. Siehe Text. IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum

Wie in Abb. 19A gezeigt, enthält der carboxyterminal direkt an die zweite Transmembrandomäne angrenzende Sequenzabschnitt von Mrs2 mehrere positiv geladene Aminosäurereste. Strukturvorhersagen machen eine amphipathische Helix für diesen Bereich wahrscheinlich. Derartige Strukturmerkmale konnten bereits als interne mitochondriale Zielsequenzen bzw. Insertionssignale für benachbarte hydrophobe Sequenzabschnitte identifiziert werden (Folsch *et al.*, 1996). Demnach sind für die Sortierung von Mrs2 über die Innenmembran zwei Mechanismen denkbar. Diese sind in Abb. 19B dargestellt: Mrs2 könnte zuerst vollständig über die Innenmembran hinweg in die mitochondriale Matrix importiert werden. Von hier aus könnte dann in einem zweiten Schritt die Insertion in die Innenmembran erfolgen. In diesem Fall würde ein zweites internes Importsignal nicht benötigt. Alternativ dazu könnte die Translokation der Polypeptidkette im Bereich der ersten Transmembrandomäne angehalten werden. Anschließend würde der Carboxyterminus mit Hilfe einer zweiten Zielsequenz vom Intermembranraum ausgehend in die Innenmembran inseriert.

3.2.1.1 Mrs2 enthält zwei unabhängige Importsignale.

Um die in Mrs2 enthaltenen Zielsequenzen aufzufinden, wurde die Importfähigkeit von *in vitro* synthetisiertem radioaktiv markiertem Mrs2 und dessen Abkömmlingen untersucht. Wie aus Abb. 20 ersichtlich, wurde das Vorstufenprotein, das die gesamte Aminosäurekette von Mrs2 umfasste, effizient in isolierte Mitochondrien importiert. Es wurde ein proteolytisch gereiftes Protein (r) erhalten, das auch nach Öffnen der Außenmembran weitgehend unempfindlich für von außen zugesetzte Protease war. Bei Zusatz großer Mengen von Proteinase K wurde ein kleiner Teil des importierten Mrs2 gespalten, wobei zwei Fragmente entstanden (verdeutlicht durch Pfeile). Diese entsprechen einer Spaltung innerhalb der Intermembranraumdomäne von Mrs2. Der größte Teil des Proteins wurde auch unter diesen Bedingungen nicht gespalten, da sich die Intermembranraumdomäne in enger Nähe zur Innenmembran befindet. Diese proteaseresistente Lokalisation wurde auch für das endogene Protein beschrieben (Bui *et al.*, 1999). Nach Behandlung mit alkalischer Carbonatlösung wurde das Protein in der Membranfraktion gefunden. Demnach wird auch das Vorstufenprotein von Mrs2 unter den Bedingungen des *in vitro*-Imports in isolierte Mitochondrien korrekt sortiert.

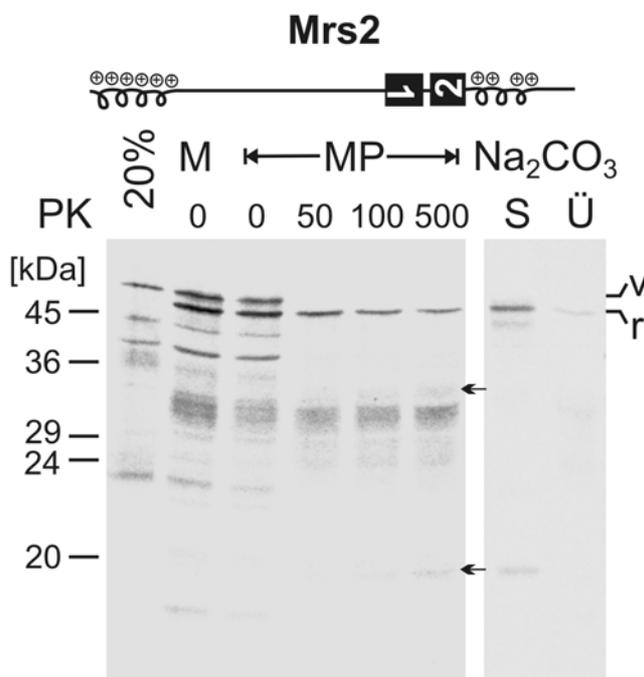


Abb. 20: Import von Vollängen-Mrs2.

[³⁵S]-markiertes Mrs2 wurde mit isolierten Wildtyp-Mitochondrien für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Ansätze wurden geteilt und entweder ohne Zusätze auf Eis stehen gelassen (M) oder durch osmotischen Schock geschwollen (MP) und gleichzeitig wie angegeben für 30 min auf Eis mit 0 bis 500 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und enthaltene Proteine über SDS-Page aufgetrennt. Für die Carbonatextraktion (Na₂CO₃) wurden Mitoplasten nach Behandlung mit 50 µg/ml Proteinase K reisoliert und nach Lyse mit 0,1 M Na₂CO₃ in Carbonat-extrahierbare (Ü) und nicht extrahierbare (S) Anteile getrennt. Die linke

Spur zeigt 20 % des Vorstufenproteins, das pro Reaktion eingesetzt wurde. Die Pfeile bezeichnen die proteolytischen Fragmente von Mrs2.

Wenn Mrs2 vom Intermembranraum aus in die Innenmembran inseriert, sollte die erste Transmembranregion als Stop-Signal während der Translokation über die Innenmembran fungieren. Um dies zu testen, wurde der carboxyterminale Bereich nach der ersten Transmembranregion durch eine faltungsdefiziente Mutante der Dihydrofolatreduktase aus Maus (DHFR^{mut}) ersetzt und das so erhaltene Fusionsprotein, welches die ersten 345 Aminosäurereste des Mrs2 umfasste, aus Retikulozytenlysat *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert. Dabei wurde das Fusionsprotein vollständig in die mitochondriale Matrix importiert (vgl. Abb. 21). Das gegen von außen zugesetzte Proteasen resistente Protein befand sich im Überstand der Carbonatfraktionierung und war somit nicht in die Innenmembran integriert. Die Abwesenheit eines membranassoziierten Fragments spricht gegen das Vorhandensein eines Stoppsignals innerhalb der untersuchten Mrs2-Sequenz.

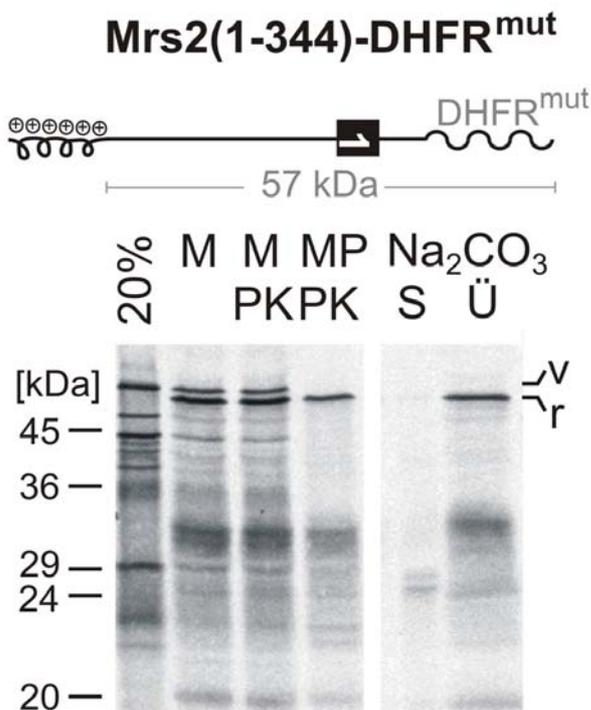


Abb. 21: Die erste Transmembrandomäne von Mrs2 bewirkt kein Abstoppen der Translokation über die Innenmembran.

Radioaktiv markiertes Mrs2(1-344)-DHFR^{mut} wurde für 30 min in Wildtypmitochondrien importiert. Der Ansatz wurde geviertelt. Die einzelnen Anteile wurden wie angegeben entweder für 30 min nur auf Eis stehen gelassen (M), oder mit Schwellpuffer auf Eis inkubiert (MP) und wie angegeben mit 50 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Für die Trennung der löslichen Proteine von den Membranproteinen wurde der letzte Ansatz nach Schwellen und Proteinase K-Behandlung mit Na₂CO₃ fraktioniert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Import von Mrs2 nicht durch ein Stoppsignal auf Höhe der ersten Transmembrandomäne angehalten wird, sollte die Frage geklärt werden, ob ein weiteres funktionelles internes Importsignal innerhalb des carboxyterminalen an die zweite Transmembrandomäne angrenzenden Bereichs vorhanden ist. Dazu wurden die Aminosäurereste 337-470 des Mrs2 an den Carboxyterminus von DHFR fusioniert (Abb. 22).

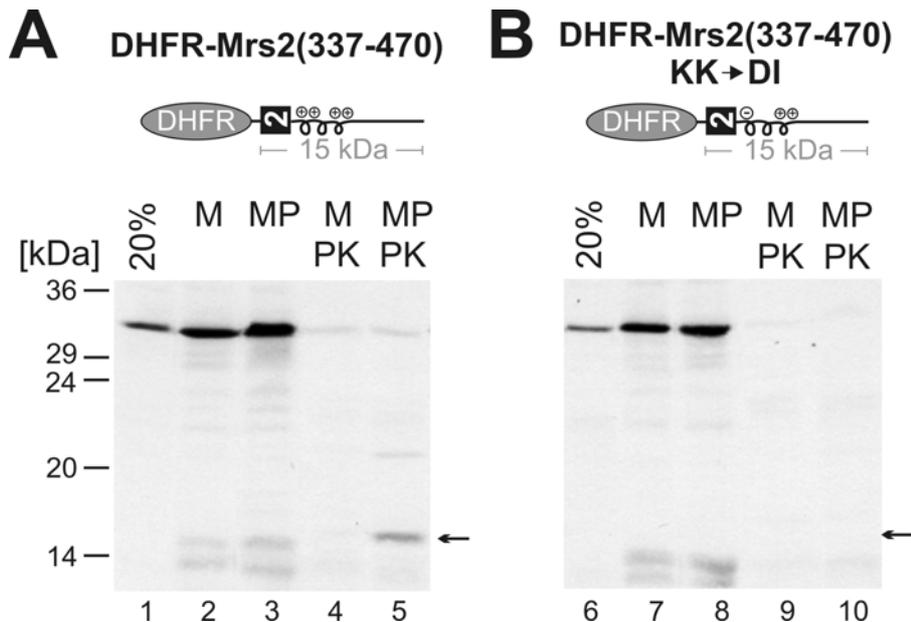


Abb. 22: Der carboxyterminale Bereich von Mrs2 enthält ein weiteres Importsignal.

Die radioaktiv markierten Vorstufenproteine DHFR-Mrs2(337-470) und DHFR-Mrs2(337-470)KK→DI wurden für 30 min bei 25°C in isolierte Mitochondrien (M) oder in Mitoplasten (MP) importiert. Danach wurden die Ansätze geteilt und wie angegeben mit 50 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Die Pfeile markieren die Größe eines 15 kDa-Fragmentes, das mit DHFR-Mrs2(337-470) beobachtet wurde.

DHFR-Mrs2(337-470) wurde nicht in isolierte Mitochondrien importiert. Wahrscheinlich verhindert die Nähe der gefalteten DHFR-Domäne zum möglichen Importsignal dessen Wechselwirkung mit der Translokase der Innenmembran (Ungermann *et al.*, 1994). Dieses Fusionsprotein wurde allerdings effizient in die Innenmembran von Mitoplasten inseriert. Der Zusatz von Protease führte zur Bildung eines Fragmentes mit einer apparenten Masse von ca. 15 kDa, die mit der für den Carboxyterminus erwarteten Masse von 14,7 kDa gut übereinstimmte. Um das Importsignal genauer zu charakterisieren, wurden die beiden direkt auf die zweite Transmembrandomäne folgenden positiv geladenen Reste Lys₃₆₃ und Lys₃₆₄ durch einen negativ geladenen (Asp₃₆₃) sowie einen ungeladenen Aminosäurerest (Ile₃₆₄) ersetzt. Das so erhaltene Fusionsprotein mit diesem Ladungsaustausch wurde nicht in die Innenmembran inseriert. Auch konnte nach Proteasebehandlung kein Fragment generiert werden. Dies bedeutet, dass Mrs2 sowohl über eine typische aminoterminal Zielsequenz, als auch über ein internes Insertionssignal verfügt. Letzteres ähnelt den internen Signalen von Bcs1 und Cytochrom c₁ (Folsch *et al.*, 1996, Arnold *et al.*, 1998).

3.2.1.2 Das interne Importsignal wird nicht zur Sortierung von Mrs2 benötigt

Nachdem wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben die erste Transmembrandomäne nicht zu einem Anhalten der Translokation über die Innenmembran führte, sollte im Folgenden geklärt werden, welche Bedeutung dem internen Sortierungssignal bei der Insertion der zweiten Transmembrandomäne zukommt. Dazu wurde das zweite interne Sortierungssignal im Vorstufenprotein Mrs2 durch Austausch der positiv geladenen Aminosäurereste Lys₃₆₃ und Lys₃₆₄ gegen einen negativ geladenen (Glu₃₆₃) und einen neutralen (Leu₃₆₄) Aminosäurerest inaktiviert. Das so erhaltene Mrs2^{mut} konnte unter den oben beschriebenen Standardbedingungen in isolierte Mitochondrien importiert werden.

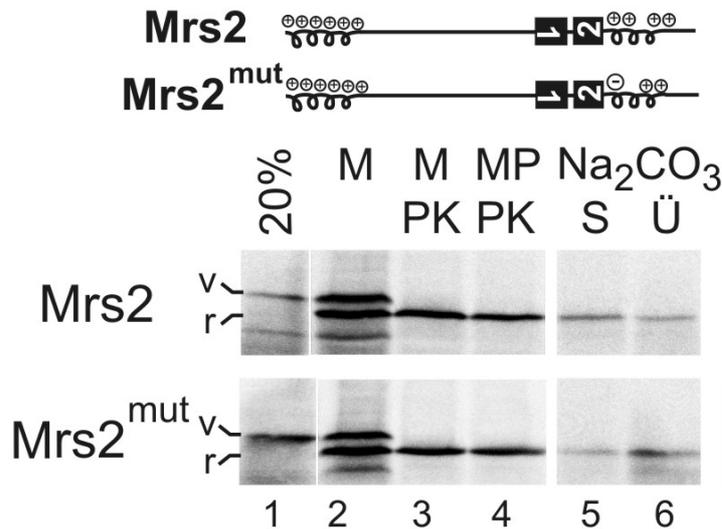


Abb. 23: Mrs2^{mut} erlangt eine N_{in}-C_{in}-Topologie über die mitochondriale Innenmembran nach *in vitro* Import.

Radioaktiv markiertes Volllängen-Mrs2 und Mrs2^{mut}, eine Doppelpunktmutante mit dem Austausch K363E, K364L, wurden mit isolierten Wildtypmitochondrien für 30 min bei 25°C importiert und anschließend wie in Abb. 21 beschrieben weiterbehandelt.

Beide Proteine erlangen eine in Mitoplasten gegenüber Proteasen geschützte Umgebung (Abb. 23 Spuren 3 und 4). Demnach wird das interne Insertionssignal *in vitro* nicht für den Transport des Carboxyterminus über die Innenmembran benötigt. Auch die Insertion in die Innenmembran erfolgte nahezu unverändert. Wie in Abb. 23 gezeigt, konnten ähnliche Mengen an Mrs2 und Mrs2^{mut} nach Carbonatbehandlung in der Membranfraktion detektiert werden (Spuren 5 und 6).

Nachdem *in vitro* keine Unterschiede zwischen der Wildtypform und der Mutantenform von Mrs2 festgestellt werden konnten, sollte geklärt werden, inwieweit dieses Ergebnis auch auf *in vivo*-Bedingungen übertragbar ist. Dazu wurde überprüft, ob Mrs2^{mut} einen Mrs2-defizienten Hefestamm retten kann. Dazu wurden carboxyterminal um ein Hämagglutininepitop (HA-Epitop) erweiterte Varianten von Mrs2 und Mrs2^{mut} unter

Kontrolle eines Trioseisomerase-Promotors exprimiert und anschließend das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerin getestet.

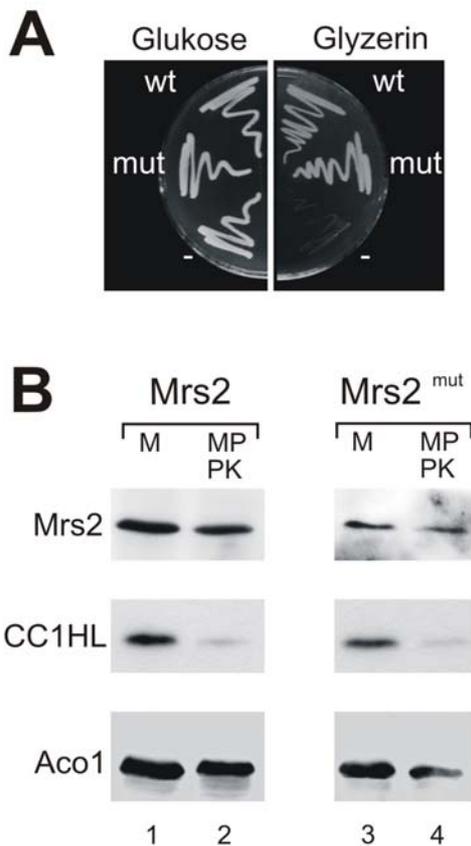


Abb. 24: Das interne Importsignal wird weder für die Sortierung, noch für die Funktion von Mrs2 *in vivo* benötigt.

