

**Molekulare Ursachen des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms:
Untersuchungen zur Struktur und Funktion von
DDP1 und Tim13**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrich Rothbauer

München 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Schartau

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Abgabe der Dissertation: 14. Oktober 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2003

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

Paschen, S.A., Rothbauer U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W., and Brunner, M. (2000). The role of the TIM8-13 complex in the import of the Tim23 into mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 6392 - 6400

Rothbauer, U., Hofmann S., Mühlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2001). Role of the Deafness Dystonia Peptide 1 (DDP1) in Import of Human Tim23 into the Inner Membrane of Mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **276**, 37327 - 37334

Hofmann S., Rothbauer, U., Mühlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K.D., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2002). The C66W Mutation in the Deafness Dystonia Peptide 1 (DDP1) Affects the Formation of Functional DDP1·Tim13 Complexes in the Mitochondrial Intermembrane Space. *J.Biol.Chem.*, **277**, 23287 - 23293

Abkürzungen

aa	Aminosäure
A	Ampere
AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a.u.	arbitrary units
bp	Basenpaare
dd	doppelt destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cyt c	Cytochrom c
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tags
g	Erdbeschleunigung
GIP	Generelle Insertionspore
h	Stunde
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
ICP	induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani (<i>E. coli</i> -Nährlösung)
Lac α	α Untereinheit der β -Galaktosidase
min	Minute
MBS	m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester
MBP	Maltosebindungsprotein
MCF	Mitochondriale Carrier-Familie
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
MRS	mitochondrial RNA splicing
MSF	mitochondrial import stimulation factor
mt	mitochondrial
MTS	Mohr-Tranebjaerg-Syndrom
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid
<i>N.crassa (N.c.)</i>	<i>Neurospora crassa</i>

NEM	N-Ethylmaleimid
nm	Nanometer
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran (outer membrane)
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
o-Phe	ortho-Phenanthrolin
ORF	open reading frame
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBF	presequence binding factor
PBS	Phosphate buffered saline
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PiC	Phosphat-Carrier
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNasin	Ribonuclease-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
<i>S.cerevisiae</i> (<i>S.c.</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tim	Protein der Translokationsmaschinerie der Innenmembran
TIM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TM	Transmembrandomäne
Tom	Protein der Translokationsmaschinerie der Außenmembran
TOM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
U	enzymatische Einheit (Unit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Val	Valinomycin
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
$\Delta 8$	Deletion von <i>TIM8</i>
$\Delta 13$	Deletion von <i>TIM13</i>
$\Delta\psi$	Membranpotential

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Struktur und Funktion von Mitochondrien	1
1.2. Mitochondriale Erkrankungen	3
1.2.1. OXPHOS-Erkrankungen	3
1.2.2. Nicht-OXPHOS-Krankheiten	4
1.2.2.1. Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom	5
1.2.2.2. Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom ist eine mitochondriale Erkrankung	6
1.3. Grundlagen des Proteinimports in Mitochondrien	7
1.3.1. Zielführung mitochondrialer Präproteine an Mitochondrien	8
1.3.2. Mitochondriale Importsignale	8
1.3.3. Die Translokation über die mitochondriale Außenmembran	9
1.3.4. Der Import über die mitochondriale Innenmembran	10
1.3.4.1. Die TIM23-Translokase	10
1.3.4.2. Die TIM22-Translokase	12
1.3.4.3. Die kleinen Tim-Proteine	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1. Verwendete Plasmide	17
2.1.2. Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.1.3. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	18
2.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	19
2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	19
2.1.6. Restriktionsverdau von DNA	19
2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten	19
2.1.8. Sequenzspezifische Mutagenese mit PCR-vermittelter Rekombinationstechnik	19
2.1.9. Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	20
2.1.10. Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.1.11. Klonierungsstrategien	21
2.2. Proteinbiochemische Methoden	23
2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.2.3. Blaue Nativgelelektrophorese	24
2.2.4. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau	25
2.2.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)	25

2.2.6. Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie/Densitometrie und durch Phosphorimaging	25
2.2.7. <i>In vitro</i> Synthese von mitochondrialen Vorstufenproteinen	25
2.2.8. Reinigung rekombinant exprimierter Proteine aus <i>E.coli</i>	26
2.2.9. Nachweis der Interaktion rekombinant in <i>E.coli</i> exprimierter Proteine in zwei aufeinanderfolgenden Anreicherungsschritten	27
2.2.10. Bestimmung des Zinkgehalts rekombinant gereinigter Proteine	28
2.2.11. TCA-Fällung von Proteinen	28
2.2.12. Bestimmung der molekularen Masse von Proteinkomplexen durch Gelfiltration	29
2.3. Immunologische Methoden	29
2.3.1. Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	29
2.3.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	30
2.3.3. Immunpräzipitation	31
2.4. Zellbiologische Methoden	32
2.4.1. Isolierung von Mitochondrien aus <i>S.cerevisiae</i>	32
2.4.2. Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe bzw. menschlichen Zellen	33
2.4.3. Subfraktionierung von Säugerzellen	34
2.4.4. Import <i>in vitro</i> synthetisierter Vorstufenproteine in isolierte Mitochondrien	34
2.4.5. Proteasebehandlung von Mitochondrien unter isotonischen/hypotonischen Bedingungen	34
2.4.6. Chemische Quervernetzung von mitochondrialen Proteinen	35
2.5. Methoden der Hefegenetik	36
2.5.1. Verwendete Hefestämme	36
2.5.2. Kultivierung von <i>S.cerevisiae</i>	36
2.5.3. Bestimmung des Wachstumsphänotyps von <i>S.cerevisiae</i> ("Tüpfeltest")	37
2.5.4. Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	38
2.6. Chemikalien und Geräte	38
2.6.1. Chemikalien und Enzyme	38
2.6.2. Laborgeräte und sonstige Materialien	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1. DDP1 ist Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie	40
3.2. DDP1 und Tim13 sind lösliche Proteine im mitochondrialen Intermembranraum des Menschen	42
3.3. Strukturelle Organisation von DDP1 und Tim13 im mitochondrialen Intermembranraum von Säugerzellen	45
3.3.1. DDP1 und Tim13 assemblieren zu höhermolekularen Komplexen	45
3.3.2. DDP1 und Tim13 interagieren im Intermembranraum menschlicher Mitochondrien	47
3.3.3. DDP1 und Tim13 besitzen unterschiedliche Resistenzen gegen proteolytischen Abbau	49
3.4. Rekonstitution des menschlichen DDP1/Tim13-Komplexes in Hefe	50

3.4.1. DDP1 und Tim13 assemblieren in Mitochondrien der Hefe zu einem hetero-hexameren Komplex	51
3.4.2. DDP1 und Tim13 sind Orthologe der Hefepoteine yTim8 und yTim13	53
3.5. Molekulare Funktion des humanen DDP1/Tim13-Komplex	54
3.5.1. Der menschliche DDP1/Tim13-Komplex komplementiert den Importdefekt der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Deletionsmutante	54
3.5.2. Energetische Anforderungen des Imports der humanen Tim23-Vorstufenproteine	56
3.5.3. In Säugermitchondrien interagiert der menschliche DDP1/Tim13-Komplex mit dem Translokationsintermediat des humanen Tim23-Vorstufenproteins	58
3.6. DDP1 und Tim13 sind Zink-bindende Proteine	60
3.7. Strukturelle und funktionelle Konsequenzen einer Krankheits-assoziierten <i>missense</i> Mutation im Cys ₄ -Motiv von DDP1	63
3.7.1. Der Cystein → Tryptophan Austausch im Cys ₄ -Motiv des DDP1-Proteins verhindert die Komplexierung von Zink-Ionen	63
3.7.2. Das DDP1 ^{C66W} -Protein komplementiert nicht die Funktion des yTim8-Proteins	65
3.7.3. Der transgene $\Delta 8/\Delta 13 + DDP1^{C66W}/Tim13$ -Hefestamm besitzt einen Importdefekt	66
3.7.4. Untersuchungen zur Biogenese und Stabilität des DDP1 ^{C66W} -Proteins in Mitochondrien	67
3.7.4.1. DDP1 ^{C66W} wird in reduzierten Mengen in $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien exprimiert	67
3.7.4.2. Der mitochondriale Import von DDP1 ^{C66W} ist nicht beeinträchtigt	68
3.7.4.3. Das DDP1 ^{C66W} -Protein unterliegt in Mitochondrien einer bevorzugten proteolytischen Degradation	69
3.7.5. Die C66W-Mutation verhindert die Interaktion von DDP1 ^{C66W} mit Tim13	70
4. DISKUSSION	74
4.1. Evolutionäre Konservierung der menschlichen kleinen Tim-Proteine	74
4.2. Struktur und Funktion von DDP1 und Tim13	77
4.2.1. DDP1 und Tim13 assemblieren im Intermembranraum zu einem hetero-hexameren Komplex	77
4.2.2. DDP1 und Tim13 sind Zink-bindende Proteine	78
4.2.3. Funktion des menschlichen DDP1/Tim13-Komplexes	80
4.2.3.1. DDP1 und Tim13 sind funktionelle Orthologe von yTim8 und yTim13	80
4.2.3.2. DDP1 und Tim13 assistieren beim Import von Tim23	81
4.2.3.3. Implikationen für die Pathogenese des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms	83
4.3. Auswirkungen einer C66W-Mutation im konservierten Cys ₄ -Motiv von DDP1	85
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
6. LITERATURVERZEICHNIS	90

1. EINLEITUNG

1.1. Struktur und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen von eukaryontischen Zellen. Es wird allgemein angenommen, dass sich Mitochondrien aus einem symbiontischen Zusammenschluss einer eukaryontischen Vorstufenzelle und einem aeroben α -Proteobakterium entwickelt haben (Margulis, 1981). Ihr Erscheinungsbild ist geprägt von einer Doppelmembran, die vier Reaktionsräume definiert: zwei hochspezialisierte Membransysteme, die äußere und die innere Membran, sowie zwei wässrige Kompartimente, den Intermembranraum und die Matrix. Die Außenmembran (AM) ist eine typische Lipiddoppelmembran und umschließt das gesamte Mitochondrium. Die Innenmembran (IM) ist geprägt von zahlreichen und tiefen Einstülpungen in das Innere der Mitochondrien, den sogenannten Cristae. Bei den wässrigen Reaktionsräumen handelt es sich um den zwischen den Membranen liegenden Intermembranraum (IMR) und die von der Innenmembran umschlossene mitochondriale Matrix (M).