A, $\Delta mrs2$ -Zellen wurden mit den Plasmiden pFB12 (Mrs2, wt), pFB13 (Mrs2^{mut}, mut) und dem leeren Ausgangsplasmid pYX142 (-) transformiert. Anschließend wurden die Stämme für 3 Tage bei 30°C auf Minimalmedium mit Glukose (links) oder Glycerin (rechts) als Kohlenstoffquelle wachsen gelassen. **B,** Mitochondrien aus den oben beschriebenen Mutantenstämmen wurden isoliert und ohne weitere Vorbehandlung (M) oder nach osmotischem Schock (MP) und Behandlung mit 100 µg/ml Proteinase K (PK) durch Western Blot analysiert. Zum immunochemischen Nachweis wurden Antikörper gegen Aconitase (Aco1), Cytochrom c₁-Hämlyase (CC1HL) und das Hämagglutininepitop (Mrs2) eingesetzt.

Wie in Abb. 24A gezeigt können Hefezellen ohne den Magnesiumtransporter Mrs2 kein Glycerin verstoffwechseln. Sowohl die Expression von Mrs2, als auch von Mrs2^{mut} können diesen Defekt kompensieren. Somit konnte gezeigt werden, dass auch unter *in vivo* Bedingungen das interne Insertionssignal für die Funktion von Mrs2 nicht benötigt wird.

Um zu bestätigen, dass sowohl im Falle von Mrs2, als auch im Falle von Mrs2^{mut} der Carboxyterminus in der Matrix lokalisiert war, wurden aus beiden Stämmen Mitochondrien isoliert und die Mrs2-Derivate mittels Immundekoration untersucht. Wie aus Abb. 24B ersichtlich wurde in beiden Fällen das carboxyterminale HA-Epitop auch in Mitoplasten vor von außen zugesetzter Protease geschützt. Somit konnte gezeigt werden, dass in beiden Fällen die Carboxytermini in die mitochondriale Matrix ragten und daher auch unter *in vivo* Bedingungen die Funktion des internen Insertionssignals zur korrekten Sortierung nicht benötigt wurde. Da ein funktionelles Insertionssignal essentiell für die Insertion aus dem Intermembranraum sein sollte, schien ein Sortierungsweg über die Matrix wahrscheinlicher.

3.2.1.3 Mrs2 bildet ein lösliches Sortierungsintermediat

Bei einem Sortierungsweg durch die mitochondriale Matrix sollte in Abhängigkeit der Kinetiken des Imports und der anschließenden Insertion in die Innenmembran das Protein zwischenzeitlich löslich in der mitochondrialen Matrix vorliegen. Um ein derartiges lösliches Sortierungsintermediat nachzuweisen, wurde Wildtyp Mrs2 aus Retikulozytenlysat in isolierte Mitochondrien *in vitro* für verschiedene Zeiträume importiert und das nicht importierte Material durch Proteasezusatz entfernt. Anschließend wurde ein Teil der Probe durch alkalische Carbonatlösung in lösliche und Membrananteile getrennt (Abb. 25). Nach einer Importdauer von 5 Minuten war der größte Teil des importierten Proteins noch löslich. Nur 22 % waren mit der Membran assoziiert. Im Verlauf der Importreaktion nahm dieser Anteil kontinuierlich zu und erreichte nach 60 min einen Wert von ca. 70 %. Um sicher zu gehen, dass dieser Effekt nicht durch eventuelle Reste des sedimentierenden Materials im Überstand speziell während der frühen Zeitpunkte verursacht wurde, wurden zur Kontrolle sowohl die Sedimentfraktionen, als auch die Überstände mit den beiden Markerproteinen Aac2 und Mge1 untersucht. Dabei konnte eine eindeutige Trennung von löslichen und Membranproteinen gezeigt werden. Auch die Quantifizierungen der Wiederholungen dieses Experimentes (vgl. Abb. 25B) bestätigten im Rahmen der statistischen Abweichung das Ergebnis.

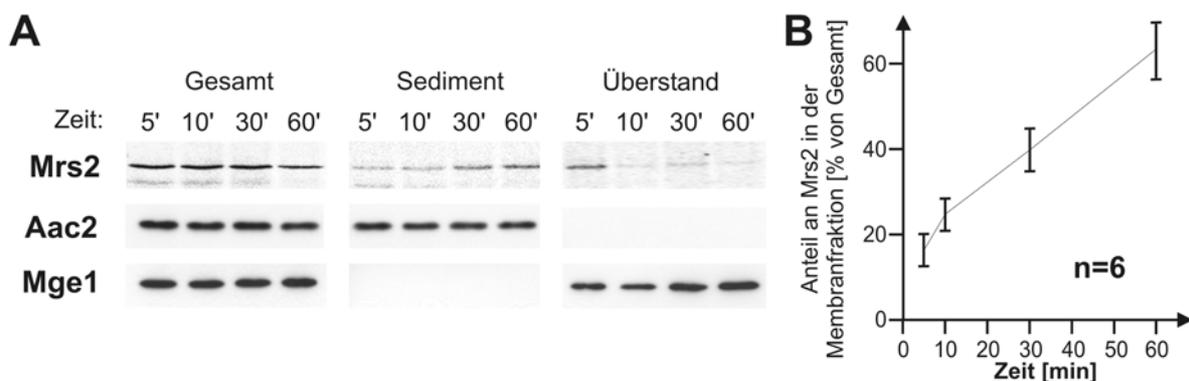


Abb. 25: Mrs2 bildet vorübergehend ein lösliches Zwischenprodukt in der Matrix.

Radioaktiv markiertes Mrs2 wurde in isolierte Wildtypmitochondrien ohne Zusatz von ATP und NADH über die angegebenen Zeiträume importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit 50 µg/ml Trypsin zur Entfernung noch unvollständig translozierter Polypeptidketten behandelt. Die Ansätze wurden geteilt und eine Hälfte (Gesamt) zur SDS-PAGE vorbereitet. Die zweite Hälfte wurde mit Hilfe von 0,1M Na₂CO₃ in lösliche (Überstand) und unlösliche (Sediment) Anteile gespalten. Die Signale wurden mit Hilfe eines Densitometers analysiert. Die Ordinate zeigt das Verhältnis von reifem Mrs2 in der Membranfraktion zur Mrs2-Gesamtmenge an.

Dies zeigt, dass Mrs2 vorübergehend ein lösliches Sortierungszwischenprodukt in der Matrix bildet, welches in einem zweiten, langsameren Schritt von der Matrix aus in die Innenmembran inseriert (siehe Modell in Abb. 19).

Wie bereits in Abb. 20 gezeigt kann ein Teil des importierten Mrs2 Proteins durch Proteasezusatz zu Mitoplasten in zwei Fragmente gespalten werden. Aufgrund ihrer Masse kann davon ausgegangen werden, dass diese den in die Innenmembran inserierten Amino- bzw. Carboxyterminus von Mrs2 darstellen. Um einen unabhängigen Nachweis für die Insertion von Mrs2 aus der Matrix in die Innenmembran zu erbringen, wurde Wildtyp Mrs2 aus Retikulozytenlysat in isolierte Mitoplasten *in vitro* für 3 bzw. 30 min importiert und nach Ende der Importreaktion mit Proteinase K behandelt. Die Bildung der in Abb. 20 gezeigten Fragmente dient dabei als direktes Maß für den Insertionsgrad des importierten Proteins. Nach 3 min konnten keinerlei Fragmente detektiert werden, während nach 30 min die mit Pfeilen markierten Fragmente beobachtet werden konnten (Abb. 26).

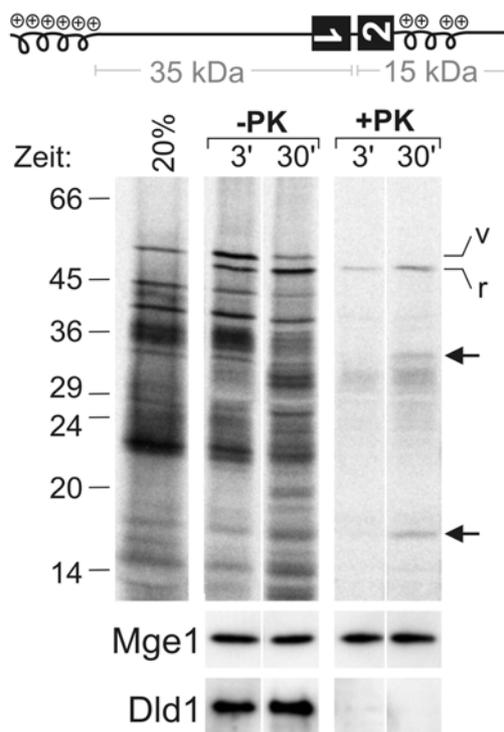


Abb. 26: Mrs2 bildet vorübergehend ein gegenüber Proteasen geschütztes Zwischenprodukt in der Matrix

Radioaktiv markiertes Mrs2 wurde in isolierte Wildtyp-Mitoplasten in Anwesenheit von NADH und eines ATP-regenerierenden Systems importiert. Nach 3 und 30 min wurden Proben entnommen und für 30 min in Abwesenheit oder unter Zusatz von 100 µg/ml Proteinase K bei 25°C inkubiert. Um die Intaktheit der Innenmembran zu überprüfen, wurden Antikörper gegen D-Laktatdehydrogenase (Dld1) und Mge1 eingesetzt. Die durch Proteasezusatz entstandenen Fragmente wurden mit Pfeilen markiert. Die Lage der Standardmolekülmassen wurde links angegeben.

Unter Berücksichtigung, dass das reife Protein sowie die daraus entstehenden Fragmente unterschiedlich stark markiert waren (12 Mol ^{35}S /mol für das reife Protein, 8 Mol ^{35}S /mol für das aminoternale Fragment, 4 Mol ^{35}S /mol für das carboxyterminale Fragment), konnte mehr als die Hälfte des importierten Proteins durch Proteasezusatz gespalten werden. Dies kann als weiteres Indiz dafür angesehen werden, dass Mrs2 über ein lösliches Sortierungsintermediat in der Matrix in die Innenmembran inseriert wird.

3.2.1.4 Die Membraninsertion von Mrs2 ist unabhängig von Oxa1 und Mba1

Nachdem eine Sortierung von Mrs2 durch die mitochondriale Matrix gezeigt werden konnte, sollte der Einfluss der Proteine Oxa1 und Mba1 auf diesen Sortierungsweg genauer untersucht werden. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Insertion verschiedener Innenmembranproteine aus der Matrix (He und Fox, 1997; Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001). Um ihre Rolle genauer zu analysieren, wurde radioaktiv markiertes Mrs2 unter *in vitro*-Bedingungen in Mitochondrien aus Wildtyp-, $\Delta oxa1\Delta mba1$ - oder $\Delta yta10$ -Zellen importiert. Die $\Delta yta10$ -Mitochondrien wurden zur Kontrolle eingesetzt, da sie wie $\Delta oxa1$ -Mitochondrien keine funktionelle Atmungskette besitzen und somit ähnliche energetische Voraussetzungen bestanden (Abb. 27).

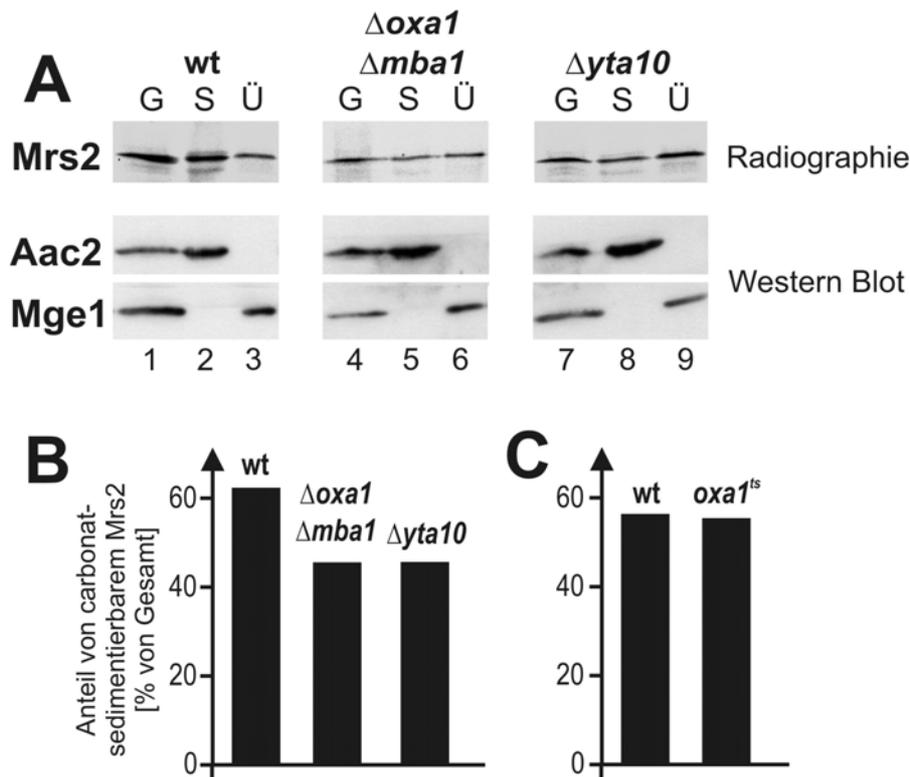


Abb. 27: Oxa1 und Mba1 werden nicht für die Insertion von Mrs2 benötigt.

A, Mrs2 wurde in Mitochondrien aus Wildtyp-, $\Delta oxa1\Delta mba1$ - oder $\Delta yta10$ -Zellen importiert und mit Na_2CO_3 subfraktioniert. Zur Kontrolle wurden anschließend die Signale für das lösliche Protein Mge1 und das unlösliche Protein Aac2 analysiert. **B**, Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und der Anteil an carbonat-sedimentierbarem Material angegeben. **C**, Die Signalintensitäten für ein wie unter **A** beschriebenes unabhängiges Experiment in Wildtyp- und bei 37°C für 10 min vorbehandelte $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien wurden quantifiziert und der Anteil an Carbonat-sedimentierbarem Material in Bezug auf insgesamt importiertes Protein angegeben. G, gesamt; S, Sediment; Ü, Überstand

Nach 30 min wurde nicht importiertes Material durch Proteasezusatz entfernt. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zusatz alkalischer Carbonatlösung in lösliche und Membrananteile subfraktioniert. Mit Hilfe der SDS-PAGE und Radiographie wurde anschließend der Anteil an membrangebundenem und löslichem Mrs2 analysiert (Abb. 27A). In Wildtyp-Mitochondrien befanden sich 62% des importierten Mrs2 in der Membranfraktion. In $\Delta oxa1\Delta mba1$ - und $\Delta yta10$ -Mitochondrien war ein geringerer Anteil (45%) des reifen Mrs2 carbonatresistent (Abb. 27B). Ähnliche Werte wurden mit $\Delta oxa1$ -Mitochondrien gefunden (nicht gezeigt). Die geringfügige Erniedrigung des Anteils an membrangebundenem Mrs2 ist wahrscheinlich auf die langsamere Importgeschwindigkeit in Folge des in beiden Fällen verringerten Membranpotentials zurückzuführen. Um die Annahme zu bestätigen, dass lediglich das geringere Membranpotential und nicht die Abwesenheit von Oxa1 für die geringfügig reduzierte Membraninsertionsrate von Mrs2 verantwortlich war, wurde Mrs2 in Mitochondrien ($oxa1^{ts}$) importiert, die eine temperatursensitive Mutante von Oxa1 enthielten (Bauer *et al.*, 1994). Die Verwendung dieser konditionellen Mutante ermöglichte es, die Funktion von Oxa1 vor Beginn des Experiments durch eine kurzfristige Vorinkubation bei 37°C auszuschalten. Da Oxa1 während der Isolation der $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien aktiv war, besitzen diese eine voll funktionsfähige Atmungskette. Auch nach Induktion des $oxa1^{ts}$ -Phänotyps verfügen diese Mitochondrien über ein normales Niveau des Membranpotentials (Hell *et al.*, 1997). Nach Import konnten auch in diesem Fall ähnliche Mengen von Mrs2 in den Membranfraktionen von Wildtyp- und $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 27C).

Demnach hängt eine effiziente Insertion von Mrs2 *in vitro* weder von der Anwesenheit von Oxa1, noch von Mba1 ab.