Eine der Hauptaufgaben der Mitochondrien ist die Generierung und Freisetzung von ATP und damit die Bereitstellung chemischer Energie für alle endergonen Stoffwechselprozesse.

Im Zuge des Abbaus von Nahrungssubstraten werden die Reduktionsäquivalente, NADH/H^+ und FADH_2 , gebildet. Die bei deren Oxidation freigesetzten energiereichen Elektronen werden in einer Art Kaskade entlang der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen. Gleichzeitig werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transloziert. Der dadurch entstehende Protonengradient liefert die Energie zur ATP-Herstellung aus ADP und anorganischem Phosphat.

Die Atmungskette besteht aus vier hochmolekularen Proteinkomplexen (Komplex I bis IV), die in der Innenmembran lokalisiert sind. Die F_0F_1 -ATPase (Komplex V) vermittelt die Umwandlung der Energie des Protonengradienten in chemische Energie in Form von ATP. Der gesamte Prozess der Oxidation von Reduktionsäquivalenten durch Sauerstoff entlang der Atmungskette und die Nutzung der Energie zur Synthese von ATP wird unter dem Begriff oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zusammengefasst.

Neben der Bereitstellung von chemischer Energie findet in Mitochondrien eine Reihe weiterer essentieller Stoffwechselprozesse der Zelle statt: Dazu gehören unter anderem der Harnstoffzyklus, die Häm-Biosynthese, die Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S)-Bildung, sowie der Metabolismus verschiedener Aminosäuren, Pyrimidine und Nukleotide.

Unter den Organellen der Zelle besitzen Mitochondrien eine genetische Besonderheit. Zu ihrer Biogenese tragen neben kernkodierten auch mitochondrial kodierte Gene bei. Wie ihre prokaryontischen Vorläuferorganismen besitzen Mitochondrien eine eigene DNA, die mtDNA, und einen semi-autonomen Apparat zu deren Replikation, Transkription und Translation. Bei der mtDNA handelt es sich um ein doppelsträngiges zirkuläres DNA-Molekül, das in mehrfacher Kopienanzahl in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die geringe Größe der mtDNA (beim Menschen 16 569 bp) deutet daraufhin, dass ein Großteil der Gene, die für die Struktur und Funktion von Mitochondrien notwendig sind, im Laufe der Evolution ins Kern-Genom verlagert wurden. Die überwiegende Mehrheit der mitochondrialen Proteine wird daher im Zellkern kodiert und im Anschluss an ihre Synthese im Zytosol in Mitochondrien importiert. Mitochondrien menschlicher Zellen enthalten vermutlich etwa 2000 verschiedene Proteine. Davon enthält die mtDNA die Information von nur zwei Untereinheiten des ATPase-Komplexes, sowie für 11 Untereinheiten verschiedener Atmungskettenkomplexe. Weiterhin kodiert die mtDNA 22 tRNA-Spezies und die ribosomalen 12S und 16S RNAs (Attardi et al., 1982).

Mitochondrien entstehen in der Zelle nicht "*de novo*" sondern vermehren sich durch Wachstum und Teilung vorhandener Organellen (Übersichtsartikel: Yaffe, 1999). Nukleär kodierte Proteinkomponenten müssen daher importiert und in bereits bestehende Strukturen eingefügt werden. Zur Entstehung funktioneller Atmungskettenkomplexe müssen dabei sowohl mitochondrial kodierte Proteine als auch im Kern kodierte Proteine in koordinierter Weise in die mitochondriale Innenmembran inserieren und die Untereinheiten zu oligomeren Komplexen assemblieren.

1.2. Mitochondriale Erkrankungen

1.2.1. OXPHOS-Erkrankungen

Funktionsausfälle von Mitochondrien führen zu Erkrankungen. Mitochondriale Erkrankungen sind ursprünglich definiert als Defekte der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS-Erkrankungen). Die duale genetische Kontrolle der Atmungskettenkomplexe impliziert, dass sowohl mitochondriale als auch nukleäre Defekte zur Entstehung von mitochondrialen Erkrankungen beitragen können. Die Dysfunktionen des mitochondrialen OXPHOS-Systems betreffen in erster Linie Organsysteme mit hohem Energiebedarf, insbesondere Herz, Muskel und das zentrale Nervensystem. Mitochondriale Erkrankungen zeigen ein breites Spektrum an klinischen Symptomen wie z.B. Kardiomyopathien, Myopathien, Paraplegien, Enzephalopathien, Diabetes Mellitus, Ophthalmoplegie, allgemeine psychomotorische Entwicklungsstörungen, Taubheit und Blindheit. Die phänotypische Variabilität ist dabei äußerst hoch: sie reicht von milden, spät einsetzenden, organspezifischen Erkrankungen bis hin zu schweren, letalen Systemerkrankungen des Kleinkindes. Daneben werden mitochondriale Dysfunktionen auch mit der Entstehung von degenerativen Erkrankungen, dem Altern und Krebs in Verbindung gebracht. Bis vor kurzem waren fast ausschließlich Mutationen der mitochondrialen DNA als genetische Ursache von OXPHOS-Erkrankungen bekannt (Übersichtsartikel: Wallace, 1999.) Die zunehmende Charakterisierung von Krankheitsbildern mit Ähnlichkeit zu typischen mitochondrialen Erkrankungen lässt jedoch vermuten, dass die überwiegende Mehrzahl von Atmungsketten-Erkrankungen nukleär bedingt sind. Bisher fand man aber nur in sehr wenigen Fällen genetische Defekte in den kernkodierten Untereinheiten der Atmungskomplexe selbst (Hofmann, 2003). Es liegt nahe, zu vermuten, dass die genetischen Ursachen von OXPHOS-Erkrankungen vielmehr in Faktoren liegen, die an der Biosynthese, Assemblierung und Stabilität insbesondere der Atmungskettenkomplexe beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch die zunehmende Identifikation von Mutationen in kernkodierten Komponenten unterstützt, die eine indirekte Funktion bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe übernehmen; so z.B. das BCS1L-Gen (Assemblierung von Komplex III) (de Lonlay et al., 2001), das SURF1-Gen (Assemblierung und Stabilität von Komplex IV) (Zhu et al., 1998) oder das SCO1- bzw. SCO2-Gen (mitochondriales Kupfer-Chaperon, beteiligt an Assemblierung von Komplex IV) (Horvath et al., 2000).

1.2.2. Nicht-OXPHOS-Krankheiten

Zum Verlust der mitochondrialen Funktion können auch eine Vielzahl von Gendefekten führen, die nicht direkt die Komponenten des OXPHOS-Systems betreffen. Pathologische Mutationen in nukleär kodierten Faktoren könnten zum Beispiel die mitochondriale Teilung und Vermehrung oder das Transkriptions/Translations-System der Mitochondrien betreffen. Auch der Prozess der mitochondrialen Biogenese und Stabilität wird durch nukleär kodierte Komponenten kontrolliert, deren Ausfall zum Funktionsverlust und damit zu einer mitochondrialen Erkrankung führen könnte.

In den letzten Jahren ist eine Reihe von genetischen Defekten aufgedeckt worden, die zu mitochondrialen Störungen führen, aber nicht unmittelbar die oxidative Phosphorylierung beeinflussen. Ein Beispiel einer solchen Erkrankung ist die Friedreich-Ataxie (FRDA) (OMIM 229300). Das vom FRDA-Gen kodierte Protein Frataxin ist vermutlich am mitochondrialen Eisenstoffwechsel beteiligt (Campuzano, 1996). Der Ausfall des Proteins führt zur vermehrten Sauerstoffradikal-Bildung und damit zur Schädigung der mitochondrialen DNA. Des Weiteren ist die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Gruppen enthaltenden Proteinen gestört (Wallace, 2001). Ein weiteres Beispiel einer Nicht-OXPHOS-Erkrankung ist eine dominant vererbte Form der optischen Atrophie (OMIM 165500), die durch Mutationen im OPA1-Gen verursacht wird. OPA1 kodiert für das im mitochondrialen Intermembranraum lokalisierte Protein Opa1 (Alexander, 2000), ein Dynamin-ähnliches (Drp1p-like) Protein. Proteine dieser Gruppe sind unter anderem für die Ausbildung und Dynamik der mitochondrialen Morphologie verantwortlich. Es wird angenommen, dass Opa1 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Netzwerks und/oder bei der Cristaebildung innerhalb der menschlichen Zelle spielt (Olichon et al., 2002).

Insbesondere der von zahlreichen Komponenten vermittelte Prozess des Imports und der Sortierung zytosolisch synthetisierter Proteine in die mitochondrialen Kompartimente lässt vermuten, dass in diesem Bereich Mutationen zu Erkrankungen führen können. Bislang ist allerdings nur ein Krankheitsbild bekannt, bei der eine kernkodierte Komponente der mitochondrialen Translokationsmaschinerie betroffen ist: das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom.

1.2.2.1. Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom

Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS) oder auch Deafness-Dystonia-Syndrom genannt, ist eine seltene Form einer X-chromosomal gekoppelten Taubheit, die mit einer dystonen Bewegungsstörung einhergeht (Mohr and Mageroy, 1960; Tranebjaerg et al., 1995). Die Krankheit wurde erstmals 1960 von Mohr und Mageroy beschrieben und erst 1995 von Tranebjaerg genauer charakterisiert. Bis heute sind ca. 50 Patienten aus 12 betroffenen Familien bekannt (siehe Tabelle 1). Zu den obligaten Symptomen gehören eine in früher Kindheit einsetzende postlinguale Hörstörung, die im Verlauf zur vollständigen Taubheit führt sowie das Auftreten der dystonen Bewegungsstörung. Zudem können ab dem frühen Erwachsenenalter zusätzliche neurologische Symptome, wie kortikale Blindheit, mentale Retardierung und psychiatrische Symptome auftreten. Alle Symptome des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms besitzen eine hohe phänotypische Variabilität, d.h. der Verlauf und die Schwere der Erkrankung variieren nicht nur zwischen Patienten verschiedener Familien, sondern auch zwischen betroffenen Mitgliedern einer Familie (Swerdlow and Wooten, 2001; Tranebjaerg et al., 1995; Tranebjaerg et al., 1997; Ujike et al., 2001). Neuropathologische und neurophysiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass diesen Symptomen neurodegenerative Veränderungen in distinkten Gehirnbereichen zu Grunde liegen (Binder et al., 2003). Betroffen sind dabei unter anderem die Basalganglien, Bereiche der Hirnrinde und die occipitale Sehrinde.

1995 wurde der entsprechende Krankheitslokus auf den langen Arm des X-Chromosoms (Xq22) lokalisiert (Tranebjaerg et al., 1995). Als Erkrankungsgen konnte kurz darauf ein kleines, bis dahin unbekanntes Gen innerhalb des chromosomalen Bereichs Xq21.3 - Xq22 identifiziert werden. Das nachfolgend als *DDPI/TIMM8A* (deafness-dystonia-peptide 1) bezeichnete Gen besteht aus zwei Exons und kodiert für ein 97 Aminosäurereste langes Polypeptid (Jin et al., 1996). Mittlerweile wurden bei einer ganzen Reihe von Mohr-Tranebjaerg-Patienten pathogene Mutationen im *DDPI*-Gen gefunden. Diese Mutationen umfassen Stopmutationen und Insertionen/Deletionen, die zu Leserasterverschiebungen führen, aber auch größere genomische Deletionen, die nicht nur das *DDPI*-Gen, sondern auch das benachbarte Gen für die Bruton-Tyrosin-Kinase (BTK) umfassen (siehe Tabelle 1). Letzteres führt zu einem kombinierten Phänotyp aus X-chromosomal gekoppelter Agammaglobulinämie und progressiver Taubheit (Jin et al., 1996; Richter et al., 2001). Bisher ist nur eine *missense* Mutation des *DDPI/TIMM8A*-Gens bekannt (Tranebjaerg et al., 2000).

Land	betroffene Personen/ Anzahl der Generationen	Mutation des <i>DDP1</i> -Gens	Bemerkungen	Quelle
Norwegen	16/5	151 del T	Leserasterverschiebung	(Tranebjaerg et al., 1995)
Amerika	5/2	183 del 10	Leserasterverschiebung	(Jin et al., 1996)
Amerika	1/1	Deletion von <i>DDP1</i>		(Jin et al., 1996)
Australien	3/2	Deletion von <i>DDP1</i>		(Hayes et al., 1998)
Japan	5/4	238 C→T	Stopmutation	(Ujike et al., 2001)
Holland	1/1	233 C→G	AS-Austausch	(Tranebjaerg et al., 2000)
Kroatien (2x)	1/1	Deletion von <i>DDP1</i>		(Richter et al., 2001)
Libanon	1/1			
?	8/4	108 del G	Leserasterverschiebung	(Swerdlow and Wooten, 2001)
Amerika	3/2	Deletion von <i>DDP1</i>		(Scribanu and Kennedy, 1976)
Dänemark	3/2	105 G→T	Stopmutation	(Jensen, 1981)

Tab. 1: Übersicht über bisher bekannte Fälle des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms und den zugrunde liegenden Mutationen im *DDP1/TIMM8A*-Gen.

Mittlerweile konnten bei zwei weiteren Erkrankungen *DDP1*-Mutationen gefunden werden. Sowohl die als Jensen-Syndrom bezeichnete Demenz-assoziierte, optikoakustische Nervenatrophie (OMIM 311150) als auch das Ataxia-Dementia-Syndrom (OMIM 301840) ähneln in ihrer Erscheinungsform und Verlauf dem MTS. Es ist deshalb zu vermuten, dass es sich bei diesen Erkrankungen um verschiedene Formen des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms handeln könnte (Tranebjaerg et al., 1997).

Das *DDP1*-Gen ist ubiquitär in allen bisher untersuchten adulten und fetalen Geweben und vor allem in Hirngewebe exprimiert (Jin et al., 1996). Homologieuntersuchungen zeigten, dass das *DDP1*-Protein Homologie zu einem Protein in *Schizosaccharomyces pombe* besitzt. Es wurde daher spekuliert, dass es sich um ein evolutionär konserviertes Polypeptid handelt, das an der Entwicklung des humanen Nervensystems beteiligt sein könnte (Jin et al., 1996).

1.2.2.2. Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom ist eine mitochondriale Erkrankung

In weiteren vergleichenden Datenbankanalysen wurde die Homologie des *DDP1*-Proteins zu einer Familie von Proteinen des mitochondrialen Intermembranraums der Hefe *Saccharomyces*

cerevisiae festgestellt. In der Hefe umfasst diese Familie fünf Mitglieder: yTim8, yTim13, yTim9, yTim10 und yTim12 (Koehler et al., 1999a). Das menschliche DDP1 zeigt dabei höchste Sequenzähnlichkeit zum yTim8-Protein. In der Hefe sind diese sogenannten kleinen Tim-Proteine am Import von hydrophoben Membranproteinen in die mitochondriale Innenmembran beteiligt (Endres et al., 1999; Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998). Bisherige Untersuchungen des menschlichen DDP1-Proteins lassen eine mitochondriale Lokalisation vermuten: erstens kolokalisiert heterolog in COS7-Zellen exprimiertes DDP1 mit mitochondrialen Markerproteinen, und zweitens konnte gezeigt werden, dass *in vitro* synthetisiertes DDP1-Protein in isolierte Hefemitochondrien importiert wird (Koehler et al., 1999a). Die Homologie von DDP1 zu mitochondrialen Importkomponenten legt nahe, dass es sich beim Mohr-Tranebjaerg-Syndrom um eine mitochondriale Erkrankung handelt, deren Pathophysiologie ein mitochondrialer Importdefekt zugrunde liegt.

1.3. Grundlagen des Proteinimports in Mitochondrien

Die meisten Erkenntnisse über den Import kernkodierter Proteine stammen aus Untersuchungen niederer eukaryontischer Organismen wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder dem Brotschimmelpilz *Neurospora crassa* (Übersichtsartikel: Neupert, 1997; Pfanner and Geissler, 2001).

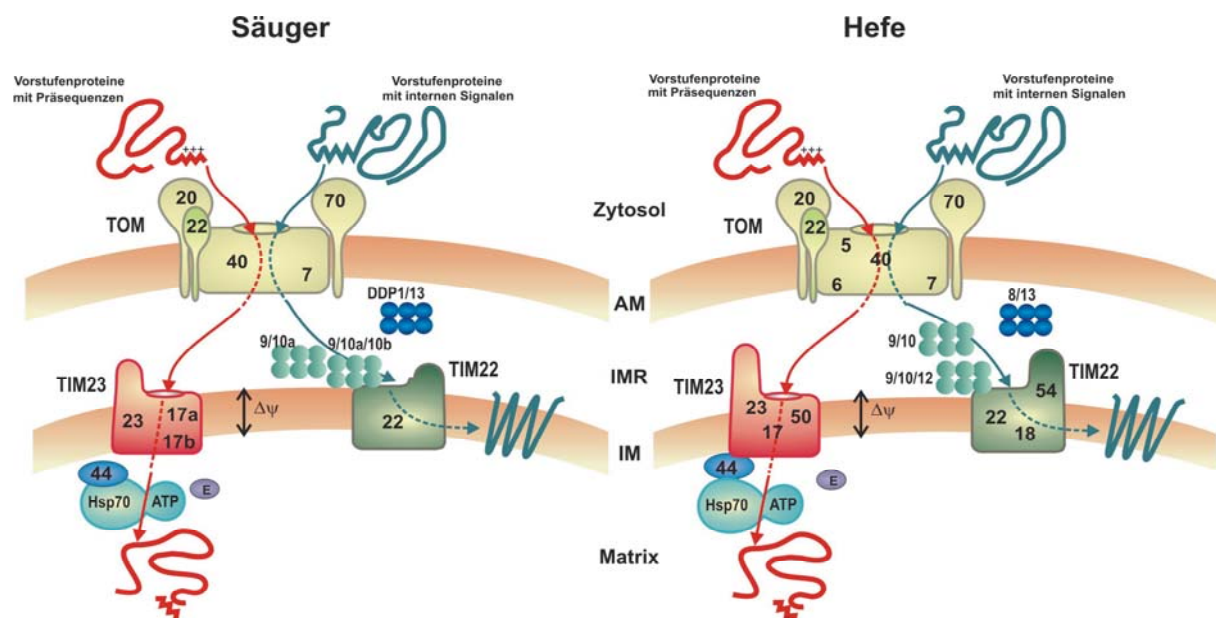


Abb.1. Proteintranslokation in Mitochondrien: Vergleichende Darstellung der Translokasekomponenten der äußeren und inneren Membran von Hefe und Mensch. AM, Außenmembran; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran; E, Mgel.

Vergleichende Studien an höheren Eukaryonten, insbesondere Säugetieren, machen deutlich, dass die Prinzipien des mitochondrialen Proteinimports und die agierenden Komponenten phylogenetisch weitgehend konserviert sind (siehe Abb.1). Die Mechanismen der mitochondrialen Proteintranslokation sind daher bis zu einem gewissen Punkt ähnlich bzw. vergleichbar (Übersichtsartikel: Hoogenraad NJ et al., 2002; Mori and Terada, 1998).