3.2.2 Sortierung von Yta10

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt werden konnte, dass Mrs2 seine Topologie durch Insertion aus der mitochondrialen Matrix in die Innenmembran einnimmt, sollte die Frage untersucht werden, ob dieser Sortierungsweg nur für Proteine mit kleinen geladenen Domänen gilt. Daher wurde Yta10 als Modellprotein gewählt. Die Topologie von Yta10 ist bekannt: Es ist wie Mrs2 ein bitopes Innenmembranprotein, allerdings mit einer deutlich längeren Intermembranraumdomäne von ca. 10 kDa (Pajic *et al.*, 1994).

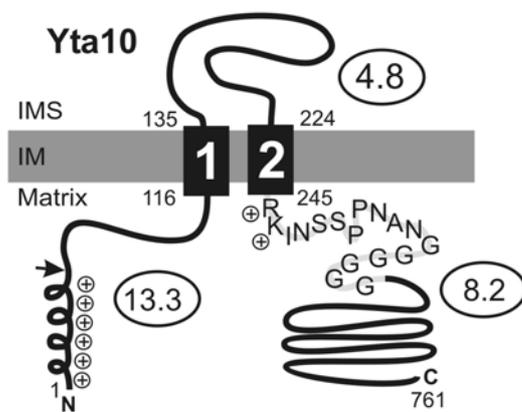


Abb. 28: Schematische Darstellung der Topologie von Yta10

Die Nummerierung markiert die Aminosäurereste des Proteins. Die Transmembrandomänen sind als schwarze Blöcke dargestellt. Die Reste und Ladungen der carboxyterminal auf die zweite Transmembrandomäne folgenden Aminosäuren sind dargestellt. Der Pfeil markiert die vorhergesagte Prozessierungsstelle. Die eingekreisten Zahlen geben den isoelektrischen Punkt der entsprechenden Matrix- bzw.

Intermembranraumdomänen wieder.

Die stark geladene Domäne von 89 Aminosäureresten zwischen den beiden Transmembrandomänen ragt in den Intermembranraum. Bisher wurde eine Insertion in die Innenmembran von der Intermembranraumseite aus postuliert (Arnold *et al.*, 1998), obwohl Yta10 keinen Aminosäureabschnitt im Anschluss an die zweite Transmembrandomäne aufweist, der eine amphipathische Helix ausbilden könnte (Abb. 28).

Yta10 kann als radioaktiv markiertes Vorstufenprotein in isolierte Hefemitochondrien importiert werden. Nach dem Import wird die Präsequenz in der Matrix durch MPP abgespalten (Abb. 29). Nach Öffnen der Außenmembran durch hypotonische Schwellung und Proteasebehandlung wird ein Fragment f mit einer apparenten Molekülmasse von 58 kDa erhalten. Die Masse dieses Fragmentes korreliert mit der theoretisch errechneten Masse der carboxyterminalen Matrixdomäne von 58,7 kDa (Abb. 29).

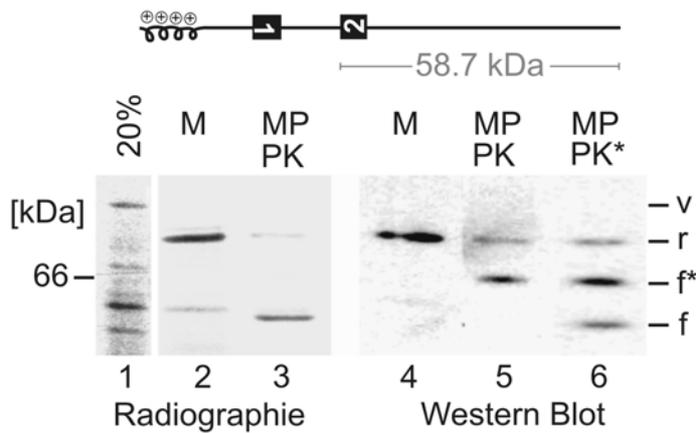


Abb. 29: Yta10-Import in isolierte Mitochondrien.

Radioaktiv markiertes Yta10-Volllängenprotein wurde für 30 min bei 25°C mit Wildtyp-Mitochondrien inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze geteilt und entweder auf Eis stehen gelassen (M), oder während der Schwellung in hypotonischem Puffer (MP) mit 150 µg/ml Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert (linke Hälfte Spuren 2 und 3). Das

endogene Yta10 wurde durch Western Blot in Mitochondrien (M) bzw. geschwollenen Mitochondrien (MP), die mit 150 µg/ml Proteinase K 30 min auf Eis (PK) oder bei 25°C (PK*) inkubiert worden waren, detektiert (rechte Hälfte Spuren 4-6). Die aus dem Vorstufenprotein (v) gebildete reife Form (r) wurde durch die Proteasebehandlung in die Fragmente f und f* umgewandelt.

Yta10 ist Teil eines hochmolekularen Komplexes in der Innenmembran. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die im Intermembranraum gelegene Domäne von Yta10 aufgrund der Assemblierung kaum für Proteasen zugänglich ist (Pajic *et al.*, 1994). Im Rahmen dieser Studie zeigte sich allerdings, dass auch das endogene Yta10 durch Zugabe von Protease zu Mitoplasten zu einem Fragment von ca. 62 kDa verkürzt wurde (vgl. f*). Bei Erhöhung der Proteasekonzentration (auf 200 µg/ml) sowie der Reaktionstemperatur (auf 25°C) wurde Yta10 zumindest teilweise zu einem carboxyterminalen Fragment von 58 kDa abgebaut. Dieses konnte mit Hilfe eines gegen den Carboxyterminus gerichteten Antikörpers durch Western Blot immunochemisch nachgewiesen werden (Abb. 29 Spur 6). Demnach verhielt sich das *in vitro* importierte Yta10-Vorstufenprotein ähnlich wie endogenes Yta10 und wurde wie dieses in die Innenmembran sortiert.

3.2.2.1 Yta10 bildet eine in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Sortierungszwischenstufe

Im Folgenden sollte der Sortierungsweg von Yta10 genauer untersucht werden. Dazu wurde das chimäre Fusionsprotein Yta10(1-265)-DHFR^{mut} bestehend aus den ersten 265 Aminosäureresten des Yta10 Proteins und einer faltungsdefizienten Variante der DHFR eingesetzt. Dieses Fusionsprotein umfasst beide Transmembrandomänen von Yta10 sowie weitere 20 Aminosäurereste der carboxyterminalen Matrixdomäne (Abb. 30A). Dieses Fusionsprotein ermöglicht die Insertion des importierten Proteins durch die Bildung

aminoterminaler und carboxyterminaler Fragmente zu verfolgen. Das mit [^{35}S]-Methionin markierte Fusionsprotein wurde in isolierte Mitochondrien importiert und der Reaktionsmischung nach verschiedenen Inkubationszeiten Proben entnommen. Die Mitochondrien wurden anschließend geschwollen und gleichzeitig mit Proteinase K inkubiert. Nach kurzen Inkubationszeiten wurde lediglich die von MPP prozessierte reife Form des Fusionsproteins gefunden.

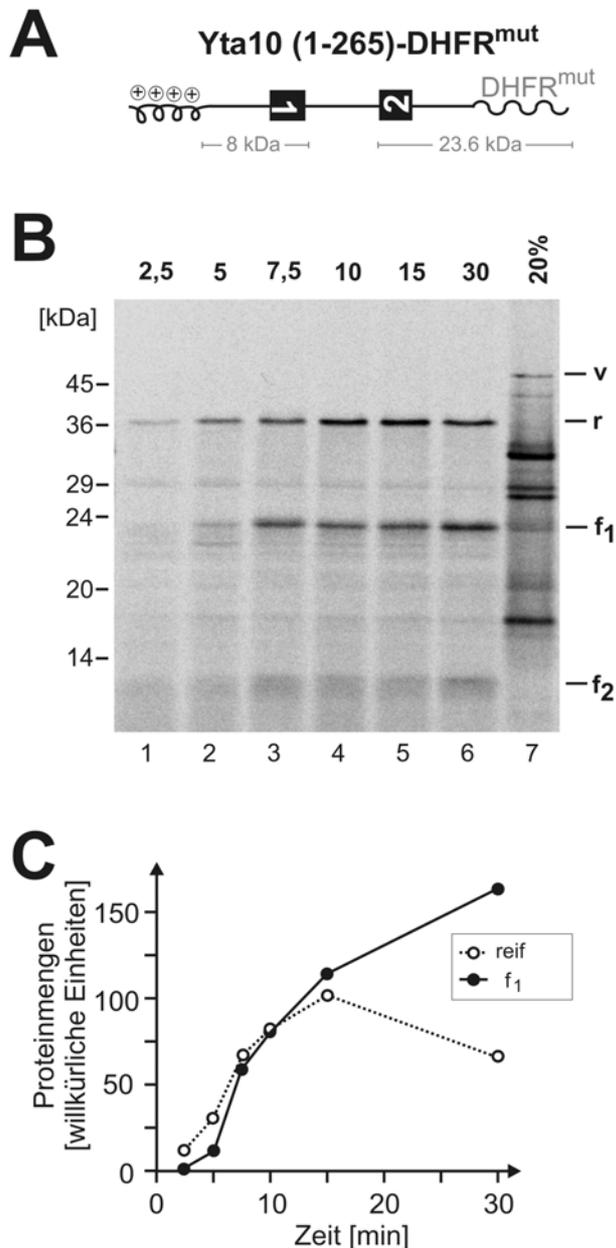


Abb. 30: Yta10 bildet ein Sortierungszwischenprodukt in der Matrix.

A, Schematische Darstellung des Vorstufenproteins Yta10(1-265)-DHFR^{mut}. Die Molekülmassen der inserierten Fragmente sind angegeben. B, Radioaktiv markiertes Yta10(1-265)-DHFR^{mut} (v) wurde in Wildtypmitochondrien über die angegebenen Zeiträume bei 25°C importiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, durch hypotonische Schwellung in Mitoplasten umgewandelt und mit 150 µg/ml Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf Nitrozellulose transferiert und über Autoradiographie analysiert. Die Zugänglichkeit des Innenmembranraumes wurde durch Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen das Innenmembranprotein Dld1 kontrolliert (nicht gezeigt). Die durch Proteasezusatz erhaltenen Fragmente von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} sind mit f₁ und f₂ bezeichnet. C, Die Signale für die reife (r) und die fragmentierte (f₁) Form von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden entsprechend dem Gehalt an Methionin korrigiert.

Der Bereich zwischen den Transmembrandomänen war demzufolge unzugänglich für Proteasen und somit in der Matrix lokalisiert. Im weiteren Verlauf der Reaktion konnte eine Abnahme des in der Matrix geschützten, gereiften Proteins verfolgt werden. Stattdessen

wurden zwei neue Fragmente (f_1 und f_2) gebildet. Sie hatten eine apparente Molekülmasse von 24 bzw. 9 kDa, was den errechneten Molekülmassen des carboxyterminalen (23,6 kDa f_1) bzw. des aminoterminalen Fragments (8 kDa f_2) entspricht (Abb. 30B). Wie aus der in Abb. 30C wiedergegebenen Quantifizierung deutlich wird, durchlief die reife, matrixgeschützte Form von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} ein Maximum nach 15 min, während die Werte für das fragmentierte, inserierte Fusionsprotein über den gezeigten Zeitraum kontinuierlich zunahmen. Daraus lässt sich schließen, dass das Fusionsprotein Yta10(1-265)-DHFR^{mut} ein lösliches Sortierungsintermediat in der mitochondrialen Matrix bildet, welches im Verlauf der Reaktion in die Innenmembran inseriert und zugänglich für von außen zugesetzte Protease wird.

3.2.2.2 Die Bedeutung von Oxa1 für die Insertion von Yta10 in die Innenmembran

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Yta10 ein Sortierungsintermediat in der Matrix bildet, sollte als Nächstes geklärt werden, ob die Insertion der beiden Transmembrandomänen in Abhängigkeit von Oxa1 erfolgt. Oxa1 ist ein Insertionsfaktor für Su9(1-112)-DHFR (Hell *et al.*, 2001). Daher wurde die Insertionskinetik von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} in $\Delta oxa1$ -Mitochondrien verfolgt (Abb. 31).

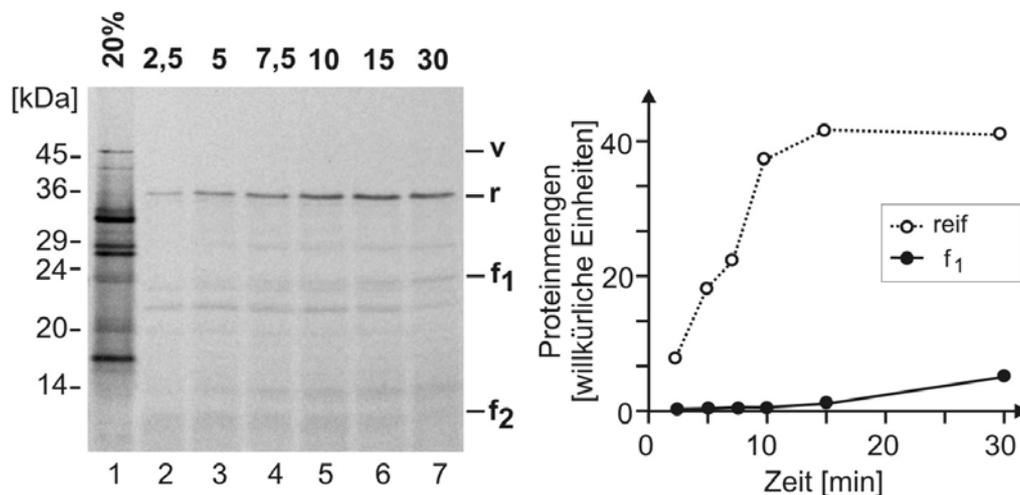


Abb. 31: Yta10 wird in $\Delta oxa1$ Mitochondrien importiert, aber nur sehr ineffizient sortiert.

Radioaktiv markiertes Yta10(1-265)-DHFR^{mut} (v) wurde über die angegebenen Zeiträume bei 25°C in $\Delta oxa1$ -Mitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, geschwollen und mit 150 µg/ml Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert. f_1 und f_2 stellen die nach Insertion in die Innenmembran durch Proteasebehandlung erhaltenen Fragmente von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} dar. Die Signale für die reife (r) und die fragmentierte (f_1) Form von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} wurden densitometrisch quantifiziert und die Werte entsprechend dem Gehalt an Methionin korrigiert.

Zwar wurde das Fusionsprotein effizient in die $\Delta oxa1$ -Mitochondrien importiert, dennoch war die Insertion in die Innenmembran drastisch verringert, was sich in der fast vollständigen Unzugänglichkeit der Intermembranraumdomäne für extern zugesetzte Protease äußerte. Selbst nach einer Inkubation von 30 min konnte das carboxyterminale Fragment kaum detektiert werden. Aufgrund der Deletion von *OXA1* fehlt diesen Mitochondrien eine funktionelle Cytochrom c-Oxidase sowie ein Teil der Aktivitäten der Cytochrom c-Reduktase und der F_1F_0 -ATPase, was zu einer deutlichen Verringerung des Membranpotentials in diesen Mitochondrien führt (Abb. 32) Dieser Effekt kann auch in Mitochondrien beobachtet werden, die aufgrund des Fehlens von mitochondrialer DNS keine Atmungskette besitzen (ρ^0).

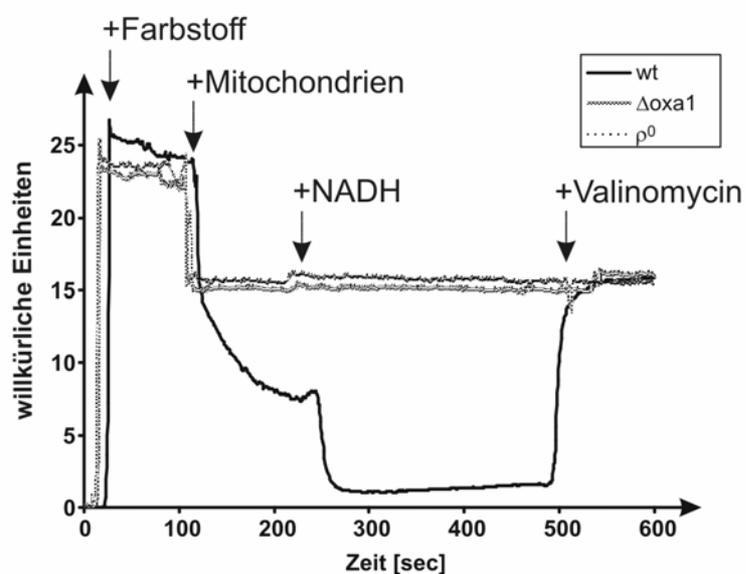


Abb. 32: Vergleich der Membranpotentiale in Wildtyp- $\Delta oxa1$ - und ρ^0 -Mitochondrien.

Aus den angegebenen Stämmen isolierte Mitochondrien wurden wie unter 2.4.10 beschrieben in einem Fluorimeter bei 25°C vermessen. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes DiSC₃(5) (+Farbstoff) und der Mitochondrien (+Mitochondrien) wurden 2 mM NADH (+NADH) zur Stimulation eines Membranpotentials zugesetzt, das durch Zugabe von 10 nM Valinomycin (+Valinomycin) vernichtet wurde.

Die beobachtete drastische Abnahme der Insertion in die Innenmembran von $\Delta oxa1$ -Mitochondrien konnte daher entweder mit dem Fehlen der Proteinexportkomponente Oxa1, oder mit einem zu geringen Membranpotential zusammenhängen. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Sortierungskinetik von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} in Mitochondrien (*oxa1^{ts}*) untersucht, die die bereits beschriebene temperatursensitive Mutante von Oxa1 enthielten (Bauer *et al.*, 1994).

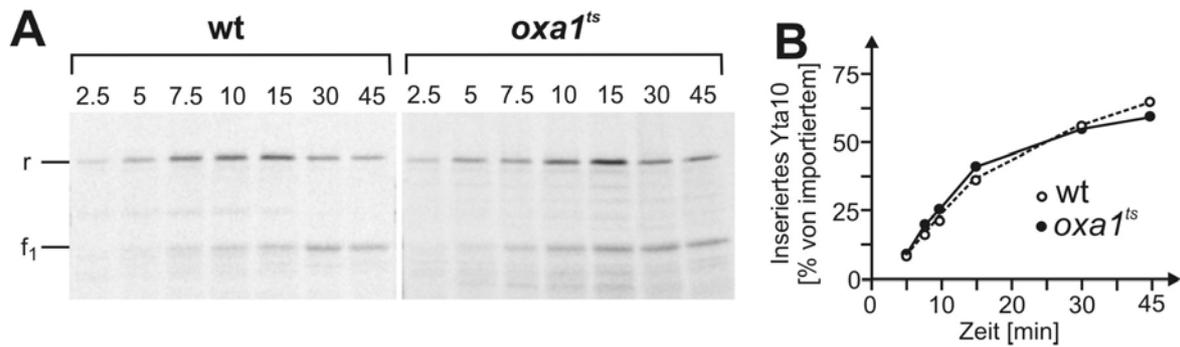


Abb. 33: Import und Insertion von Yta10 in $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien erfolgen mit ähnlicher Geschwindigkeit wie in Wildtyp-Mitochondrien.

A, Radioaktiv markiertes Yta10(1-265)-DHFR^{mut} wurde in Wildtyp- und $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien nach Vorinkubation von 10 min bei 37°C über die angegebenen Zeiträume bei 25°C importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert, geschwollen und mit 150 µg/ml Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert wie in Abb. 31. **B**, Die Signale für die reife (r) und die fragmentierte (f_1) Form von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} wurden densitometrisch quantifiziert und die Werte entsprechend dem Gehalt an Methionin korrigiert. Gezeigt ist der Anteil an für die Protease zugänglichem Material (d.h. in die Innenmembran inseriertes Material) im Verhältnis zur Gesamtmenge des importierten Yta10.

Wie bereits unter 3.2.1.4 beschrieben, liegt nach Inaktivierung von Oxa1^{ts} in diesen Mitochondrien ein normales Niveau des Membranpotentials vor (Hell *et al.*, 1997). Yta10(1-265)-DHFR^{mut} inserierte effizient in die Innenmembran der $oxa1^{ts}$ -Mitochondrien (Abb. 33A) und zeigte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Kinetik (Abb. 33B). Demnach scheint die Funktionsfähigkeit von Oxa1 keine Bedeutung für die Insertion von Yta10 zu haben, während die Insertion anderer Vorstufenproteine, die Oxa1 benötigen, unter diesen Bedingungen vollständig unterblieb (nicht gezeigt). Einen weiteren Hinweis dafür, dass Yta10 ohne die Vermittlung von Oxa1 und Mba1 in die Innenmembran inserieren kann, liefert die Beobachtung, dass in $\Delta oxa1$ - und $\Delta mba1$ -Mitochondrien normale Mengen von endogenem Yta10 nachgewiesen werden konnten (Abb. 34).

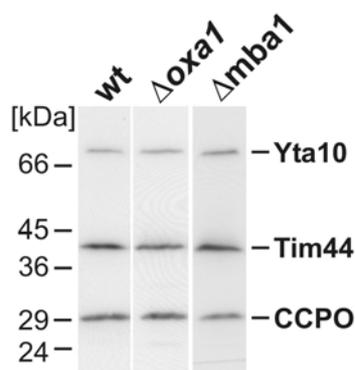


Abb. 34: $\Delta oxa1$ - und $\Delta mba1$ -Mitochondrien enthalten normale Mengen an endogenem Yta10.

Isolierte Mitochondrien aus Wildtyp-, $\Delta oxa1$ - und $\Delta mba1$ -Zellen wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei wurden Antikörper gegen die mitochondrialen Proteine Yta10, Tim44 und Cytochrom c-Peroxidase (CCPO) eingesetzt.

3.2.2.3 Die Insertion von Yta10 ist abhängig vom Membranpotential $\Delta\psi$

Nachdem die starke Reduktion der Membraninsertion von Yta10 in Δoxa1 -Mitochondrien möglicherweise auf ein vermindertes Membranpotential in diesen Mitochondrien zurückzuführen war, sollte im Folgenden der Einfluss des Membranpotentials auf die Insertion von Yta10 in die Innenmembran genauer analysiert werden. Dazu wurden Insertionskinetiken von Yta10 in An- und Abwesenheit von NADH in Mitochondrien untersucht (Abb. 35)

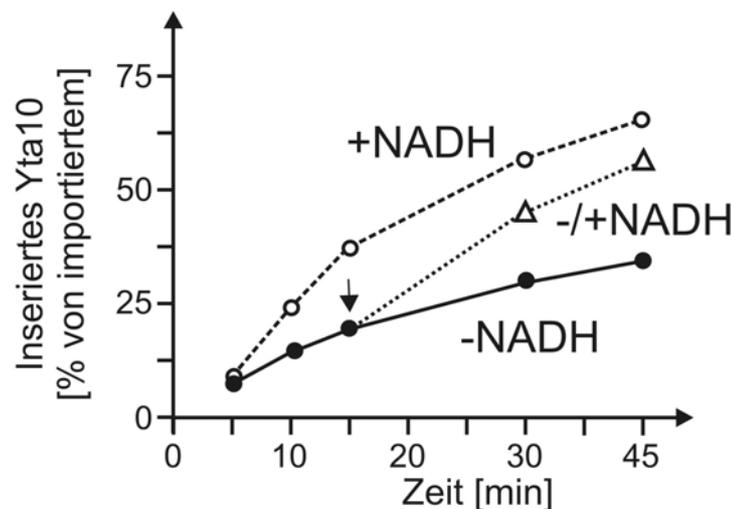


Abb. 35: Die Yta10-Insertion ist abhängig vom Membranpotential.

Radioaktiv markiertes Yta10(1-265)-DHFR^{mut} wurde über die angegebenen Zeiträume bei 25°C in Anwesenheit (+NADH) oder Abwesenheit (-NADH) von NADH und unter Zusatz von 40 μM Oligomycin in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Nach Ablauf von 15 min wurde einem Teil der Proben, die ursprünglich ohne NADH inkubiert worden waren, nachträglich 2 mM NADH zugesetzt (-/+NADH). Die Proben wurden weiter bei 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, geschwollen und mit Proteinase K behandelt. Nach Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE wurden die Signale für die reife sowie die fragmentierte Form von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden entsprechend dem Gehalt an [³⁵S]-Methionin korrigiert. Es wurde der Anteil an proteasezugänglichem Material (d.h. in die Innenmembran inseriertes Material) im Verhältnis zum insgesamt importierten Yta10 bestimmt. Die Datenreihe mit offenen Kreisen repräsentiert dabei die Insertionsrate von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} in Mitochondrien in Gegenwart von 2 mM NADH während des Imports. Die ausgefüllten Kreise stellen die entsprechend bestimmte Insertionsrate in Mitochondrien ohne NADH dar, während die offenen Dreiecke analog die Insertionsrate der Proben zeigen, zu denen nach 15 min (\downarrow) NADH zugesetzt wurde.

Die Proben, in denen der Import ohne NADH erfolgte, enthielten zusätzlich Oligomycin, um den Aufbau eines Membranpotentials durch ATP-Verbrauch mit Hilfe der F_1F_0 -ATPase zu unterbinden. In den Proben ohne NADH-Zusatz war die Insertionsrate von Yta10(1-265)-DHFR^{mut} in die Innenmembran deutlich vermindert. Um zu untersuchen,

inwieweit das in der Matrix geschützte Protein immer noch insertionsfähig ist, wurde bei einem Teil der Proben nach 15 min Import ohne NADH das Membranpotential durch nachträglichen Zusatz von NADH regeneriert. Dies führte zur erneuten Insertion des in der Matrix akkumulierten Proteins in die Innenmembran sowie zum Transport der zwischen den beiden Transmembrandomänen gelegenen Domäne in den Intermembranraum. Somit konnte gezeigt werden, dass das in der Matrix akkumulierte reife Protein nach wie vor insertionskompetent ist und somit ein echtes Sortierungsintermediat darstellt.

Die Tatsache, dass Yta10 bei einem etwas erniedrigten Membranpotential zwar in die Matrix importiert, aber nicht mehr in die Innenmembran inseriert wurde, zeigt, dass die Insertion eine höhere Membranpotentialschwelle besitzt als der Import in die Matrix, der auch ohne Zusatz von NADH effizient erfolgte. Dies könnte durch die Mithilfe von Ssc1 beim Import erklärt werden, welches einen Teil der treibenden Kraft für die Translokation darstellt, wahrscheinlich jedoch keinen Einfluss auf den Export der Intermembranraumdomäne hat.

4 Diskussion

4.1 Proteinfaltung und Chaperone

Eine Grundvoraussetzung für die biologische Aktivität von Proteinen ist die Ausbildung und Erhaltung einer bestimmten dreidimensionalen Struktur. Um diese Struktur unter gegebenen physiologischen Bedingungen reproduzierbar und schnell einzunehmen und um inaktive und unproduktive Fehlfaltungen zu vermeiden, existiert in allen Organismen eine Vielzahl von Hilfsproteinen, so genannten Chaperonen. Diese verhindern nicht nur Fehlfaltungen während bzw. nach der Synthese von Proteinen, sondern schützen Proteine auch vor Denaturierung und Verlust ihrer biologischen Aktivität in Folge von Stresseinflüssen aus der Umwelt. Da in eukaryotischen Zellen verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen chemischen Milieus existieren, enthält jedes Kompartiment auch einen eigenen Satz an Chaperonen. Diese spielen zum Teil bereits beim Transport der einzelnen Proteine in ihr jeweiliges Zielkompartiment eine wichtige Rolle, da viele Transportreaktionen eine besondere Konformation des zu transportierenden Proteins voraussetzen, die durch Chaperone stabilisiert wird.

4.1.1 Ecm10 als Mitglied der Hsp70-Familie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Ecm10 ein neues Mitglied der Klasse der Hsp70-Chaperone identifiziert und funktionell näher charakterisiert. Insgesamt enthält das Hefegenom 14 Hsp70-Gene. Ein Überblick über die phylogenetische Beziehung der verschiedenen Hsp70-Proteine in *S. cerevisiae* ist in Abb. 36 gezeigt.

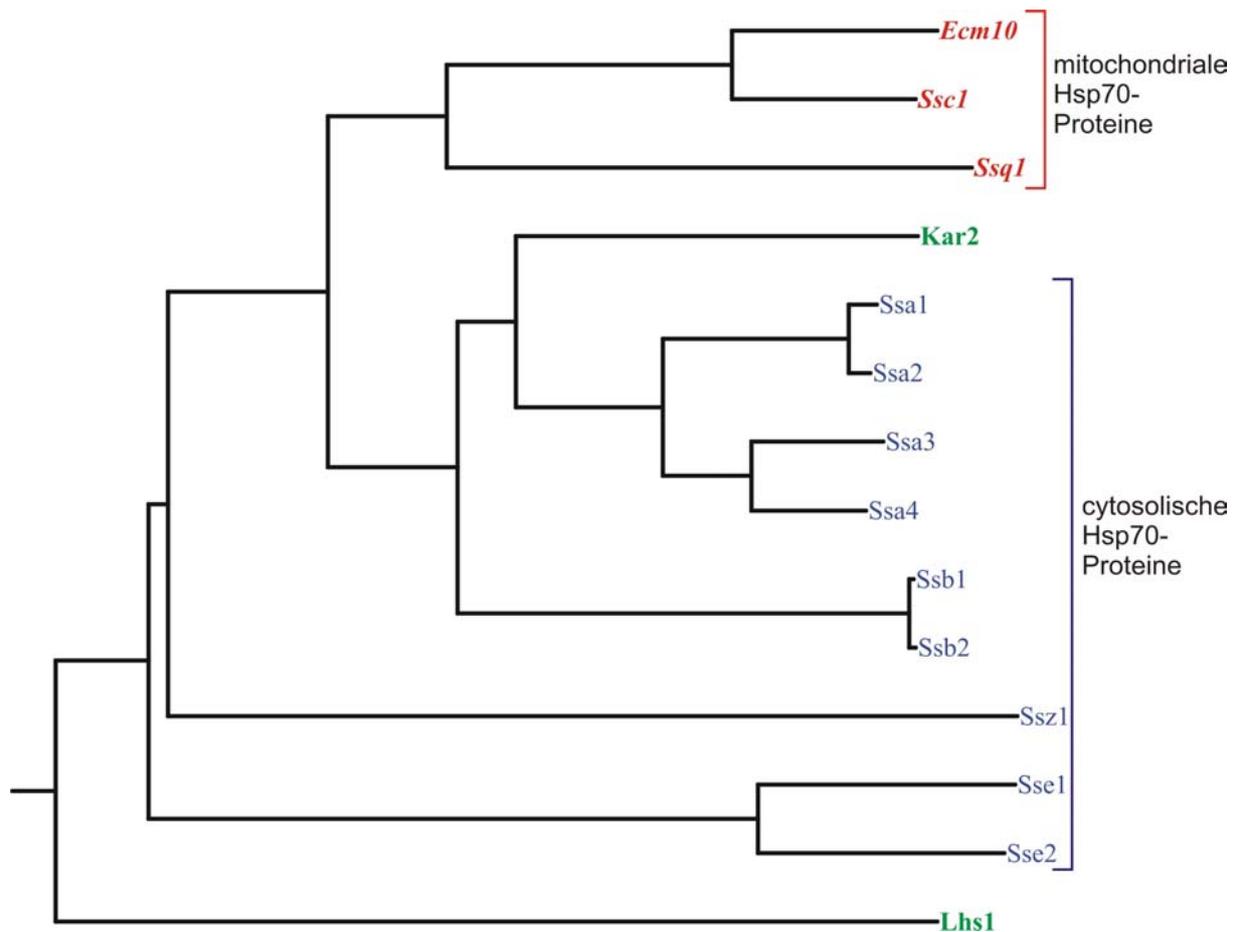


Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum der Hsp70-Proteine von *S. cerevisiae*

Die Aminosäuresequenzen aller 14 in *S. cerevisiae* bekannten Hsp70-Proteine wurden mit Hilfe des Programms DNAMAN 4.11 analysiert und darauf basierend ein Stammbaum erstellt.

Wie aus Abb. 36 ersichtlich bilden Ssc1, Ssq1 und Ecm10 (rot) eine eigene Untergruppe innerhalb der Hsp70-Proteine von *S. cerevisiae*. Gleichzeitig wird deutlich, dass Ecm10 und Ssc1 nahe verwandte Homologe sind. Solche Paare homologer Hsp70-Proteine sind typisch für diese Proteinfamilie, wie die Beispiele Ssa1/Ssa2, Ssa3/Ssa4, Ssb1/Ssb2 und Sse1/Sse2 zeigen. Für Homologe der Ssa- und Ssb-Gruppe konnte gezeigt werden, dass sie zum Teil deutlich in ihrer Funktion überlappen (Baxter und Craig, 1998; Nelson *et al.*, 1992). Gleiches legen die Ergebnisse dieser Arbeit für Ssc1 und Ecm10 nahe.

Diese Ausbildung redundanter Systeme könnte besonders dann von Bedeutung sein, wenn es sich bei der fraglichen Reaktion um einen verschiedenen Substrate betreffenden, für die Zelle grundlegend wichtigen Prozess handelt (z.B. die Proteinfaltung), der aber im Einzelfall zusätzlich genauestens reguliert werden muss. Im Rahmen der Ausbildung redundanter Systeme erlangt der Organismus nach Genamplifikation und anschließender Differenzierung eine geringere Anfälligkeit gegenüber schwankenden Wachstumsbedingungen.