1.3.1. Zielführung mitochondrialer Präproteine an die Mitochondrien

Im Zellkern kodierte, mitochondriale Proteine werden im Zytosol an freien Ribosomen translatiert. Die neu-synthetisierten Polypeptide interagieren dabei mit sogenannten Hilfsproteinen (Chaperone). Eine Gruppe dieser zytosolischen Hilfsproteine verhindert eine vorzeitige Faltung oder Aggregation der oftmals hydrophoben Präproteine. Dazu gehören die zytosolische Isoform eines 70 kDa großen Hitzeschockproteins Hsp70: Hsc70 (Terada et al., 1995; Terada et al., 1996) oder zwei zytosolische Isoformen des Chaperon-Proteins DnaJ, dj2 und dj3 (Terada et al., 1997; Terada and Mori, 2000). Von einer zweiten Gruppe zytosolischer Hilfsproteine wird vermutet, dass sie die Hinführung der Vorstufenproteine zu den Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran, das sogenannte Proteintargeting, vermitteln. Zu diesen Proteinen gehören das PBF- (presequence binding factor) Protein (Murakami and Mori, 1990) und das MSF- (mitochondrial import stimulation factor)-Protein (Hachiya et al., 1994). Allerdings werden nicht alle Vorstufenproteine durch Interaktion mit dem MSF-Protein an die Mitochondrien herangeführt. In vielen Fällen wurde auch die direkte Interaktion zwischen zu importierenden Proteinen und den Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran beobachtet (Komiya et al., 1996).

1.3.2. Mitochondriale Importsignale

Auf der Oberfläche von Mitochondrien sitzen Rezeptoren, welche spezifisch mitochondriale Importsignale in den zu importierenden Vorstufenproteinen erkennen. Die überwiegende Mehrheit der für die Matrix bestimmten Proteine werden mit einer 10 - 80 Aminosäurereste umfassenden Signalsequenz an ihrem Aminoterminus (N-terminus) synthetisiert. Diese Signalsequenz wird auch als mitochondriale Präsequenz bezeichnet und in der Regel nach Import in die Matrix abgespalten. Die Präsequenzen der verschiedenen mitochondrialen Proteine variieren in ihrer Aminosäureabfolge, zeigen keine Homologien, besitzen jedoch gemeinsame strukturelle Merkmale. Dazu gehört die Abfolge aus positiv geladenen, hydrophoben und hydroxylierten Aminosäurenresten, sowie die Abwesenheit negativ geladener Aminosäuren. Ein Charakteristikum ist die hohe Tendenz zur Ausbildung einer

amphipathischen α -Helix mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Oberfläche. Rezeptoren auf der mitochondrialen Außenmembran erkennen die amphipathische Struktur der Präsequenz und vermitteln die Wechselwirkung der Vorstufenproteine mit dem Translokationskanal (Abe et al., 2000; Brix et al., 1997; Von Heijne, 1986). Die meisten Proteine, die in die Außenmembran, den Intermembranraum und die Innenmembran sortieren, werden ohne abspaltbare N-terminale Signale synthetisiert. Sie besitzen interne Import- bzw. Sortierungssequenzen. Im Gegensatz zur abspaltbaren N-terminalen Präsequenz variieren diese Signale noch stärker und sind noch wenig charakterisiert (Diekert et al., 1999; Endres et al., 1999; Gärtner et al., 1995; Glick et al., 1992; Hahne et al., 1994; Lill et al., 1996; Nunnari et al., 1993; Schatz, 1996; Schneider, 1991).

1.3.3. Die Translokation über die mitochondriale Außenmembran

Die Präsequenz erkennenden Rezeptoren sind Bestandteile einer Translokationsmaschinerie über die mitochondriale Außenmembran, dem sogenannten TOM- (translocase of the outer membrane) Komplex. Der TOM-Komplex vermittelt die Translokation von Proteinen aus dem Zytosol in Mitochondrien mit Hilfe eines Porenproteins. Mindestens sieben verschiedene Proteine sind am Aufbau des Komplexes beteiligt. Die meisten dieser Komponenten wurden in *S.cerevisiae* oder *N.crassa* näher charakterisiert (Übersichtsartikel: Neupert, 1997; Pfanner and Wiedemann, 2002). In Mitochondrien von Säugerzellen werden zunehmend Homologe dieser Translokase-Komponenten identifiziert (Übersichtsartikel: Hoogenraad NJ et al., 2002). Alle Komponenten des TOM-Komplexes sind integrale Proteine der mitochondrialen Außenmembran, die sich zwei funktionellen Gruppen zuordnen lassen: Rezeptoren auf der Außenmembran (Tom20, Tom22, Tom70) und Bestandteile der Translokationspore (general insertion pore; GIP) (Tom40, Tom5, Tom6, Tom7). Die Proteine Tom20, Tom22 und Tom70 bilden zwei Rezeptorkomplexe mit unterschiedlichen, zum Teil auch überlappenden Funktionen. Vorstufenproteine mit einer positiv geladenen Präsequenz werden zuerst durch Tom20 und anschließend von Tom22 erkannt (Abe et al., 2000; Brix et al., 1997; Mayer et al., 1995b; Söllner et al., 1989). Mitochondriale Proteine, die interne Signalsequenzen besitzen, wie z.B. der ADP/ATP-Carrier, werden durch den Tom70-Rezeptor erkannt und anschließend an den Tom20-Tom22 Komplex weitergeleitet (Brix et al., 1997; Dietmeier et al., 1993; Pfanner and Geissler, 2001; Schatz and Dobberstein, 1996; Söllner et al., 1990; Lithgow et al., 1994; Model et al., 2002; Nargang et al., 1995; Ramage et al., 1993; Söllner et al., 1989; Stan et al., 2000). Durch die Interaktion des Vorstufenproteins mit Tom22 wird die Translokation über die Translokationspore eingeleitet. Von den Komponenten der Translokationspore formt

Tom40, das einzig essentielle Protein des TOM-Komplexes, den proteinleitenden Kanal (Hill et al., 1998; Meisinger et al., 2001; Rapaport et al., 1997; Suzuki et al., 2000). Vermutlich besitzt jeder TOM-Komplex zwei bis drei proteinleitende Kanäle, die wiederum von zwei Tom40-Proteinen gebildet werden (Ahting et al., 2001; Ahting et al., 1999; Kunkele et al., 1998). Tom5 ist mit Tom40 assoziiert und vermittelt die Insertion der rezeptorgebundenen Vorstufenproteine in die Translokationspore (Dietmeier et al., 1997). Die Funktion von Tom6 und Tom7 ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass beide Proteine antagonistisch die Assemblierung des TOM-Komplexes beeinflussen (Alconada et al., 1995; Dekker et al., 1998; Honlinger et al., 1996). Als treibende Kraft des Proteintransports über die äußere Membran wird die Bindung der positiv geladenen Präsequenz an eine Reihe sequentiell angeordneter, negativ geladener Bindungsstellen mit aufsteigender Affinität vermutet (acid chain hypothesis) (Bolliger et al., 1995; Dietmeier et al., 1997; Komiya et al., 1998; Mayer et al., 1995a; Schatz, 1997). Daneben scheinen auch elektrostatische und auch hydrophobe Interaktionen zwischen der zu importierenden Polypeptidkette und entsprechenden Bindestellen innerhalb des TOM-Komplexes und des Intermembranraumes eine Rolle zu spielen ("binding chain" Hypothese) (Abe et al., 2000; Meisinger et al., 2001; Pfanner and Wiedemann, 2002; Truscott et al., 2002).

1.3.4. Der Import über die mitochondriale Innenmembran

Innerhalb von Mitochondrien existieren drei unabhängige Innenmembran-Translokasen. Sie unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. Vorstufenproteine mit N- oder C-terminalen Präsequenzen werden über die TIM (translocase of the mitochondrial inner membrane) 23-Translokase in die Matrix oder die mitochondriale Innenmembran importiert (Übersichtsartikel: Mori and Terada, 1998; Neupert, 1997). Proteine mit internen Importsignalen inserieren mehrheitlich über die TIM22-Translokase in die mitochondriale Innenmembran (Übersichtsartikel: Bauer et al., 2000; Jensen and Dunn, 2002). Der OXA1-Komplex vermittelt die Insertion von Membranproteinen aus der Matrix in die Innenmembran. Substrate sind sowohl mitochondrial- als auch kernkodierte Innenmembranproteine (Hell et al., 1998; Herrmann et al., 1997).