4.1.2 Struktureller Vergleich zwischen Ecm10 und Ssc1

Zwar sind die Aminosäuresequenzen von Ecm10 und Ssc1 zu 82 % identisch, dennoch bestehen einige deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proteinen. So befinden sich zum Beispiel am Aminoterminus im Bereich der Präsequenz sowie am Carboxyterminus Abschnitte mit lediglich geringer Sequenzähnlichkeit. Um die räumliche Lage der Aminosäureaustausche und damit ihre Relevanz für die Struktur von Ecm10 im Vergleich zu Ssc1 genauer zu verdeutlichen, wurde der Sequenzvergleich der Aminosäuren auf die bekannte Struktur des bakteriellen Hsp70-Proteins DnaK projiziert. Dabei sind die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen Ecm10 und Ssc1 besonders gekennzeichnet (Abb. 37A und B grün gefüllte Punkte).

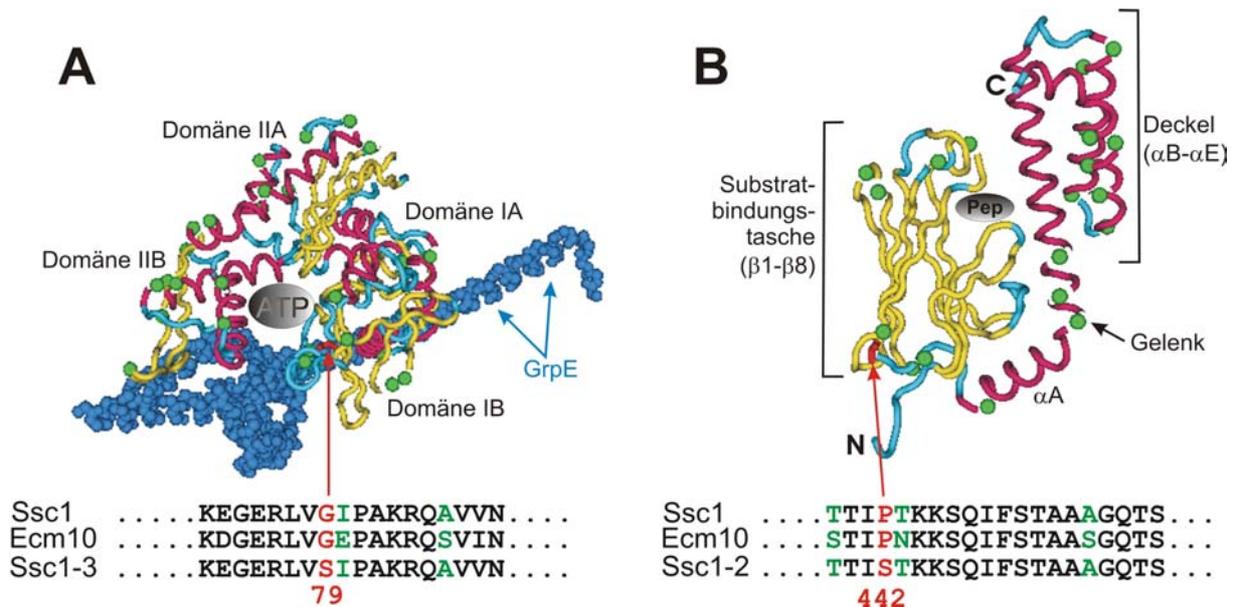


Abb. 37: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ecm10 und Ssc1.

Zur Beschreibung siehe Text. A, Kristallstruktur der ATPase-Domäne von DnaK (Aminosäurereste 3-383 als Schlaufenmodell dargestellt) im Komplex mit GrpE (blaues Kalottenmodell) nach Harrison *et al.*, 1997. Die Subdomänen der ATPase-Domäne sind eingezeichnet. ATP, ATP-Bindungsregion. Pfeil und Sequenzausschnitte unterhalb der Struktur verdeutlichen Lage der Punktmutation in Ssc1-3 sowie der angrenzenden Regionen (Nummerierung nach Ssc1). B, Kristallstruktur der Peptidbindungsdomäne (Aminosäurereste 389-607) von DnaK nach Zhu *et al.*, 1996. Die Subdomänen sind angegeben (β -Faltblattstrukturen mit $\beta 1$ - $\beta 8$, α -Helices mit αA - αE). Pep, Lage des gebundenen Peptids in der Peptidbindungsdomäne; N, Aminogruppe der Aminosäure Val₃₈₉ (Nummerierung nach DnaK); C, Carboxylatgruppe der Aminosäure Ala₆₀₇ (Nummerierung nach DnaK) der Pfeil und Sequenzausschnitte unterhalb der Struktur verdeutlichen die Lage der Punktmutation in Ssc1-2 sowie der angrenzenden Regionen (Nummerierung nach Ssc1).

Ssc1 und Ecm10 besitzen sowohl im Bereich der ATPase-Domäne (Abb. 37A), als auch im Bereich der Peptidbindungsdomäne (Abb. 37B) eine größere Anzahl nicht konservierter Aminosäurereste. Diese nicht konservierten Aminosäurereste befinden sich hauptsächlich an der Proteinoberfläche. Die zentralen Bereiche im Inneren der Domänen mit den relevanten Oberflächen für die Bindung von ATP und die Peptidbindung sind dagegen vollständig konserviert. Dies legt nahe, dass die meisten Unterschiede zwischen beiden Proteinen keine große Bedeutung für die Funktionalität haben. Auffallend ist, dass insbesondere β -Faltblatt-Bereiche kaum von Aminosäureaustauschen betroffen sind. Im Falle der ATPase-Domäne sind die variablen Stellen gleichmäßig an der Oberfläche des Proteins verteilt, wobei die Kontaktoberfläche, an welcher der Nukleotidaustauschfaktor Mge1 an die ATPase-Domäne bindet, nur wenige Änderungen zeigt. Speziell die für die Bindung zwischen DnaK und GrpE verantwortlichen Salzbrücken, die durch die Aminosäuren Lys₅₅ und Arg₅₆ im Bereich der Domäne IB (Nomenklatur und Bezifferung gemäß DnaK) sowie durch Glu₂₆₄ und Glu₂₆₇ im Bereich der Domäne IIB der ATPase-Domäne gebildet werden (Brehmer *et al.*, 2001), sind in Ssc1 und Ecm10 konserviert.

Die meisten Austausche im Bereich der Peptidbindungsdomäne befinden sich innerhalb der helikalen Abschnitte des so genannten Deckels (α B- α E) und in der Nähe des Gelenks (Abb. 37B). Auch hier fällt auf, dass die Austausche im Bereich der Helix α B nicht in dem Abschnitt auftreten, der direkt mit dem gebundenen Peptid in Kontakt kommt. Dies könnte darauf hindeuten, dass Ecm10 ähnliche Substratmotive bindet wie Ssc1. Allerdings könnten speziell die unterschiedlichen Reste im Bereich des Gelenkes einen beträchtlichen Einfluss auf die Beweglichkeit dieser Domäne haben und somit die Bindungseigenschaften von Ecm10 entscheidend beeinflussen (vgl. auch Zhu *et al.*, 1996). Möglicherweise beinhaltet die Funktion von Ecm10 die Bindung der gleichen Substrate, die auch von Ssc1 gebunden werden, jedoch mit einer deutlich anderen Öffnungs- und Schließeeigenschaft als bei Ssc1.

Derzeit lässt sich nur schwer abschätzen, inwieweit die Aminosäureaustausche an der Peripherie des Proteins einen Einfluss auf die Bindung des für die Faltungsaktivität benötigten Cochaperons Mdj1 an Ecm10 haben. Bisher ist nicht genau bekannt, über welche Oberflächen der Kontakt zwischen Ssc1 und Mdj1 geknüpft wird. Im Falle der bakteriellen Homologen DnaK und DnaJ wird eine Interaktion im Bereich der carboxyterminalen Deckeldomäne postuliert (Cyr *et al.*, 1994). Da diese zwischen Ecm10 und Ssc1 nicht sehr streng konserviert ist (vgl. Abb. 37B), könnte das Bindungsverhalten von Ecm10 und Mdj1 sich deutlich von dem von Ssc1 und Mdj1 unterscheiden.

Die Beispiele Ssc1-2 und Ssc1-3 zeigen, dass schon der Austausch eines Aminosäurerestes deutliche Auswirkungen auf die Funktion haben kann. Die beiden betroffenen Aminosäuren Gly₇₉ und Pro₄₄₂ sind in Ecm10 konserviert. Dennoch befindet sich in unmittelbarer Nähe sowohl von Gly₇₉ als auch von Pro₄₄₂ jeweils ein Aminosäureaustausch zwischen Ecm10 und Ssc1 (vgl. Abb. 37). Wie bereits beschrieben, führt der Austausch von Gly₇₉ durch Ser₇₉ dazu, dass das resultierende Ssc1-3 bei nichtpermissiver Temperatur aggregiert und somit weder Mge1 binden noch den Import und die Faltung von mitochondrialen Vorstufenproteinen vermitteln kann (Gambill *et al.*, 1993). Der Austausch von Pro₄₄₂ durch Ser₄₄₂ bewirkt, dass das resultierende Ssc1-2 bei erhöhter Temperatur mit erhöhter Affinität an ungefaltete Proteine bindet, diese aber nur sehr langsam wieder freigesetzt werden (Geissler *et al.*, 2001). Somit könnten die in Abb. 37 dargestellten Austausche ein im Vergleich zu Ssc1 verändertes Verhalten von Ecm10 gegenüber Bindungspartnern von Ssc1 bewirken.

4.1.3 Funktioneller Vergleich zwischen Ecm10 und Ssc1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte Ecm10 als drittes Hsp70-Chaperon in der mitochondrialen Matrix von *S. cerevisiae* identifiziert werden. Neben Ecm10 enthalten die Mitochondrien die Hsp70-Proteine Ssc1 und Ssq1. Ssc1 ist an einer Reihe wichtiger Prozesse beteiligt, wie Proteinimport, -faltung und -abbau. (zur Übersicht siehe Paschen und Neupert, 2001; Craig *et al.*, 1987; Craig *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1994). Das zweite Hsp70-Protein, Ssq1, ist funktionell weniger genau analysiert, scheint aber eine besondere Rolle bei der Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren in Proteinen zu spielen (Lutz *et al.*, 2001). Es stellt sich die Frage, welche Aufgaben dieses dritte Hsp70-Protein übernimmt.

ECM10 wurde erstmals von Lussier *et al.*, 1997 im Zusammenhang mit der Biogenese der Zellwand beschrieben. In der gleichen Studie wurde eine Reihe weiterer Gene für mitochondriale Proteine gefunden. Zu ihnen gehören unter anderem der Transkriptionsfaktor *YIL154C* (Masson und Ramotar, 1996), der Initiationsfaktor Ifm1 (Vambutas *et al.*, 1991) sowie Cox11 (Tzagoloff *et al.*, 1990; Hiser *et al.*, 2000), das an der Biogenese der Cytochrom c Oxidase beteiligt ist. Allerdings ist unklar, welchen Einfluss diese mitochondrialen Proteine auf die Biogenese der Zellwand haben. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen indirekten Effekt. Denkbar wäre beispielsweise, dass Veränderungen im Energiestoffwechsel der Zelle durch die mitochondrialen Defekte die Synthese von Zuckern beeinflussen könnten, die in großer Menge für die Zellwandbildung gebraucht werden.

ECM10 selbst ist kein essentielles Gen, was mehrere Gründe haben könnte:

- (1) *Ecm10* ist an Vorgängen beteiligt, die keinen wesentlichen Einfluss auf die essentiellen Stoffwechselprozesse haben.
- (2) *Ecm10* kann aufgrund einer Funktionsüberlappung durch ein anderes Chaperon vollständig ersetzt werden.
- (3) *Ecm10* wird als hochspezialisiertes Hsp70-Chaperon nur für eine definierte Untergruppe von Substratmolekülen benötigt und das möglicherweise nur unter besonderen Wachstumsbedingungen.

Da bisher kein Interaktionspartner von *Ecm10* bekannt ist, bleibt weiterhin ungeklärt, welche mitochondrialen Stoffwechselprozesse von *Ecm10* direkt beeinflusst werden.

Die nahe strukturelle Verwandtschaft zu *Ssc1* erlaubte dennoch erste Einblicke in die Funktionsweise von *Ecm10*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine funktionelle Überlappung durch das Auffinden eines synthetischen Wachstumsdefektes in *ssc1-3Δecm10*-Hefezellen experimentell nachgewiesen werden. Dieser Defekt war auf das Wachstum auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen bei erniedrigter Temperatur beschränkt. Dies könnte darauf hindeuten, dass *Ecm10* zusammen mit *Ssc1* eine spezielle Rolle beim Schutz der Zelle vor Kältestress übernimmt. Ein vergleichbarer Schutz vor Kältestress konnte für die beiden cytosolischen Hsp70-Proteine *Ssb1* und *Ssb2* gezeigt werden (Craig und Jacobsen, 1985). *Ssb1* und *Ssb2* binden an neu gebildete Polypeptidketten, während diese noch mit cytosolischen Ribosomen assoziiert sind, und ermöglichen so eine effiziente Proteinsynthese bei niedrigen Temperaturen (Nelson *et al.*, 1992). Auch hier führt die Inaktivierung beider Gene zu einem kaltesensitiven Wachstumsphänotyp. Analog binden *Ssc1* und *Mdj1* an neusynthetisiertes *Var1*-Protein in der mitochondrialen Matrix (Herrmann *et al.*, 1994b; Westermann *et al.*, 1996). *Ecm10* könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Funktion übernehmen.

Ssc1 ist ein sehr stark exprimiertes Gen und stellt ca. 1 % des gesamten mitochondrialen Proteins dar (Schneider *et al.*, 1994). Das relativ schwache Signal, das im Western Blot mit Epitop-markierten *Ecm10*-Versionen in Mitochondrien gefunden wurde, spricht für eine im Vergleich zu *Ssc1* mindestens 10-100 fach geringere Menge an *Ecm10* (vgl. 3.1.1). *Ecm10* läge somit eher in ähnlich niedrigen Konzentrationen vor wie das weitere mitochondriale Hsp70-Protein, *Ssq1* (Voisine *et al.*, 2000). Somit könnte bereits die geringere Menge von *Ecm10* ein Grund dafür sein, dass die Deletion von *SSC1* nicht kompensiert werden kann. Allerdings gelang auch mit überexprimiertem *Ecm10* keine Komplementierung von

Δssc1-Mutanten (3.1.3.1). Dies legt nahe, dass funktionelle Unterschiede zwischen Ecm10 und Ssc1 bestehen.

Bereits früher wurde dem 10 kDa umfassenden carboxyterminalen Bereich, der innerhalb der Hsp70-Proteine variabel ist, eine besondere Rolle bei der Ausbildung der Substratspezifität zugeschrieben. Ecm10 weicht vor allem im Bereich der letzten 15 Aminosäurereste nennenswert von der Aminosäuresequenz von Ssc1 ab. Diese Abweichung scheint jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität von Ecm10 bzw. Ssc1 zu haben. Sowohl eine um die letzten 21 Aminosäurereste verkürzte Version von Ssc1 als auch eine Chimäre, die anstelle der letzten 19 Aminosäurereste von Ssc1 jene von Ecm10 enthielt, waren voll funktionsfähig (Miao *et al.*, 1997; diese Arbeit). Da die ebenfalls unterschiedlichen Aminotermini nach Import in die Mitochondrien und Prozessierung durch MPP nicht mehr Bestandteil des reifen Proteins sind, sollten auch die Unterschiede in diesen Sequenzabschnitten keinen Einfluss auf die Aktivität des reifen Proteins ausüben. Somit liegt die fehlende Komplementierung der Ssc1-Deletion durch überexprimiertes Ecm10 höchstwahrscheinlich in den bereits unter 4.1.2 beschriebenen strukturellen Abweichungen innerhalb der ATPase- und der Peptidbindungsdomäne begründet.

Nachdem Ecm10 *in vivo* nicht alle Funktionen von Ssc1 übernehmen kann, war es wichtig festzustellen, welche Funktionen übernommen werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass Ecm10 die Importdefekte von *ssc1-3*-Mutanten kompensieren kann (3.1.3.2). Dabei bindet Ecm10 wie Ssc1 an das zu translozierende Vorstufenprotein und vermittelt dessen Import unter Mitwirkung der auch für Ssc1 beschriebenen Interaktionspartner, Mge1 und Tim44 (3.1.3.4 und 3.1.3.5). Da Ecm10 jedoch unter normalen Wachstumsbedingungen nur in geringen Mengen vorliegt, kann diese Aktivität möglicherweise nur unter speziellen Wachstumsbedingungen eine besondere Rolle spielen.

Darüber hinaus verhindert Ssc1 die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen und vermittelt die produktive Faltung in die native Konformation. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Ecm10 diese Funktion nur begrenzt zu übernehmen scheint (3.1.3.3 und 3.1.3.6).

Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass Ecm10 trotz Überexpression die Funktion von Ssc1 *in vivo* nicht ersetzen kann. Bislang ist noch nicht geklärt, ob Ecm10 ähnlich wie Ssc1 an das Cochaperon Mdj1 binden kann oder diese Fähigkeit, ähnlich wie im Falle von Ssq1 diskutiert (Schmidt *et al.*, 2001), eingebüßt hat. Eine wahrscheinlich eingeschränkte

Wechselwirkung mit Mdj1 (vgl. 4.1.2) könnte ursächlich für die geringere Faltungsaktivität von Ecm10 sein.

4.1.4 Ausblick

Obwohl Ecm10 eine hohe Sequenzidentität zu Ssc1 aufweist, scheint sich seine Funktion in der mitochondrialen Matrix von der von Ssc1 unterscheiden. Bislang sind keine endogenen Substrate von Ecm10 bekannt. Somit ist nach wie vor offen, auf welche Prozesse in Mitochondrien Ecm10 Einfluss nimmt.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Funktionsvergleich zwischen Ecm10 und Ssc1 eröffnet jedoch auch weitergehende Möglichkeiten für die Analyse der für die Funktion von Ssc1 relevanten Domänen und Strukturmerkmale. Gerade weil Ecm10 und Ssc1 auf Proteinebene zu 82 % identisch sind, könnten Domänenaustausche zwischen diesen beiden Proteinen geeignet sein, um *in vivo* genauere Erkenntnisse über die Bedeutung bestimmter Aminosäurereste in den einzelnen Bereichen zu gewinnen. Als Einstieg wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit die letzten 15 carboxyterminalen Aminosäuren zwischen Ecm10 und Ssc1 ausgetauscht, mit dem Ergebnis, dass sie keinerlei Einfluss auf die Funktionalität des resultierenden Ssc1/Ecm10-Chimärenproteins haben (3.1.3.1). Wenig ist über die Wechselwirkung der ATPase- und der Peptidbindungsdomäne in Ssc1 bekannt. Diese ist aber insbesondere vor dem Hintergrund der derzeit kontrovers diskutierten Modelle für den Proteinimport in die Matrix von hohem Interesse. Zum einen wird eine Konformationsänderung in Ssc1 als treibende Kraft für die vollständige Translokation in die Matrix postuliert („Einzug“-Modell Pfanner und Meijer, 1995; Matouschek *et al.*, 1997). Andererseits wird das Modell eines einfachen Sperrhakens vorgeschlagen, in dem Ssc1 einfach an das Vorstufenprotein bindet und so das Zurückgleiten der translozierenden Polypeptidkette verhindert (Ungermann *et al.*, 1994; Moro *et al.*, 1999; Okamoto unpublizierte Daten).

4.2 Sortierung polytooper Innenmembranproteine

Für die Biogenese von Mitochondrien wird eine Vielzahl von Proteinen benötigt. Dabei kommt dem Problem der Sortierung von neugebildeten Komponenten eine besondere Bedeutung zu. Vor allem die korrekte Insertion und die daraus resultierende richtige Orientierung von hydrophoben Proteinbereichen stellen einen wichtigen Aspekt dar.

4.2.1 Der konservative Sortierungsweg bitoper Innenmembranproteine

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Import und die Sortierung polytooper Innenmembranproteine am Beispiel der bitoper Membranproteine Mrs2 und Yta10 genauer zu untersuchen. Die beiden Proteine haben eine ähnliche Topologie in der Innenmembran mit je zwei Transmembrandomänen, die eine in den Intermembranraum ragende Domäne flankieren. Mrs2 und Yta10 unterscheiden sich hauptsächlich in der Größe dieser Intermembranraumdomäne, die im Falle von Mrs2 lediglich acht Aminosäurereste umfasst, während es im Falle von Yta10 89 Aminosäurereste sind. Beide Proteine werden an cytosolischen Ribosomen mit einer aminoterminalen Präsequenz synthetisiert und posttranslational mit Hilfe der TOM-Translokase sowie der TIM23-Translokase in die Matrix importiert (Bui *et al.*, 1999; Pajic *et al.*, 1994; Tauer *et al.*, 1994). Für beide Proteine konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals ein lösliches Sortierungsintermediat in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen werden. Nach längeren Importzeiträumen nahm die Menge an matrixlokalisiertem Protein ab, während im gleichen Maße eine in die Membran inserierte Form auftrat. Dies weist darauf hin, dass in beiden Fällen die Sortierung des Proteins in zwei aufeinander abfolgende Schritte unterteilt werden kann: (1) Import in die Matrix und (2) Insertion der Transmembrandomäne in und Transport der Intermembranraumdomäne über die Innenmembran. Beide Proteine folgen damit einem „konservativen“ Sortierungsweg, bei dem die Integration in die Innenmembran in derselben Richtung wie in Bakterien erfolgt. Dies steht im Gegensatz zu dem bisher vorgeschlagenen Weg einer Insertion aus dem Intermembranraum unter Zuhilfenahme eines zusätzlichen internen Insertionssignals (Arnold *et al.*, 1998).

Ein konservativer Sortierungsweg für Innenmembranproteine hätte wichtige Implikationen für die Entwicklung mitochondrialer Membranproteine aus ihren bakteriellen Vorläufern. Die Anknüpfung einer mitochondrialen Zielsequenz an den Aminoterminus wäre

demzufolge ausreichend, um eine korrekte Sortierung sicher zu stellen, nachdem das Gen vom mitochondrialen ins zelluläre Genom transferiert wurde. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Fusion einer mitochondrialen Zielsequenz an das bakterielle Mrs2-Homologe, CorA, zur Sortierung und Funktion des Proteins in eukaryotischen Zellen führt (Bui *et al.*, 1999). Dabei konnte die bereits in Bakterien entwickelte Insertionsmaschinerie auch in Mitochondrien weiterhin eingesetzt werden, nachdem sie um Komponenten erweitert wurde, die von einem intrazellulären Organell benötigt werden. Im Gegensatz dazu erfordert ein Sortierungsweg, der von einer Insertion beider Termini aus dem Intermembranraum ausgeht, die Entwicklung weiterer interner Insertionssignale innerhalb jedes einzelnen Vorstufenproteins. Außerdem müssten weitere Komponenten neu entwickelt werden, die eine spezifische Insertion und Translokation der Matrixdomänen ermöglichen.

4.2.2 Welche Komponenten vermitteln die Translokation von Intermembranraumdomänen?

Unter der Annahme eines konservierten Sortierungsweges, der aus dem bakteriellen Sortierungsweg abgeleitet wurde, stellt sich die Frage, ob neben dem Sortierungsweg selbst auch die für diesen Weg benötigten Translokasen aus dem bakteriellen System in das mitochondriale System übernommen wurden. Das einzige bisher identifizierte Homologenpaar zwischen *E. coli* und Mitochondrien aus *S. cerevisiae*, das Membraninsertion vermittelt, ist YidC bzw. Oxa1. Bisher konnte gezeigt werden, dass das Innenmembranprotein Oxa1 für den effizienten Export aminoterminaler Intermembranraumdomänen des mitochondrial kodierten Cox2 und für konservativ sortierte Proteine wie Su9(1-112)-DHFR benötigt wird (Herrmann *et al.*, 1995; Rojo *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998). Dennoch findet der Export interner Intermembranraumdomänen von mitochondrial kodierten Proteinen auch in Abwesenheit von Oxa1 statt, allerdings mit geringerer Effizienz (Hell *et al.*, 2001). Somit ist Oxa1 nicht notwendigerweise die einzige Translokase der mitochondrialen Innenmembran, die derartige Exportreaktionen aus der Matrix ermöglicht. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass kein funktionelles Oxa1 für die Insertion der Intermembranraumdomänen von Mrs2 und Yta10 benötigt wird. Möglicherweise können auch andere Komponenten die Funktion von Oxa1 übernehmen. Die Tatsache, dass Yta10 mit annähernd normaler Effizienz in *oxa1^{ts}*-Zellen inseriert wird, kann jedoch nicht zwingend als Beweis für Unabhängigkeit des Insertionsprozesses von Oxa1 angesehen werden. Es wäre denkbar, dass *oxa1^{ts}* die Insertion der internen Intermembranraumdomänen vermittelt,

während es die Insertion von aminoterminalen Intermembranraumdomänen nicht mehr übernehmen kann.

Da unter normalen Wachstumsbedingungen jedoch auch in Oxal1-defizienten Mitochondrien unveränderte Mengen von Yta10 im Vergleich zu Wildtypmitochondrien vorhanden sind (vgl. 3.2.2.2), kann Oxal1 für die Insertion von Yta10 nicht essentiell notwendig sein.

Im Zusammenhang mit der Suche nach weiteren Faktoren, welche die Insertion aus der Matrix in die Innenmembran erleichtern, wurde vor kurzem Mba1 beschrieben. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Oxal1-unabhängigen Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen (Preuss *et al.*, 2001). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mrs2 auch in Abwesenheit von Oxal1 und Mba1 in die Innenmembran inseriert und dass auch Δ oxal1- und Δ mba1-Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien über die gleiche Mengen an Yta10 verfügen (3.2.2.2). Da im Falle von Yta10 eine Spontaninsertion der 89 Aminosäurereste umfassenden Intermembranraumdomäne in die Innenmembran unwahrscheinlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass es unter Umständen weitere Insertionsmaschinen in der mitochondrialen Innenmembran gibt. So konnte auch in Chloroplasten gezeigt werden, dass die bitopen Proteine PsbW und PsbX unabhängig von jeder bekannten Translokationskomponente, inklusive dem Oxal1-homologen Alb3, in die Thylakoidmembran inserieren (Woolhead *et al.*, 2001). PsbW und PsbX enthalten wie Mrs2 zwei Transmembrandomänen, die eine eher kurze negativ geladene Domäne einrahmen. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das bitope Protein M13 Procoat ohne das Oxal1-Homologe YidC in die Membran inserieren kann (Samuelson *et al.*, 2001). Die vollständige Translokation der periplasmatischen Domäne erfordert jedoch YidC. Eine sogenannte spontane Insertion in die Innenmembran kann für Proteine wie Mrs2 zwar nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden; dennoch scheint vor dem Hintergrund der wohlgeordneten Struktur der biologischen Membranen ein einfacher Phasenübergang von hydrophoben Sequenzabschnitten in das hydrophobe Innere der Lipiddoppelschicht unwahrscheinlich zu sein.

Wie könnte eine Translokationspore, die den Export von Mrs2 und Yta10 ermöglicht, aussehen? Denkbar wäre, dass die geordnete Packung der Lipide beispielsweise allein durch eingelagerte Transmembrandomänen gestört würde. Diese „Störstellen“ könnten dann als Eintrittsstellen fungieren. Demzufolge würde die Membraninsertion keine substratspezifische Proteintranslokase benötigen und Oxal1 wäre mit seinen fünf Transmembrandomänen nur eine effiziente „Störstelle“ in der Lipiddoppelschicht, deren Funktion auch durch andere

Membranproteine bzw. deren Membrananker zum Teil ersetzt werden könnte. Am Beispiel der Qcr9-1-Mutante konnte dies bereits gezeigt werden. Diese Mutante des mit einer Transmembrandomäne in der mitochondrialen Innenmembran verankerten Qcr9 enthält eine positive Ladung im Bereich der Transmembrandomäne. Zellen die diese Mutation tragen benötigen kein Oxa1, um Cox2 und Qcr9 in die Innenmembran zu inserieren (Saint-Georges *et al.*, 2001). Dieser Befund wurde damit erklärt, dass Oxa1 nur für leicht destabilisierte Transmembrandomänen wie im Falle von Cox2, das eine negative Ladung innerhalb der ersten Transmembrandomäne enthält, benötigt wird. Für Oxa1 wurde dabei die Aufgabe postuliert, mit Hilfe seiner Transmembrandomänen die laterale Freisetzung in die Lipidschicht zu erleichtern (Saint-Georges *et al.*, 2001). Durch die Einführung der positiven Ladung in der Transmembrandomäne von Qcr9, das in der Atmungskette im zu Cox2 benachbarten Komplex III lokalisiert ist, könnten sich nun beide destabilisierten Transmembrandomänen von Qcr9 und Cox2 durch elektrostatische Wechselwirkungen gegenseitig die Insertion erleichtern.

4.2.3 Woher kommt die Energie für die Insertion?

Ein weiterer interessanter Aspekt besteht in der Frage nach der energetischen Grundlage für den Insertionsprozess. Im Falle der bakteriellen Innenmembranproteine wurde vorgeschlagen, dass die Insertion hauptsächlich durch einen sogenannten elektrophoretischen Effekt vorangetrieben wird (Schuenemann *et al.*, 1999). Demnach würden negativ geladene Domänen an die positiv geladene periplasmatische Oberfläche der Membran gezogen. Dies könnte auch ein Grund für die „Positiv Inside“-Regel sein, wonach die Ladungsverteilung auf beiden Seiten der Transmembrandomänen deren Orientierung bestimmt. Diese Überlegungen scheinen auch auf mitochondriale Protein erweiterbar zu sein (Andersson und von Heijne, 1994; Gavel und von Heijne, 1992; Rojo *et al.*, 1999). Die Intermembranraumdomänen von Mrs2 und Yta10 sind negativ geladen, weshalb ein elektrophoretischer Effekt als treibende Kraft denkbar wäre. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte eine reduzierte Insertionseffizienz in Mitochondrien mit geringerem Membranpotential beobachtet werden. Dabei war die Abhängigkeit vom Membranpotential im Falle von Yta10 ausgeprägter als bei Mrs2. Dies hängt möglicherweise mit der im Falle von Yta10 deutlich größeren Intermembranraumdomäne zusammen, die über die Innenmembran transportiert werden muss. Da sowohl der Import in die Matrix, als auch der Export aus der Matrix ein Membranpotential erfordern und zudem beide Reaktionen zeitlich eng aneinander gekoppelt

sind, gelang keine genauere Untersuchung der Membraninsertion der Intermembranraumdomäne aus der Matrix. Dieses experimentelle Problem könnte wie folgt begründet werden: Unter der Annahme, dass die Importreaktion deutlich langsamer erfolgt als die Exportreaktion aus der Matrix, könnte im Fließgleichgewicht kein Sortierungsintermediat in der Matrix nachgewiesen werden.

4.2.4 Gibt es ein allgemeines Prinzip für die Insertion von Innenmembranproteinen?

Ist die Insertion negativ geladener Domänen von der Matrix aus unter Ausnutzung elektrophoretischer Effekte ein generelles Prinzip bei der Biogenese von Innenmembranproteinen mit internen Intermembranraumdomänen oder stellen Mrs2 und Yta10 Ausnahmefälle dar? Falls der konservative Sortierungsweg typisch ist für die Insertion von Innenmembranproteinen, die über die TIM23-Translokase importiert werden, so sollten die Intermembranraumdomänen dieser Proteine generell saure Aminosäurereste enthalten. Eine Überprüfung der isoelektrischen Punkte der im Intermembranraum lokalisierten Aminosäurereste verschiedenster Vorstufenproteine ist in Abb. 38 wiedergegeben:

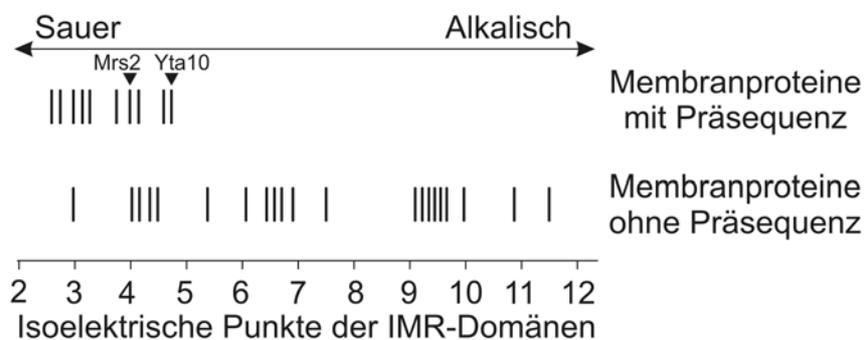


Abb. 38: Vergleich der isoelektrischen Punkte der Intermembranraumdomänen verschiedener Innenmembranproteine

Die isoelektrischen Punkte der Intermembranraumdomänen von Innenmembranproteinen mit (obere Reihe) oder ohne (untere Reihe) aminoterminaler mitochondriale Zielsequenz wurden mit dem Programm DNAMAN 4.1 berechnet. Die folgenden Hefepoteine mit bekannter Topologie (und Homologe von ihnen) wurde verwendet: mit Präsequenz: Mrs2 (Lpe10), Yta10 (Yta12), Oxa1 (Cox18), Sdh4 (Tim18, YLR164w), Pnt1; ohne Präsequenz: Tim23, Tim17, Tim22, Aac2 (Crc1, Dic1, Flx1, Leu5, Odc2, Sfc1, Ctp1, YPR011c). Die Lage der Intermembranraumdomäne von Mrs2 und Yta10 ist jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet.

Es wurde differenziert zwischen solchen Innenmembranproteinen, die eine aminoterminaler Präsequenz tragen und somit Substrate der TIM23-Translokase darstellen und

solchen, die interne Import- und Sortierungssignale enthalten und folglich über den TIM22-Komplex importiert und inseriert werden. Wie die obere Zeile der TIM23-Substrate zeigt, konnte tatsächlich eine Bevorzugung negativer Reste im Bereich der Intermembranraumdomänen dieser Proteine gefunden werden. Dagegen ist bei den Substraten des TIM22-Komplexes keine derartige Bevorzugung erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass die Insertion aus der Matrix einen allgemeinen Sortierungsweg für TIM23-sortierte Innenmembranproteine repräsentiert.