1.3.4.1. Die TIM23-Translokase

Die Komponenten der TIM23-Translokase sind, wie die Komponenten des TOM-Komplexes, evolutionär konserviert (Bauer et al., 1999a; Ishihara and Mihara, 1998). Bisherige Untersuchungen in *S.cerevisiae* und *N.crassa* haben gezeigt, dass am TIM23-Komplex die

integralen Innenmembranproteine Tim17 und Tim23 und Tim50 und das von der Matrixseite an die Innenmembran assoziierte Protein Tim44 beteiligt sind (Dekker et al., 1993; Emtage and Jensen, 1993; Geissler et al., 2002; Kubrich et al., 1994; Maarse et al., 1992; Ryan et al., 1994; Scherer et al., 1992). Der eigentliche Translokationskanal des TIM23-Komplexes wird dabei vermutlich von den zwei integralen Membranproteinen Tim23 und Tim17 gebildet. Beide Proteine interagieren miteinander über ihre membranintegrierten C-terminalen Bereiche (Dekker et al., 1997; Ryan et al., 1998). Tim23 besitzt neben dem integralen Membrananteil noch eine N-terminale Domäne, die im Intermembranraum exponiert ist. In *S.cerevisiae* wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne von Tim23 zudem die mitochondriale Außenmembran durchspannt und damit als bisher einzig bekanntes mitochondriales Protein beide Membranen verbindet (Donzeau et al., 2000). Für das Tim23-Protein des Menschen konnte das nicht beobachtet werden (eigene Beobachtungen). Die N-terminale Domäne von Tim23 bildet vermutlich im Intermembranraum einen Präsequenz-Rezeptor und vermittelt darüber hinaus die Membranpotential abhängige Dimerisierung von Tim23 (Bauer and Neupert, 1996). Kürzlich wurde mit Tim50 eine weitere Proteinkomponente des TIM23-Komplexes von *S.cerevisiae* identifiziert. Tim50 ist in der mitochondrialen Innenmembran verankert und besitzt eine große hydrophile Domäne, die im Intermembranraum lokalisiert ist (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Bei Tim44 handelt es sich um ein von der Matrixseite aus peripher an den Translokationskanal assoziiertes Protein, das in Abhängigkeit von ATP mit dem löslichen Matrixprotein mtHsp70 und dessen "Co-Chaperon" Mge1p interagiert (Bolliger et al., 1994; Ishihara and Mihara, 1998; Kang et al., 1990; Scherer et al., 1990; Westermann et al., 1995b). Für die Translokation über die mitochondriale Innenmembran wird folgendes Modell vorgeschlagen:

Die Präsequenz von Vorstufenproteinen interagiert, nachdem sie durch den TOM-Komplex an die TIM23-Translokase weitergegeben worden ist, mit dem dimeren Präsequenz-Rezeptor von Tim23 und vermittelt dessen Dissoziation. Dadurch wird vermutlich der Importkanal geöffnet und das Membranpotential kann elektrophoretisch auf die positiv geladene Präsequenz wirken, wodurch diese vermutlich durch den Kanal gezogen wird (Martin et al., 1991). Die Präsequenz wird nach erfolgter Translokation über die Innenmembran in der Matrix durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (α,β -MPP) abgespalten. Nach Erreichen der Matrix bindet der Tim44-mtHsp70-Komplex an entfaltete Proteindomänen des reifen Präproteins (Ungermann et al., 1994). Die Funktion des Tim44-mtHsp70-Komplexes wird bis heute kontrovers diskutiert (Übersichtsartikel: Neupert and Brunner, 2002). Ein Modell beschreibt die vollständige Entfaltung und Translokation auf Grund Brownscher Molekularbewegung,

wobei mtHsp70 als "Sperrhaken" fungiert und eine reversible Bewegung verhindert (Brownian molecular ratchet model) (Milisav et al., 2001; Moro et al., 2002; Moro et al., 1999; Okamoto et al., 2002; Schneider et al., 1994). Ein zweites Modell geht von einem "Importmotor" aus (power stroke model), wonach eine ATP abhängige Konformationsänderung von mtHsp70 eine gerichtete Zugkraft auf das zu importierende Protein ausübt (Glick, 1995; Ryan and Pfanner, 2001).

Im Anschluss an die Translokation und Prozessierung erfolgt die Faltung und Assemblierung der importierten Polypeptidketten in der Matrix unter Vermittlung der mitochondrialen Chaperone: mtHsp70, Mdj1p, Mge1p und Hsp60-Cpn10 (Hoehfeld and Hartl, 1994; Horst et al., 1997; Rospert et al., 1993; Rowley et al., 1994; Westermann et al., 1996; Westermann et al., 1995a).

1.3.4.2. Die TIM22-Translokase

Neben dem TIM23-Komplex existiert in der mitochondrialen Innenmembran eine zweite Translokase, der TIM22-Komplex. Der TIM22-Komplex agiert unabhängig von der TIM23-Translokase und vermittelt den Import und die Insertion von integralen Proteinen in die mitochondriale Innenmembran (Sirrenberg et al., 1996). Substrate sind die Mitglieder der Familie der mitochondrialen Transporter (Carrier)-Proteine (MCF) wie z.B. der ADP/ATP-Carrier oder der Phosphat-Carrier (PiC) (Endres et al., 1999; Kaldi et al., 1998; Palmieri, 1994; Palmieri et al., 1996; Sirrenberg et al., 1998), aber auch hydrophobe Innenmembranproteine wie z.B. die Translokasekomponenten Tim17 und Tim23. Der TIM22-Komplex umfasst sowohl membranintegrale, als auch im Intermembranraum lösliche Komponenten (Übersichtsartikel: Bauer et al., 2000; Koehler et al., 1999b). In *S.cerevisiae* besitzt die TIM22-Translokase drei membranintegrale Komponenten: Tim22, Tim54 und Tim18 (Kerscher et al., 1997; Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996). Tim22 besitzt eine ausgeprägte Homologie zu den integralen Komponenten der TIM23-Translokase, Tim17 und Tim23, und bildet den proteinleitenden Kanal (Kovermann et al., 2002; Sirrenberg et al., 1996). Tim54 ist über eine N-terminal lokalisierte Domäne in der Innenmembran verankert, während der Hauptanteil im Intermembranraum exponiert ist. Tim54 ist ein essentielles Protein der Hefe mit bisher unbekannter Funktion. Möglicherweise wird es für die Integrität von Tim22 benötigt (Kerscher et al., 1997). Tim18 ist für das Wachstum der Hefe nicht essentiell. Es wird mit einer N-terminalen Präsequenz importiert und inseriert nach der Prozessierung über drei vorhergesagte Transmembrandomänen in die Innenmembran (Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000). Ebenso wie bei Tim54 ist die Funktion von Tim18 noch nicht geklärt.

Möglicherweise unterstützt Tim18 die Assemblierung oder die Stabilisierung des TIM22-Komplexes (Koehler et al., 2000). In höheren Eukaryonten, wie z.B. den Säugern konnten bisher Tim22-Homologe, jedoch keine Homologe von Tim54 und Tim18 identifiziert werden (Bauer et al., 1999b).

1.3.4.3. Die kleinen Tim-Proteine

Der Import von Vorstufenproteinen über die TIM22-Translokase wird zusätzlich durch lösliche Hilfsproteine im Intermembranraum, den sogenannten kleinen Tim-Proteinen, unterstützt. Die Familie der kleinen Tim-Proteine umfasst in *S.cerevisiae* fünf Proteine: die essentiellen Komponenten yTim9, yTim10 und yTim12 und die nicht-essentiellen Proteine, yTim8 und yTim13. Die verschiedenen kleinen Tim-Proteine weisen hohe strukturelle Ähnlichkeiten auf. Charakteristisch für alle Proteine ist dabei ein konserviertes Motiv, das möglicherweise an der Ausbildung einer Zinkfinger-ähnlichen Struktur beteiligt ist.

Die essentiellen Mitglieder yTim10 und yTim12 der Familie der kleinen Tim-Proteine wurden erstmals 1993 in *S.cerevisiae* als Suppressoren eines mitochondrialen RNA-Spleißdefektes entdeckt (Waldherr et al., 1993). Diese ursprüngliche Bedeutung war indirekter Natur, vielmehr zeigte sich, dass die identifizierten Proteine Mrs11 (später: yTim10) und Mrs5 (später:yTim12) im Intermembranraum lokalisiert sind und eine essentielle Rolle beim Import mitochondrialer Carrier-Proteine in die Innenmembran ausüben (Jarosch et al., 1997; Jarosch et al., 1996; Sirrenberg et al., 1998). Durch Interaktionsuntersuchungen wurde mit yTim9 ein weiteres essentielles Protein dieser Familie identifiziert (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998b).

Die Funktion der essentiellen kleinen Tim-Proteine ist weitgehend geklärt. yTim9, yTim10 und yTim12 assemblieren im Intermembranraum zu zwei hetero-oligomeren Komplexen. yTim9 bildet mit yTim10 einen löslichen hexameren Komplex mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 70 kDa. Der yTim9/yTim10 Komplex enthält vermutlich je drei Moleküle yTim9 und yTim10 (yTim9₃/yTim10₃) (Adam et al., 1999; Curran et al., 2002a; Koehler et al., 1998b). In einem zweiten hexameren Komplex ist ein yTim10-Protein gegen ein yTim12-Protein ausgetauscht (yTim9₃/yTim10₂/yTim12). Dieser Komplex ist mit der Außenseite der mitochondrialen Innenmembran assoziiert (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998b). Auf die Funktion der beiden hetero-oligomeren Komplexe beim Import hydrophober Vorstufenproteine in die Innenmembran soll im Zusammenhang mit dem Importmodell des ADP/ATP-Carriers näher eingegangen werden.

Mitochondriale Carrier-Proteine sind integrale Innenmembranproteine. Ihre Aufgabe ist es, den Austausch von Metaboliten zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranraum bzw. dem Zytosol zu bewerkstelligen. *S.cerevisiae* besitzt mindestens 35 verschiedene Carrier-Proteine (Palmieri, 1994). Am besten untersucht ist der mitochondriale Import des ADP/ATP-Transporters der Hefe (AAC). Er lässt sich in fünf Stufen einteilen (Abb.2). Die AAC-Vorstufe bindet nach der Synthese im Zytosol an zytosolische Hilfsproteine (Stufe I). Das Vorstufenprotein wird durch den Tom70-Rezeptor erkannt und an die mitochondriale Oberfläche gebunden (Stufe II). Im Anschluss inseriert das AAC-Vorstufenprotein über eine interne Schleife (Modul) in den Importkanal des TOM-Komplexes und wird über die Außenmembran transloziert (Stufe III). Nach Erreichen des Intermembranraumes bindet das exponierte Modul an den löslichen γ Tim9/ γ Tim10 Komplex (Stufe IIIa). Im Verlauf der Translokation werden in den Intermembranraum translozierte Module vom γ Tim9/ γ Tim10-Komplex an den γ Tim9/ γ Tim10/ γ Tim12-Komplex weitergeleitet. Dieser vermittelt den Kontakt zur TIM22-Translokase in der Innenmembran (Stufe IIIb). Nach der Freisetzung aus dem TOM-Komplex inseriert das Vorstufenprotein in Abhängigkeit eines Membranpotentials über den TIM22-Komplex in die Innenmembran (Stufe IV). In der Innenmembran assembliert der AAC zu einem funktionellen Dimer (Stufe V) (nicht dargestellt).