Obwohl Mrs2 dem konservativen Sortierungsweg folgt, verfügt es über ein internes Insertionssignal, das die Insertion des Carboxyterminus vom Intermembranraum aus in die Matrix ermöglicht (vgl. 3.2.1.1). Allerdings war dieses Signal nicht zwingend notwendig für den Import und die korrekte Lokalisation des Volllängenproteins sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die in Mitochondrien lokalisierte Menge des mutierten Mrs2, dem das zweite Insertionssignal fehlte, war allerdings geringfügig reduziert (vgl. 3.2.1.2). Möglicherweise beeinflussen die basischen Aminosäurereste die Assemblierung von Mrs2, oder sie sind für die Retention des Carboxyterminus in der Matrix verantwortlich, nachdem die Intermembranraumdomäne exportiert wurde. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass ein kleiner Bruchteil des importierten Mrs2 während des Imports in der Membran stecken bleibt und dass dann das interne Signal von Bedeutung ist, um dennoch eine korrekte Lokalisation des Carboxyterminus und damit die Funktionalität sicherzustellen. Die Tatsache, dass ein Vorstufenprotein unter Umständen sowohl von der Intermembranraumseite, als auch von der Matrix aus in die Innenmembran inserieren kann, markiert möglicherweise einen Übergangszustand der Evolution der Sortierungswege. Ein Beispiel für diesen Übergang könnte Cytochrom c_1 sein, für das sowohl ein konservativer Sortierungsweg (Hartl *et al.*, 1987 und Hartl und Neupert, 1990), als auch ein alternativer Sortierungsweg mit zwei unabhängig voneinander erfolgenden Insertionsschritten für Amino- und Carboxyterminus (Glick *et al.*, 1992b; Glick *et al.*, 1992a; Wachter *et al.*, 1992) diskutiert wurde. Unstrittig ist, dass Cytochrom c_1 , das als Vorstufenprotein ähnlich wie Mrs2 die Innenmembran zweifach durchspannt, über ein zweites internes Insertionssignal verfügt, das den Import des Carboxyterminus in Mitochondrien ermöglicht (Arnold *et al.*, 1998). Bisher wurde jedoch nicht gezeigt, ob dieses Signal in Anwesenheit des aminoterminalen Importsignals zwingend notwendig ist für die korrekte Sortierung und Funktion von Cytochrom c_1 . Immerhin verfügt auch das Vorstufenprotein von Cytochrom c_1 über eine Intermembranraumdomäne, die einen sauren isoelektrischen Punkt (pI 4,7) aufweist. Somit wäre auch für Cytochrom c_1 ein Sortierungsweg wie für Mrs2 denkbar. Anders stellt sich jedoch die Situation im Falle von

Shy1 dar. Dieses Protein verfügt über eine 30 kDa große Intermembranraumdomäne mit einem basischen isoelektrischen Punkt (pI 9,2), flankiert von zwei Transmembrandomänen. Auch hier konnten zwei Importsignale identifiziert werden. Diese ermöglichen unabhängig voneinander die Insertion des Amino- und des Carboxyterminus aus dem Intermembranraum in die Innenmembran (Mashkevich *et al.*, 1997). Aufgrund der „falsch“ gepolten Intermembranraumdomäne erscheint eine konservative Sortierung von Shy1 unter Ausnutzung der elektromotorischen Kraft des Membranpotentials, wie sie für Mrs2 und Yta10 vorgeschlagen wird, zunächst unwahrscheinlich. Shy1 könnte demnach möglicherweise das Endglied in der Kette der Entwicklung eines neuen Sortierungsweges aus dem bereits bestehenden konservativen Sortierungsweg in die Innenmembran darstellen. Der Vergleich mit dem bakteriellen homologen Surf1 aus *Rickettsia conorii* und *Rickettsia prowazekii* zeigt jedoch, dass auch das bakterielle homologe Protein über eine basische periplasmatische Domäne (pI 9,7 bzw. pI 9,5) verfügt und somit gegen das herrschende Membranpotential über die bakterielle Membran transportiert werden muss. Für diese Sortierung müssen somit andere Voraussetzungen gelten als die bisher beschriebenen.

4.2.5 Fazit und Ausblick

Anhand der beschriebenen Beobachtungen können die Proteine der mitochondrialen Innenmembran somit in zwei Klassen eingeteilt werden:

(1) Proteine, die erst nach Beginn der Endosymbiose in das mitochondriale „Proteom“ eingefügt wurden, wie Proteintranslokasen und Metabolitentransporterproteine, die den Austausch mit dem Cytosol ermöglichen. Diese Proteine haben offensichtlich keine bakteriellen Vorgänger, aus denen sie abgeleitet wurden. Für ihren Transport wurde ein eigener Import- und Sortierungsweg entwickelt. Er basiert auf dem Vorhandensein so genannter interner Signale und einer eigens für diese Proteine spezialisierten Translokase, dem TIM22-Komplex. Diese meist sehr hydrophoben, polytopen Membranproteine werden vom Intermembranraum aus in die Innenmembran inseriert.

(2) Gene für Proteine, die ursprünglich bereits in den Vorläufern der heutigen Mitochondrien vorhanden waren, wurden im Laufe der Evolution aus dem mitochondrialen Genom in den Zellkern ausgelagert. Im Zuge dieser Entwicklung erhielten die Proteine eine Präsequenz, die ihren Import in die mitochondriale Matrix ermöglichte. Von dort aus werden sie nach wie vor auf einem ähnlichen Sortierungsweg wie ihre bakteriellen Vorgänger in die Innenmembran inseriert. Unter dieser Annahme kann die erstaunliche Ähnlichkeit der

Biogenese dieser Innenmembranproteine im Vergleich zu der ihrer bakteriellen Homologen leicht erklärt werden. Die im bakteriellen System aufgestellten Gesetzmäßigkeiten und elektrochemischen Überlegungen wie die „Positiv Inside“-Regel und die Translokation geladener Domänen über Membranen mit Hilfe eines elektrophoretischen Effektes lassen sich auch hier anwenden. Dennoch hat bei einer Reihe von Proteinen eine Weiterentwicklung dieses konservativen Sortierungsweges stattgefunden. Die bisher gefundenen Ergebnisse beschränken sich derzeit auf bitope Innenmembranproteine. Vor diesem Hintergrund sollte geklärt werden können, ob die hier beschriebenen Prinzipien sich auch auf polytope Innenmembranproteine mit mehr als zwei Transmembrandomänen erweitern lassen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisation und Funktion des Hsp70-Homologen, Ecm10, zu klären. Ecm10 wurde als drittes Hsp70-Protein neben Ssc1 und Ssq1 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen Ecm10 und Ssc1, woraus eine ähnliche Funktionsweise resultiert. Die teilweise Funktionsüberlappung konnte in *ssc1-3Δecm10*-Zellen durch einen synthetischen Wachstumsphänotyp experimentell nachgewiesen werden. Ecm10, das kein abundantes Protein ist, konnte jedoch selbst nach Überexpression Ssc1 nicht funktionell ersetzen. Da keine endogenen Substrate für Ecm10 bekannt sind, wurde die Funktion von Ecm10 im Vergleich zu Ssc1 *in vitro* analysiert. Ecm10 kann bei Überexpression den Proteinimport in die Matrix auch ohne funktionelles Ssc1 vollständig wiederherstellen. Wie Ssc1 bindet Ecm10 über eine Wechselwirkung mit Tim44 an die zu translozierende Polypeptidkette. Weiterhin verfügt es über eine ATPase-Domäne, deren Aktivität über die Wechselwirkung mit Mge1 reguliert wird. Im Gegensatz zu Ssc1 scheint Ecm10 jedoch nur über eine verminderte Faltungsaktivität zu verfügen, wobei nicht geklärt ist, ob diese durch eine eingeschränkte Wechselwirkung mit dem Cochaperon Mdj1 erklärt werden kann. Welche Rolle die gezeigten Funktionalitäten unter physiologischen Bedingungen für Ecm10 spielen, bleibt weiterhin offen.

Des Weiteren wurde die Sortierung polytooper Membranproteine der mitochondrialen Innenmembran untersucht. Dazu wurde auf zwei bitope Beispielproteine, Mrs2 und Yta10, zurückgegriffen. Beide verfügen über jeweils eine negativ geladene, von zwei Transmembrandomänen eingerahmte Intermembranraumdomäne, die jedoch unterschiedlich groß ist. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine dem konservativen Sortierungsweg folgen, in dessen Verlauf ein lösliches Sortierungsintermediat von der Matrix aus in die Innenmembran inseriert wird. Dabei ist der Insertions- oder Exportschritt aus der Matrix im Vergleich zum Import in die Matrix in höherem Maße abhängig vom Membranpotential über die Innenmembran. In beiden Fällen erfolgte die Sortierung unabhängig von den bisher bekannten Insertionsfaktoren Oxa1 und Mba1, was auf die Existenz weiterer Insertionsfaktoren deuten könnte. Die Untersuchung der Ladungsverteilung innerhalb der Intermembranraumdomänen verschiedenster mitochondrialer Innenmembranproteine ergab eine eindeutige Bevorzugung von sauren Resten, was auf einen allgemeinen Sortierungsweg für solche Proteine hindeutet, die aus bakteriellen Vorläufern abgeleitet wurden.

6 Literatur

- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. und Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J.*, **18**, 313-319.
- Andersson, H. und von Heijne, G. (1994) Membrane protein topology: Effects of $\Delta\mu\text{H}^+$ on the translocation of charged residues explain the "positive inside" rule. *EMBO J.*, **13**, 2267-2272.
- Arkowitz, R.A., Joly, J.C. und Wickner, W. (1993) Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *EMBO J.*, **12**, 243-253.
- Arnold, I., Folsch, H., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998) Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome c1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1469-1476.
- Arretz, M., Schneider, H., Guiard, B., Brunner, M. und Neupert, W. (1994) Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4959-4967.
- Arretz, M., Schneider, H., Wienhues, U. und Neupert, W. (1991) Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed. Biochim. Acta*, **50**, 403-412.
- Ausubel, C.B., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1991) In *Current Protocols in Molecular Biology*. Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G. und Pratje, E. (1994) PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 272-278.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the 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.
- Baxter, B.K. und Craig, E.A. (1998) Suppression of an Hsp70 mutant phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* through loss of function of the chromatin component Sin1p/Spt2p. *J. Bacteriol.*, **180**, 6484-6492.
- Becker, J. und Craig, E.A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 11-23.

- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F. und Di Lisa, M.F. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem.Sci.*, **26**, 112-117.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. und Di Lisa, F. (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 687-701.
- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. und Brunner, M. (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt- Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81**, 1085-1093.
- Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B.S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. und Schatz, G. (1994) A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.*, **13**, 1998-2006.
- 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.
- Branda, S.S., Cavadini P, Adamec J, Kalousek F, Taroni F und G., I. (1999) Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22763-22769.
- Brehmer, D., Rüdiger, S., Gassler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P. und Bukau, B. (2001) Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 427-432.
- 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.
- Brundage, L., Hendrick, J., Schiebel, E., Driessen, A. und Wickner, W. (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SEY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, **62**, 649-657.
- Bui, D., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. und Schweyen, R. (1999) The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20438-20443.

- Burnette, W. (1981) Western blotting electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **121**, 195-203.
- 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**, 1143-1155.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1993) Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* DnaJ: A diverse protein family that functions with HSP70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 555-563.
- Caplan, A.J. und Douglas, M.G. (1991) Characterisation of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J. Cell. Biol.*, **114**, 609-621.
- Chappell, T.G., Konforti, B.B., Schmid, S.L. und Rothman, J.E. (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, 746-751.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.-U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalusek, 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**, 620-625.
- Chirico, W.J., Waters, M.G. und Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**, 805-809.
- Craig, E.A., Gambill, B.D. und Nelson, R.J. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**, 402-414.
- Craig, E.A. und Jacobsen, K. (1985) Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3517-3524.
- Craig, E.A., Kramer, J. und Kusic-Smithers, J. (1987) SSC1, a member of the 70kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4156-4160.
- Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kusic-Smithers, J. und Nicolet, C.M. (1989) SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3000-3008.
- Cyr, D.M., Langer, T. und Douglas, M.G. (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 176-181.
- Dalbey, R.E. (1990) Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 253-257.

- 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.
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, 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., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. und Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett.*, **330**, 66-70.
- Deloche, O., Liberek, K., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1997) Purification and biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* Mdj1p. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28539-28544.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D. und Schekman, R. (1988) The role of stress proteins in membrane biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 384-388.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. und Schekman, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the ER into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, **349**, 806-808.
- Donzeau, M., Káldi, K., Adam, A., Paschen, S.A., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- Dubaquie, Y., Looser, R. und Rospert, S. (1997) Significance of chaperonin 10-mediated inhibition of ATP hydrolysis by chaperonin 60. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9011-9016.
- Eilers, M. und Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature*, **322**, 228-232.
- Ellis, R.J. (1987) Proteins as molecular chaperons. *Nature*, **328**, 378-379.
- Ellis, R.J. und Hemmingsen, S.M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 339-342.
- 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.

- Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W. und Holmes, K.C. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70 kDa heat-shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5041-5045.
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. und Rothman, J.E. (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, **353**, 726-730.
- Folsch, 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.
- Gallusser, A. und Kuhn, A. (1990) Initial steps in protein insertion. Bacetriophage M13 procoat binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.*, **9**, 2723-2729.
- Gambill, B.D., Voos, W., Kang, P.J., Miao, B., Langer, T., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1993) A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J. Cell. Biol.*, **123**, 109-117.
- Gartner, F., Voos, W., Querol, A., Miller, B.R., Craig, E.A., Cumsky, M.G. und Pfanner, N. (1995) Mitochondrial import of subunit Va of cytochrome c oxidase characterized with yeast mutants - Independence from receptors, but requirement for matrix hsp70 translocase function. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3788-3795.
- Gavel, Y., Stepphun, J. und von Heijne, G. (1991) The "positiv inside rule" applies to thylakoid membrane proteins. *FEBS Lett.*, **282**, 41-46.
- Gavel, Y. und von Heijne, G. (1992) The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur. J. Biochem.*, **205**, 1207-1215.
- Geissler, A., Krimmer, T., Schonfisch, B., Meijer, M. und Rassow, J. (2000) Biogenesis of the yeast frataxin homolog Yfh1p. Tim44-dependent transfer to mtHsp70 facilitates folding of newly imported proteins in mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3167-3180.
- 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.
- Glick, B.S. (1991) Protein import into isolated yeast mitochondria. *Methods Cell. Biol.*, **34**, 389-399.

- Glick, B.S. (1995) Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Pt A*.
- Glick, B.S., Beasley, E.M. und Schatz, G. (1992a) Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 453-459.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R.L. und Schatz, G. (1992b) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69**, 809-822.
- Gray, M.W., Burger, G. und F., L.B. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Guthrie, C. und Fink, G.R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Meth. Enzym.*, **194**.
- Harrison, C.J., M., H.-H., Di Liberto, M., Hartl, F.-U. und Kuriyan, J. (1997) Crystal Structure of the Nucleotide Exchange Factor GrpE Bound to the ATPase Domain of the Molecular Chaperon DnaK. *Science*, **276**, 431-435.
- Hartl, F.U. (1995) Principles of chaperone-mediated protein folding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **348**, 107-112.
- Hartl, F.U., Hlodan, R. und Langer, T. (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 20-25.
- Hartl, F.U., Martin, J. und Neupert, W. (1992) Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 293-322.
- 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.
- Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. und Neupert, W. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, **47**, 939-951.
- Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. und Neupert, W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, **53**, 795-806.

- He, S. und Fox, T. (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.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. und R.A., S. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.*, **418**, 367-370.
- 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.
- Henikoff, S. und Cohen, E.H. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted brakpoints for DNA sequencing. *Gene*, **28**, 351-359.
- Herrmann, J.M., Folsch, H., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1994a) Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. *Cell Biology A Laboratory Handbook*, **1**.
- Herrmann, J.M., Koll, H., Cook, R.A., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1995) Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27079-27086.
- 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.
- Herrmann, J.M., Stuart, R.A., Craig, E.A. und Neupert, W. (1994b) Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Cell. Biol.*, **127**, 893-902.
- Herrmann, R.G. (1997) Eukaryotism, toward a new interpretation. In Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W. (eds.), *Eukariotism and Symbiosis*. Springer, Heidelberg, New York, pp. 73-118.
- Hill, R.B., Flanagan, J.M. und Prestegard, J.H. (1995) ¹H and ¹⁵N magnetic resonance assignments, secondary structure and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ(1-78). *Biochemistry*, **34**, 5587-5596.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brütsch, H. und Schatz, G. (1990) Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J.*, **9**, 3191-3200.