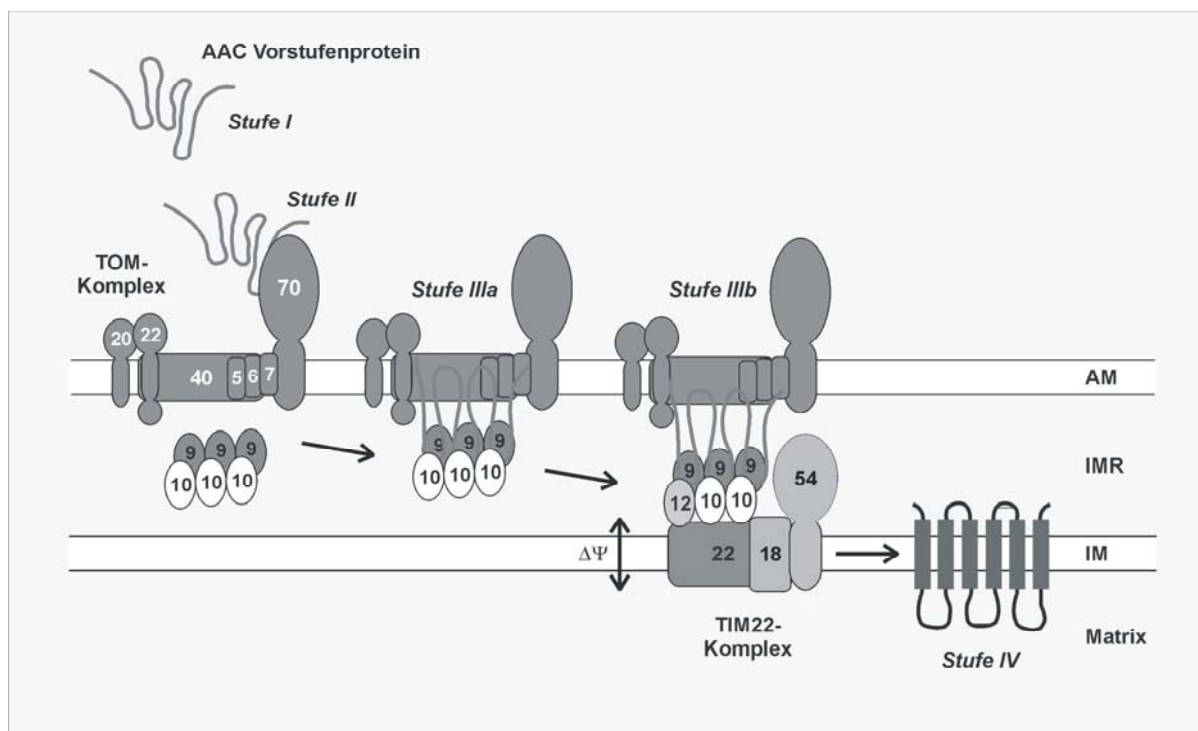


Abb.2: Importmodell des ADP/ATP-Carriers in Mitochondrien

Im Gegensatz zu yTim9, yTim10 und yTim12 ist die Funktion der nicht-essentiellen Tim-Proteine yTim8 und yTim13 noch weitgehend ungeklärt. Beide Proteine assemblieren wie die anderen Mitglieder der Familie zu einem löslichen, hetero-oligomeren 70 kDa-Komplex im mitochondrialen Intermembranraum. Importstudien an $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Deletionsstämmen der Hefe haben gezeigt, dass der yTim8/yTim13-Komplex nicht am Import des ADP/ATP-Carriers beteiligt ist, sondern unter bestimmten energetischen Bedingungen beim Import des Tim23-Vorstufenproteins der Hefe (yTim23), der Hauptkomponente des TIM23-Komplexes, assistiert (Davis et al., 2000; Leuenberger et al., 1999; Paschen et al., 2000). In Abwesenheit des Membranpotentials $\Delta\psi$ über die mitochondriale Innenmembran ist der yTim8/yTim13-Komplex in Kontakt mit dem yTim23-Translokationsintermediat, in Anwesenheit eines hohen Membranpotentials ist diese Interaktion nicht mehr nachweisbar. Während bei hohem Membranpotential die Unterstützung durch den yTim8/yTim13-Komplex für die Translokation entbehrlich ist, wird in Abwesenheit des Membranpotentials das yTim23-Vorstufenprotein nur partiell über die äußere Membran transportiert. Die Translokation und Insertion von yTim23 in die Innenmembran ist unter diesen Bedingungen ineffizient. In dieser Situation scheint die Bindung des yTim8/yTim13-Komplexes notwendig, um das yTim23-Translokationsintermediat im Intermembranraum zu halten und dessen retrogrades Herausgleiten aus dem TOM-Komplex zu verhindern (Paschen et al., 2000).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Mitochondrien nehmen nach heutigem Wissen eine Schlüsselstellung beim Entstehen neurodegenerativer Krankheiten ein. Mutationen in dem sogenannten "deafness dystonia peptide 1" (*TIMM8A/DDP1*-Gen) verursachen das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS), das mit Taubheit, Dystonie, Blindheit und mentaler Retardierung einhergeht. Das betroffene Genprodukt DDP1 ist Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, der kleinen Tim-Proteine. Diese unterstützen als lösliche Hilfsproteine den Import hydrophober Membranproteine in die mitochondriale Innenmembran. Alle bisher identifizierten kleinen Tim-Proteine besitzen ein potenzielles Metallbindungsmotiv, das sich aus vier Cysteinen zusammensetzt (Cys₄-Motiv) und möglicherweise an der Ausbildung einer Zinkfinger-ähnlichen Struktur beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des molekularen Mechanismus, über den ein Funktionsverlust von DDP1 zur Neurodegeneration beim Mohr-Tranebjaerg-Syndrom führt.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war ungeklärt, ob die humanen Homologen dieser Proteinfamilie ähnlich wie in Hefe in hetero-oligomeren Komplexen organisiert sind, die sich funktionell unterscheiden. Im Vordergrund dieser Arbeit stand daher die Analyse der strukturellen Organisation dieser Komponenten, insbesondere des krankheitsassoziierten DDP1-Proteins in menschlichen Zellen bzw. Mitochondrien. Ein wesentlicher Aspekt dabei war die Bestimmung der submitochondrialen Lokalisation sowie die Aufklärung der nativen Komplexgröße und der Komplex-Zusammensetzung.

Anhand der Etablierung eines Hefemodells sollte die Funktion von DDP1 näher charakterisiert werden. Unter Verwendung eines bereits vorhandenen Deletionsstammes für *yTim8* und *yTim13*, der einen eindeutigen Wachstumsphänotyp besitzt, sollte in verschiedenen Ansätzen überprüft werden, ob die menschlichen Homologe DDP1 und Tim13 in der Lage sind, die fehlenden Hefeproteine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* funktionell zu ersetzen. Insbesondere galt es zu klären, ob DDP1 in ähnlicher Weise wie das *yTim8*-Protein der Hefe am Import von Tim23-Vorstufenproteinen beteiligt ist. In diesem Zusammenhang sollten die energetischen Bedingungen für einen effizienten Import des humanen Tim23-Vorstufenproteins näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte versucht werden, durch den Import *in vitro* synthetisierter hydrophober Membranproteine in Säugermitochondrien eine direkte Wechselwirkung der humanen kleinen Tim-Proteine mit entsprechenden Vorstufensubstraten nachzuweisen.

Ein weiteres Ziel war es, anhand rekombinant exprimierter Fusionsproteine die Bindungsfähigkeit der vermuteten Zinkfinger-ähnlichen Motive des DDP1- und Tim13-Proteins für Metall-Ionen zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand dabei die Aufklärung der Bedeutung der Zinkfingerstruktur für die Funktion, die Struktur und die Stabilität des DDP1-Proteins. Grundlage dafür war die kürzliche Entdeckung einer MTS-assoziierten *missense* Mutation im *DDP1*-Gen, die zu einem Cystein gegen Tryptophan Austausch im konservierten Cys₄-Motiv (C66W-Mutation) führt. Durch die Untersuchung der strukturellen und funktionellen Konsequenzen der C66W-Mutation, unter Verwendung rekombinant exprimierter Proteine als auch im Hefemodell, sollte der molekulare Mechanismus, der zum Funktionsverlust von DDP1 im Patienten führt, aufgeklärt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Verwendete Plasmide

Die Klonierungsstrategien für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind unter Punkt 2.1.11 beschrieben (*S.c.*: *S.cerevisiae*, *N.c.*: *N.crassa*, *H.s.*: *Homo sapiens*).

pGEM4-Plasmid (Promega)	Referenz
pDDP1 (<i>H.s.</i>)	(Hofmann et al., 2002)
pDDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>)	(Hofmann et al., 2002)
pTim23 (<i>H.s.</i>)	(Paschen et al., 2000)
pTim23 (<i>S.c.</i>)	(Berthold et al., 1995)
pAAC2 (<i>N.c.</i>)	(Pfanner et al., 1987)
pYX142-Vektor (Novagen)	
pTim13 (<i>H.s.</i>)	(Rothbauer et al., 2001)
pYX232-Vektor (Novagen)	
pDDP1 (<i>H.s.</i>)	(Rothbauer et al., 2001)
pDDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>)	(Hofmann et al., 2002)
pQE-Plasmid (Qiagen)	
His-DDP1 (<i>H.s.</i>) (pQE40)	(Hofmann et al., 2002)
His-DDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>) (pQE40)	(Hofmann et al., 2002)
Tim13-GST (<i>H.s.</i>) (pQE13)	(Hofmann et al., 2002)
pMal-cRI (New England Biolabs)	
pMBP-DDP1 (<i>H.s.</i>)	(Rothbauer et al., 2001)
pMBP-DDP2 (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
pMBP-Tim13 (<i>H.s.</i>)	(Rothbauer et al., 2001)
pMBP-Tim9 (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
pMBP-Tim10a (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
pMBP-Tim10b (<i>H.s.</i>)	diese Arbeit
pMBP-DDP1 ^{C66W} (<i>H.s.</i>)	(Hofmann et al., 2002)
pMBP-lac α	(Endres et al., 1999))

Tab.2: verwendete Plasmide

2.1.2. Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten *in vitro* wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet (Saiki et al., 1988). Eine wiederholte Abfolge von Strangtrennung (Denaturierung), Anlagerung zweier spezifischer Oligonukleotide (Hybridisierung) und DNA-Synthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) führt zur exponentiellen Synthese eines spezifischen DNA-Abschnitts. Ein typischer Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 2U Taq-Polymerase, 50 µM der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) sowie 10-50 pMol der Oligonukleotide in dem vom Hersteller (Gibco, BRL) gelieferten PCR-Puffer. Als Matrize wurde entweder 5 ng Plasmid-DNA, cDNA oder bis zu 200 ng genomische Hefe-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsablauf in einem Thermozykler (GeneAmp-PCR System, Perkin Elmer) begann mit einer einmaligen Denaturierung der Matrize für 3 Minuten bei 94°C. Dann wurde eine zyklische Reaktionsfolge bestehend aus Denaturieren (30 sec - 1 min bei 94°C), Anlagerung der Oligonukleotide (30 sec - 1 min, bei der den Primern entsprechenden Temperatur) und Synthese der DNA (30 sec-2 min bei 72°C, abhängig von der Länge der DNA-Matrize) gestartet. Die Zyklenanzahl betrug zwischen 25 und 35 Wiederholungen. Die benötigte Hybridisierungstemperatur für die Oligonukleotide wurde nach der Regel ($G/C \times 4^{\circ}C + A/T \times 2^{\circ}C$) berechnet (Suggs et al., 1981). Als Kontaminationskontrolle wurde immer ein Ansatz ohne DNA-Matrize verwendet. Nach dem letzten Zyklus wurden die Ansätze bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen.

2.1.3. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Trennung von DNA erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7.5, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA). Die Agarosegele wurden je nach erwarteter DNA-Größe mit Standard-Agarose (Seakem ME, Biozym) oder "Low melting"-Agarose (NuSieve, FMC-Bioproducts) in Konzentrationen von 1% bis 3,5% (w/v) hergestellt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) und UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung aus Agarosegelen wurde der "GFX-PCR DNA and Gel-Band Purification Kit" (Amersham Biosciences Corp.) verwendet. Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD_{260nm}) bestimmt. Eine OD_{260nm} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA (linearer Bereich: 0,1 - 1,0 OD).

2.1.6. Restriktionsverdau von DNA

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte gemäß den Angaben des Enzym-Herstellers.

2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA Molekülen erfolgte in vitro bei 16°C mit 1U T4-DNA Ligase in einem Endvolumen von 10 μl mit 1x Ligationspuffer (Gibco, BRL), 0.5 mM ATP und 50 ng Vektor. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug dabei 3:1.

2.1.8. Sequenzspezifische Mutagenese mit PCR-vermittelter Rekombinationstechnik

(Two-Sided Overlap Extension PCR)

Mutationen in der Mitte eines PCR-Fragments wurden durch die PCR-vermittelte Rekombinationstechnik "Overlap extension PCR" eingeführt (Ho et al., 1989; Horton et al., 1990). Bei der "Two sided Overlap Extension PCR" wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen zunächst zwei einander überlappende Fragmente erzeugt. In der "Overlap Extension" PCR-Reaktion (5 Zyklen) wurden die, an ihren 3' Enden hybridisierten Stränge verlängert, wodurch die beiden Ausgangsfragmente zusammengespleißt wurden. Das entstehende Fragment wurde nach Zugabe des "forward" und des "reverse" Primers in einer weiteren PCR-Reaktion (30 Zyklen) amplifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR-vermittelte Mutagenese zum Nukleotidaustausch an Position 233 der kodierenden *DDPI*-Sequenz (C \rightarrow G) verwendet. Zur Erzeugung überlappender mutagenisierter Fragmente wurde mit einem *DDPI* spezifischen cDNA-Klon als Matrize in zwei getrennten PCR-Reaktionen zwei, an ihrem 3'- bzw. 5'-Ende überlappende Fragmente amplifiziert, die in einer dritten PCR-Reaktion zusammengespleißt wurden. Das dabei entstandene Produkt enthielt den gewünschten Nukleotidaustausch und wurde durch Zugabe der beiden Endprimer

DDP1-1F und DDP1-1R in einer dritten PCR-Reaktion amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde direkt sequenziert und anschließend in die entsprechenden Vektoren kloniert.

Primer eingesetzt in Reaktion 1

Primer	Sequenz
DDP1-1F	5'-CCCGATATCGAATTCATGGATTCCTCCTCTCT-3'
DDP1 ^{C66W} -R	5'-CTCAACCCAGTTCACAAAC-3'

Primer eingesetzt in Reaktion 2

Primer	Sequenz
DDP1 ^{C66W} -F	5'-TTGTGAACTGGGTTGAGC-3'
DDP1-1R	5'-CCCCAAGCTTTCAGTCAGAAAGGCTTTC-3'

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

Zur Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode des Hitzeschocks nach Cohen angewendet (Cohen, 1972).

Die Präparation von kompetenten *E.coli*-Zellen erfolgte durch Anzucht bis zu einer OD_{598nm} von 0.3 - 0.4 in 200 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl). Nach Abzentrifugieren wurden die Zellen in 60 ml TFB I-Puffer [30 mM KAc, 50 mM MnCl₄(H₂O), 100 mM RbCl₂, 15%(v/v) Glycerin, pH 5.9] resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in TFB II-Puffer [10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15%(v/v) Glycerin] resuspendiert und aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Vor der Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen 30 min im Eisbad aufgetaut und anschließend mit 20-200 ng zu transformierender DNA versetzt. Das Gemisch wurde mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 - 2 min bei 42°C mit anschließender Inkubation für 2 min auf Eis. Die Zellen wurden daraufhin mit 1 ml LB-Medium versetzt, 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend in entsprechender Menge und auf einer LB-Amp-Platte [LB mit 2% (w/v) Agar und 100 µg/ml Ampicillin] ausplattiert.

2.1.10. Isolierung von Plasmid DNA

a) Minipräparation von DNA

Zur Reinigung von kleinen Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 20 µg) aus *E.coli* Zellen wurde der "QIAprep Miniprep Kit" (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 1 - 4 ml einer entsprechenden *E.coli* Übernachtskultur abzentrifugiert (10 min, 3000 UpM, Hettich). Das Bakterien-Pellet in 50 µl Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/µl RNaseA, pH 8.0) gelöst, mit 250 µl Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, durch vorsichtiges

Schütteln lysiert und anschließend mit 350 µl Neutralisationspuffer N3 (3 M KAc, pH 5.5) neutralisiert. Die Abtrennung von Zellresten und denaturiertem Protein erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 13000 UpM, Tischzentrifuge, 4°C). Der Überstand wurde auf Silicagel-Säulen überführt, zentrifugiert (1 min, 13000 UpM, Tischzentrifuge), das Eluat verworfen und die Säule mit der gebundenen Plasmid-DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Plasmid DNA wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl ddH₂O und anschließender Zentrifugation (13000 UpM, Tischzentrifuge) eluiert.

b) Midipräparation von DNA

Die Präparation von größeren Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 100 µg) erfolgte unter Verwendung des "QIAGEN Plasmid Midi-Kit". Dabei wurden gleiche Pufferlösungen wie bei der Minipräparation nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reinigung der DNA erfolgt über QIAGEN-Tip 100 (Säule). Im Anschluss an die Elution der Säule wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt (30 min, 12000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C), mit 70%-igen Ethanol gewaschen und in ddH₂O aufgenommen.

2.1.11 Klonierungsstrategien

Alle verwendeten Plasmide wurden in den *E.coli*-Stamm XL1-Blue (Genotyp: supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 lac [F':::Tn10 proA⁺B⁺ lacIqΔ (lacZ)M15]) (Stratagene, Heidelberg) transformiert.

Zur gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine wurden Derivate des Plasmids pGEM4 (Promega) verwendet, in welche das jeweilige PCR-Produkt unter Kontrolle des SP6-Promotors kloniert worden war. Zur Expression rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen Pentahistidinpeptid (His₅-Tag) wurden die entsprechenden Sequenzen in das Plasmid pQE40 (Qiagen) kloniert. Die Expression von Fusionsproteinen mit C-terminaler Glutathion S-Transferase erfolgte durch Klonierung der jeweiligen Sequenz in ein modifiziertes pQE13-Plasmid (Qiagen) (Bauer et al., 1996). Zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Maltosebindungsprotein (MBP) wurden die entsprechenden Sequenzen in das pMAL-cRI-Plasmid (New England Biolabs) kloniert. Als Hefe-Expressionsvektoren wurde der Einzelkopie-Vektor pYX142 oder das 2µ-Plasmid pYX232 (Novagen) verwendet. In beiden Fällen wurde die kodierende Sequenz hinter dem konstitutiven Triosephosphat-Isomerase-Promotor (TPI) kloniert.

a) Klonierung von DDP1 und DDP1^{C66W} in pGEM4: Die kodierende Sequenz von DDP1 wurde aus einem DDP1-spezifischen cDNA Klon (Bauer et al., 1999b) in einer PCR-Reaktion mit folgenden Primern amplifiziert:

2. MATERIAL UND METHODEN

Primer	Sequenz
DDP1-1F (EcoRI)	5'-CCCCGATATCGAATTCATGGATTCTCCTCCTCTTCC-3'
DDP1-R (HIII)	5'-CCCAAGCTTTCAGTCAGAAAGGCTTCTGAG-3'

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten und in einen mit EcoRI/HindIII geschnittenen pGEM4-Vektor kloniert.