- Hiser, L., Di Valentin, M., Hamer, A.G. und Hosler, J.P. (2000) Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 619-623.
- Hoehfeld, J. und Hartl, F.U. (1994) Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.*, **126**, 305-315.
- Horst, M., Hilfikerrothenfluh, S., Oppliger, W. und Schatz, G. (1995) Dynamic interaction of the protein translocation systems in the inner and outer membranes of yeast mitochondria. *EMBO J.*, **14**, 2293-2297.
- Huxley, C., Green, E.D. und Dunham, I. (1990) Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.*, **6**, 236.
- Ikeda, E., Yoshida, S., Mitsuzawa, H., Uno, I. und Tho-E, A. (1994) YGE1 is a yeast homologue of *Escherichia coli* grpE and is required for maintenance of mitochondrial functions. *FEBS Lett.*, **339**, 265-268.
- Johnson, A.E. (1997) Protein translocation at ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends Cell Biol.*, **7**, 90-95.
- Johnson, R.B., Fearon, K., Mason, T.O. und Jindal, S. (1989) Cloning and characterization of the yeast chaperonin Hsp60 gene. *Gene*, **84**, 295-302.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.
- Kaput, J., Goltz, S. und Blobel, G. (1982) Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the presequence for protein transport into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257**, 15054-15058.
- 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.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990) Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, **348**, 610-616.
- Klöggen, R.B. (1997) Protein transport into and across the thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **38**, 1-9.
- Knight, S.A., Sepuri, N.B., Pain, D. und Dancis, A. (1998) Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18389-18393.

- Knudsen, K.A. (1985) Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.*, **147**, 285-288.
- Koehler, C.M. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und Tokatlidis, K. (1998) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.*, **17**, 6477-6486.
- Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. und Hartl, F.U. (1992) Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, **68**, 1163-1175.
- Kronidou, N.G., Opplinger, W., Bollinger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. und Horst, M. (1994) Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12818-12822.
- Kyhse-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.
- Laloraya, S., Gambill, B.D. und Craig, E.A. (1994) A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6481-6485.
- Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R. und Gierasch, L.M. (1992) Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature*, **355**, 455-457.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer-Hartl, M.K. und Hartl, F.U. (1992) Successive action of DnaK (Hsp70), DnaJ and GroEL (Hsp60) along the pathway of chaperone-assisted protein folding. *Nature*, **356**, 683-689.
- Larsson, N.G. und Luft, R. (1999) Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett.*, **455**, 199-202.
- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1999) The DNA Helicase, Hmi1p, Is Transported into Mitochondria by a C-terminal Cleavable Targeting Signal. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20937-20942.

- Leonhardt, S.A., Fearon, K., Danese, P.N. und Mason, T.L. (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6304-6313.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2874-2878.
- Lübeck, J., Heins, L. und Soll, J. (1997) Protein import into chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, **100**, 53-64.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., diPaolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., ChenWeiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W. und Bussey, H. (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 435-450.
- Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2001) The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J. Mol. Biol.*, **307**, 815-825.
- Martin, J., Mahlke, K. und Pfanner, N. (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18051-18057.
- Mashkevich, G., Repetto, B., Glerum, D.M., Jin, C. und Tzagoloff, A. (1997) SHY1, the Yeast Homolog of the Mammalian SURF-1 Gene, Encodes a Mitochondrial Protein Required for Respiration. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14356-14364.
- Masson, J.Y. und Ramotar, D. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* IMP2 gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2091-2100.
- Matouschek, A., Azem, A., Ratliff, K., Glick, B.S., Schmid, K. und Schatz, G. (1997) Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein. *EMBO J.*, **16**, 6727-6736.
- 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.
- McKee, E.E. und Poyton, R.O. (1984) Mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9320-9331.

- McMullin, T.W. und Hallberg, R.L. (1988) A highly evolutionary conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* groEL gene. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 371-380.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984) Efficient *in vitro* synthesis of biologically active mRNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *NAR*, **12**, 7035-7056.
- Merrifield, R. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.
- Miao, B., Davis, J.E. und Craig, E.A. (1997) Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, **265**, 541-552.
- 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.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. und Brunner, M. (1999) The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J.*, **18**, 3667-3675.
- Morshauer, R.C., Wang, H., Flynn, G.C. und Zuiderweg, E.R.P. (1995) The peptidebinding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry*, **34**, 6261-6266.
- Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T. (1990) A maturase-like subunit of the sequence-specific endonuclease Endo.SecI from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1977-1984.
- Nakagawa, K., Morishima, N. und Shibata, T. (1992) An endonuclease with multiple cuttingsites, Endo.SecI initiates genetic recomonation at its cutting site in yeast mitochondria. *EMBO J.*, **11**, 2707-2715.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. und Craig, E.A. (1992) The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, **71**, 97-105.
- Neupert, W. (1997) Protein Import into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 863-917.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. und Hartl, F.U. (1989) Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp 60 and ATP hydrolysis. *Nature*, **341**, 125-130.

- Pajic, A., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. und Langer, T. (1994) Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett.*, **353**, 201-206.
- Paschen, S.A. und Neupert, W. (2001) Protein Import Into Mitochondria. *IUBMB*, **52**, 101-112.
- Pelham, H.R.B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, **46**, 959-961.
- 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 Meijer, M. (1995) Protein sorting: Pulling in the proteins. *Curr Biol*, **5**, 132-135.
- 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.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R.A., Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **153**, 1085-1096.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. und Kutay, U. (1996) Protein import across the eucaryotic endoplasmic reticulum and bacterial membranes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 271-303.
- Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.*, **275**, 190-194.
- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell Biol.*, **127**, 1547-1556.
- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I.B., Pfanner, N. und Tropschug, M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2654-2662.
- Reading, D.S., Hallberg, R.L. und Myers, A.M. (1989) Characterisation of the yeast hsp60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature*, **337**, 655-659.
- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998) Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8040-8047.

- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1999) N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19617-19622.
- Rojo, E.E., Stuart, R.A. und Neupert, W. (1995) Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J.*, **14**, 3445-3451.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990) Methods in Yeast Genetics. In Press, C.S.H.L. (ed.). Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- Rospert, S., Glick, B.S., Jenö, P., Schatz, G., Todd, M.J., Lorimer, G.H. und Viitanen, P.V. (1993a) Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10967-10971.
- Rospert, S., Junne, T., Glick, B.S. und Schatz, G. (1993b) Cloning and disruption of the gene encoding yeast mitochondrial chaperonin 10, the homolog of *E. coli* GroES. *FEBS Lett.*, **335**, 358-360.
- Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B.S. und Schatz, G. (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J.*, **15**, 764-774.
- Rothstein, R.J. und Sherman, T. (1980) Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics*, **94**, 871-889.
- Rowley, N., Prip, B.C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. und Neupert, W. (1994a) Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, **77**, 249-259.
- Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. und Neupert, W. (1994b) Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, **77**, 249-259.
- Ryan, M.T., Müller, H. und Pfanner, N. (1999) Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20619-20627.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Scharf, S.J., Hifuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, J.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saint-Georges, Y., Hamel, P., Lemaire, C. und Dujardin, G. (2001) Role of positively charged transmembrane segments in the insertion and assembly of mitochondrial inner-membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13814-13819.

- Samuelson, J.C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J.W., Kuhn, A. und Dalbey, R.E. (2001) Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34847-34852.
- Sanyal, A. und Getz, G. (1995) Import of transcription factor MTF1 into the yeast mitochondria takes place through an unusual pathway. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11970-11976.
- Schlenstedt, G., Zimmermann, M. und Zimmermann, R. (1994) A stably folded presecretory protein associates with and upon unfolding translocates across the membrane of mammalian microsomes. *FEBS Lett.*, **340**, 139-144.
- Schleyer, M., Schmidt, B. und Neupert, W. (1982) Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **125**, 109-116.
- 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.
- Schmidt, S., Strub, A., Rottgers, K., Zufall, N. und Voos, W. (2001) The two mitochondrial heat shock proteins 70, Ssc1 and Ssq1, compete for the cochaperone Mge1. *J. Mol. Biol.*, **313**, 13-26.
- Schmitt, M., Neupert, W. und Langer, T. (1995) Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.*, **14**, 3434-3444.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. und Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Schneider, H.C., Westermann, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1996) The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *EMBO J.*, **15**, 5796-5803.
- Schönfeld, H.-J., Schmidt, D., Schröder, H. und Bukau, B. (1995) The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quarternary structures and interactions of DnaK and GrpE components. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2183-2189.
- Schuenemann, T.A., Delgado-Nixon, V.M. und Dalbey, R.E. (1999) Direct evidence that the proton motive force inhibits membrane translocation of positively charged residues within membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6855-6864.

- Segui-Real, B., Kispal, G., Lill, R. und Neupert, W. (1993) Functional independence of the protein translocation machineries in mitochondrial outer and inner membranes: passage of preproteins through the intermembrane space. *EMBO J.*, **12**, 2211-2218.
- Shore, G.C., McBride, H.M., Millar, D.G., Steenaart, N. und Nguyen, M. (1995) Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem.*, **227**, 9-18.
- Sikorski, R.S. und Boeke, J.D. (1991) *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 302-318.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast 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., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. und Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.
- Smith, V., Chou, K.N., Lashkari, D., Botstein, D. und Brown, P.O. (1996) Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science*, **274**, 2069-2074.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ATP/ADP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, D.T., Vickery, L.E. und Culotta, V.C. (1998) Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31138-31144.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.-U. und Flanagan, J. (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.*, **15**, 408-417.
- Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wuthrich, K. (1994) NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11343-11347.

- Tauer, R., Mannhaupt, G., Schnall, R., Pajic, A., Langer, T. und Feldmann, H. (1994) Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function. *FEBS Lett.*, **353**, 197-200.
- Tokatlidis, K. und Schatz, G. (1999) Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35285-35288.
- 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.
- Tzagoloff, A., Capitanio, N., Nobrega, M.P. und Gatti, D. (1990) Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by ORF3. *EMBO J*, **9**, 2759-2764.
- Ungermann, C., Neupert, W. und Cyr, D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.
- Vacherau, A. (1989) Luminiscent immunodetection of wester-blotted proteins from Coomassie-stained polyacrylamid gel. *Anal. Biochem.*, **179**, 206-208.
- Vambutas, A., Ackerman, S.H. und Tzagoloff, A. (1991) Mitochondrial translation-initiation and elongation factors in *Saccharmyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 643-652.
- van Loon, A. und Schatz, G. (1987) Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO*, **6**, 2441-2448.
- Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J. und Craig, E.A. (2000) Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3677-3684.
- von Heijne, G. (1986a) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the transmembrane topology. *EMBO J.*, **5**, 3021-3027.
- von Heijne, G. (1986b) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.*, **5**, 1335-1342.
- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structur prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rul. *J. Mol. Biol.*, **225**, 487-494.
- Voos, W., Gambill, B.D., Laloraya, S., Ang, D., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1994) Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6627-6634.

- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. und Pfanner, N. (1999) Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1422**, 235-254.
- Wachter, C., Schatz, G. und Glick, B.S. (1992) Role of ATP in the intramitochondrial sorting of cytochrome c1 and the adenine nucleotide translocator. *EMBO J.*, **11**, 4787-4794.
- Waegemann, K. und Soll, J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.*, **1**, 149-156.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. und Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.*, **13**, 5135-5145.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wallin, E. und von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7**, 1029-1038.
- Westermann, B., Gaume, B., Herrmann, J.M., Neupert, W. und Schwarz, E. (1996) Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7063-7071.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W. und Schwarz, E. (1995) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J.*, **14**, 3452-3460.
- Whatley, F.R. (1981) The establishment of mitochondria: *Paracoccus* and *Rhodospseudomonas*. *Ann. NY Acad.Sci.*, **361**, 330-340.
- Wickner, W., Driessen, A.J.W. und Hartl, F.-U. (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**, 101-124.
- Wickner, W. und Leonard, M.R. (1996) *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29514-29516.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H. und Davis, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Woolhead, C.A., Thompson, S.J., Moore, M., Tissier, C., Mant, A., Rodger, A., Henry, R. und Robinson, C. (2001) Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40841-40846.

- Xu, Z., Horwich, A.L. und Sigler, P.B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, **388**, 741-750.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E. und Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, **272**, 1606-1614.
- Zylicz, M., Ang, D. und Georgopoulos, C. (1987) The GrpE protein of *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17437-17442.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Cruciat, C.-M., Brunner, S., **Baumann, F.**, Neupert, W. und Stuart, R.A. (2000) The Cytochrome bc₁ and Cytochrome c Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18093–18098.

Baumann, F., Milisav, I., Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2000) Ecm10, a novel hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **487**, 307-312.

Baumann, F., Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2002) Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21405-21413.

Danksagung:

Zu aller erst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die herausfordernden Aufgaben und die hervorragenden Möglichkeiten an seinem Institut, wissenschaftliches Denken und Arbeiten zu erlernen. Hervorheben möchte ich seine Bemühungen, uns Doktoranden mit seinen ihm eignen Mitteln weiterzubilden und zu fördern. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Horst Domdey bedanken, der auf so unkomplizierte und engagierte Art meine Arbeit gegenüber der Fakultät für Chemie vertreten hat.

Herrn Dr. Hannes Herrmann danke ich sehr herzlich für die erstklassige Anleitung und Unterstützung meiner Forschung und darüber hinaus für die zupackende und produktive Zusammenarbeit. Sein Interesse, seine Ideen und seine Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen und mir gezeigt, dass es immer wieder einen weiterführenden Weg gibt.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Rosemary Stuart, die mich zunächst im Anschluss an meine Diplomarbeit betreut hat.

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. Markus Dembowski, der manches Mal mir aufmunternd zur Seite stand und mit dem ich viele Wochenenden produktiv und freundschaftlich im Labor verbrachte. Außerdem bedanke ich mich bei Silvia Hiesel, die mir kurzzeitig überaus geschickt und tatkräftig zur Seite stand.

Bei Dejana Mokranjac möchte ich mich für ihren aufmunternden Humor bedanken, der alles immer wieder auf das eigentlich Wesentliche reduzieren kann. Dank auch an meine vielen Laborkollegen allen voran die „Herrmanns“: Tom Lutz, Stefan Meier, Marc Preuß, Gregor Szyrach, sowie Florian Fuchs, Marlies Messerschmitt, Kai Dimmer, Stefan Fritz, Simone Schmitt, Uwe Ahting, Stefan Paschen. Ohne sie hätte mir so mancher Spaß gefehlt.

Ein herzliches Dankeschön auch an die technischen Assistentinnen der verschiedenen Gruppen, Sandra Esser, Steffi Neubauer, Petra Heckmeyer, Petra Robisch und Ute Staudinger, die mir immer mal schnell mit einem Stamm, einem Puffer oder was ich sonst grade dringend benötigt habe bereitwillig ausgeholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich für so manchen fachlichen Rat bedanken bei Dr. Kai Hell, Dr. Doron Rapaport, Dr. Andreas Reichert, Dr. Benedikt Westermann, sowie den ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Prof. Dr. Michael Brunner und Prof. Dr. Thomas Langer.

Ein herzlicher Dank auch an Frau Döge und Frau Farsen, für ihren unermüdlichen Einsatz, meinen Papierkram und meine Finanzen in Ordnung zu halten, sowie an Ruth Neumayer,

Kathrin Flach, Eva Frischbier und ihre Hasen, die wichtige Antikörper produziert haben und nicht zuletzt an Kirsten Heiss, für die Unterstützung bei jedweden Computerproblemen. Den Mitarbeitern der Werkstatt, ohne die bald nichts mehr funktioniert hätte, und der Spülküche sowie allen anderen ein Dankeschön für ihre Hilfe.

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, mich ganz herzlich bei denjenigen Menschen zu bedanken, die mich außerhalb des Institutes unterstützt haben, die mithalfen, - wo und wie immer nur denkbar - und so dazu beitrugen, auch die graueren Stunden zu meistern.

Frank Baumann

- 20.01.1972:** geboren in München als Sohn des Hochschullehrers Prof. Dr. med. Günter Baumann und seiner Ehefrau Dr. med. Ilsebeth Baumann geborene Pammel
- 1978-1982:** Besuch der Grundschule an der Fasanenstraße in Unterhaching
- 1982:** Übertritt in das Rupprecht-Gymnasium München
- 1982-1991:** Besuch des Rupprecht-Gymnasiums München
- 1991:** Abitur
Erfolgreiches Ablegen der Prüfung für das Stipendium für besonders Begabte des Bayerischen Staates
- 01.08.1991-**
- 30.09.1991:** Praktikum am Institut für Physiologische Chemie der LMU-München
- 02.11.1991:** Immatrikulation für das Studienfach Chemie-Diplom an der LMU-München
- 17.02.1994:** Diplom-Vorprüfung im Studienfach Chemie an der LMU-München
- 02.05.1994:** Beginn des Hauptstudiums unter Belegung des Wahlpflichtfaches Biochemie
- 18.09.1995-**
- 20.10.1995:** Martinsrieder-Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
- 18.07.1996:** Diplom-Hauptprüfung im Studienfach Chemie an der LMU-München
- 15.09.1996-**
- 15.03.1996:** Diplomarbeit im Studienfach Chemie am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Neupert mit dem Titel: „Untersuchungen zu Sortierungsmechanismen von Vorstufenproteinen der mitochondrialen Innenmembran“
- 01.07.1997:** Beginn der Promotion am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Neupert