Die Klonierung der mutagenisierten Variante DDP1^{C66W} erfolgte in gleicher Weise.

b) Klonierung von DDP1 und Tim13 in pMal-cRI: Die kodierenden Sequenzen von DDP1 und Tim13 wurden aus spezifischen cDNA-Klonen in einer PCR-Reaktion mit folgenden Primern amplifiziert:

Primer	Sequenz
DDP1-2F (BamHI)	5'-CCCCGATATCGGATCCATGGATTCTCCTCCTCTTCC-3'
DDP1-R (XbaI)	5'-CCCCTCTAGATCAGAAAGGCTTCTGAG-3'
Tim13-F (BamHI)	5'-CCCGGATCCATGGAAGGGCGGCTTCGG-3'
Tim13-R (XbaI)	5'-CCCCTCTAGATCACATGTTGGCTCGTTC-3'

Die PCR-Produkte wurden mit BamHI und XbaI verdaut und in einen mit BamHI/XbaI geschnittenen pMal-cRI Vektor (New England Biolabs) kloniert. Die Klonierung von DDP1^{C66W} erfolgte in gleicher Weise wie DDP1.

c) Klonierung von DDP1 und Tim13 in pYX-Plasmide: Die Klonierung von DDP1 und Tim13 in die Hefe-Expressionsvektoren pYX232 bzw. pYX142 erfolgte durch die Amplifikation der kodierenden Sequenz in einer PCR-Reaktion mit entsprechenden cDNA-Klonen als Vorlage. Als Primerpaare wurden DDP1-1F (EcoRI) und DDP1-R (HIII) bzw.

Primer	Sequenz
Tim13-F (EcoRI)	5'-CCCGAATTCATGGAAGGGCGGCTTCGG-3'
Tim13-R (HIII)	5'-CCCCAAGCTTTCACATGTTGGCTCGTTC-3'

verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit EcoRI und HindIII verdaut und in ein mit EcoRI/HindIII geschnittenes pYX142 (CEN, LEU2) bzw. pYX232 (2 μ , TRP1) Plasmid (Novagen) kloniert.

d) Klonierung His-DDP1/His-DDP1^{C66W}: Die kodierende Sequenz wurde mittels PCR wie in a) beschrieben amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit BamHI und HindIII geschnitten und in den BamHI/HindIII geschnittenen pQE40-Vektor (Qiagen) kloniert.

e) Klonierung von Tim13-GST: Zur Konstruktion des chimären Tim13-GST Proteins wurde die kodierende Tim13 Sequenz in einer PCR-Reaktion mit folgenden Primern amplifiziert

Primer	Sequenz
Tim13-F (EcoRI)	5'-CCCGAATTCATGGAAGGGCGGCTTCGG-3'
Tim13-R (SmaI -stop)	5'-GGGCCCGGGACATGTTGGCTCGTTCCTCCGC-3'

Das resultierende PCR-Fragment wurden mit EcoRI und SmaI verdaut und in einen EcoRI/SmaI geschnittenen pQE13-Tim23 (1-101)-GST Vektor (Bauer et al., 1996) kloniert.

2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Alle Proben wurden mit je 1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrats (Biorad) versetzt und für 5 - 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch das Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration (Proteinstandard, IgG aus Rind, Biorad).

2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei dem verwendeten Elektrophoresesystem (Mini-Protean II/III; BioRad) hatte das Sammelgel die Abmessung 1 x 7.2 x 0.75 cm und das Trenngel 7 x 7.3 x 0.75 cm. Um unterschiedliche Trenneigenschaften zu erhalten wurden verschiedene Konzentrationen von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid verwendet:

Trenngel	10 - 17.5% (w/v) Acrylamid, 0.08% - 0.3% (w/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.05%(v/v) TEMED
Sammelgel	5%(w/v) Acrylamid, 0.033%(w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1%(v/v) SDS, 0.05%(w/v) APS, 0.1%(v/v) TEMED

Die Proben wurden in 1x Laemmli-Puffer [60 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0.02% Bromphenolblau] (Lämmli, 1970) gelöst und 3 - 10 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer [50 mM Tris/HCl pH 8.3, 384 mM Glycin, 0.1%(w/v) SDS] bei 25 mA pro Gel. Als Größenstandard wurden verschiedene Proteinmarker (PMWM, Fermentas; HMW, Boehringer) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

2.2.3. Blaue Nativgelelektrophorese

Die blaue Nativgelelektrophorese erfolgte nach der von Schägger beschriebenen Methode (Schägger, 1991) und diente der Analyse von Proteinkomplexen in ihrem nativen Zustand. Der zugegebene Farbstoff Serva Blau G vermittelt den Proteinkomplexen eine negative Nettoladung, wodurch eine Auftrennung im elektrischem Feld stattfinden kann. Bei dem verwendeten Elektrophoresesystem hatte das Sammelgel die Abmessung 1 x 15 x 0.8 cm und das Trenngel 9 x 15 x 0.8 cm.

Bodengel	20%(w/v) Acrylamid, 0.13%(w/v) Bisacrylamid, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7.0), 0.05%(w/v) APS, 0.025%(v/v) TEMED
Trenngel	linearer Gradient von 6 - 16.5% Acrylamid, 0.15 - 0.3%(w/v) Bisacrylamid, 10% (w/v) Glycerin, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure 50 mM Bistris/HCl (pH 7.0), 0.04%(w/v) APS, 0.04(v/v) TEMED
Sammelgel	3.8%(w/v) Acrylamid, 0.12%(w/v) Bisacrylamid, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7.0), 0.08%(w/v) APS, 0.08%(v/v) TEMED
Kathodenpuffer A	50 mM Tricine, 15 mM Bistris, 0.02% Serva Blau G, pH 7.0
Kathodenpuffer B	50 mM Tricine, 15 mM, pH 7.0
Anodenpuffer	50 mM Bistris/HCl pH 7.0

Isolierte Mitochondrien (50 - 200 µg Protein pro Gelspur) wurden in 50 µl Digitonin-Puffer [0.2% - 1.0% (w/v) Digitonin, 1x PBS, 10% (w/v) Glycerin, 1 mM PMSF] oder 50 µl Triton-Puffer (wie Digitonin-Puffer nur mit 0.2% - 1.0% (w/v) Triton X-100 statt Digitonin) für 30 min auf Eis solubilisiert. Durch Zentrifugation (20 min, 30000 UpM TLA-100.4 Rotor, Beckman, 4°C) wurde nicht solubilisiertes Material abgetrennt, dem Überstand 5 µl Probenpuffer (5 % Serva Blau G, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 0.1 M Bistris/HCl, pH 7.0) zugegeben und auf das Nativgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei konstant 100 V und 4°C durchgeführt. Nachdem die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf konstant 500 V bei maximal 15 mA erhöht. Nach ungefähr dem ersten Drittel des Gellaufs wurde der Kathodenpuffer A gegen den farblosen Kathodenpuffer B ersetzt. Im Anschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in SDS-Blotpuffer geschüttelt und die Proteine durch Western-Blotting auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Als Größenstandards wurden Alkoholdehydrogenase (150 kDa) aus *S.cerevisiae*, Rinderserumalbumin (66 kDa), Carbonanhydrase aus Rindererythrozyten (29.5 kDa) und Cytochrom c aus Pferdeherz (14 kDa) in getrennten Markerspuren aufgetragen.

2.2.4. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in 50 -100 ml Färbelösung [30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.1% (m/v) Coomassie Brilliant Blau R-250] eingelegt und bei RT für 1-2 h geschüttelt. Daraufhin wurde das Gel in 50 - 100 ml Entfärber [30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure] für 30 min geschwenkt und gegebenenfalls der Entfärber erneuert.

2.2.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese nach der "Semi-dry"-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Khyse-Anderson, 1984; Towbin et al., 1979). Dazu wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulose-Membran (Porengröße: 0.2 µm) zwischen in Blotpuffer [20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0.08% SDS] getränkten Whatman-3MM Filterpapieren gelegt und diese zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet. Der Transfer erfolgte entsprechend des erwarteten Proteingewichts für 30 min - 1,5 h bei 1 mA/cm². Durch Anfärben mit Ponceau S Reagenz konnten im Anschluss die transferierten Proteine auf der Nitrozellulose-Membran sichtbar gemacht werden.

2.2.6. Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie/Densitometrie und durch Phosphorimaging

Nach Transferierung von radioaktiv markierten Proteinen auf Nitrozellulose, wurden die Membranen getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie). Auf dem Film erkennbare Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners eingelesen und ihre Intensität mit Hilfe eines Auswertungsprogramms (AIDA, Raytest) bestimmt (Densitometrie). Alternativ wurden die Nitrozellulose-Membranen direkt auf Phosphorimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Proteinbanden durch einen Phosphorimager (FLA 2000, Fuji) bestimmt.

2.2.7. *In vitro* Synthese von mitochondrialen Vorstufenproteinen

Zur *in vitro* Synthese von [³⁵S]Methionin-markierten Proteinen wurde das entsprechende Gen in den pGEM4-Vektor (Promega) kloniert. Die kodierende Sequenz des jeweiligen Vorstufenproteins steht dabei unter der Kontrolle des SP6-Promotors. Für die gekoppelte Transkription/Translationsreaktion wurde das Retikulozytenlysate (Promega) aus Kaninchen verwendet. Für einen Ansatz wurde 1 - 2 µg DNA, 2 µl TnT[®]-Puffer, 1 µl Aminosäure-Mix

ohne Methionin, 1 µl RNasin (Roche), 25 µl TnT[®] Kaninchen Retikulozytenlysat, 2 µl [³⁵S]-Methionin (ICN), 1 µl SP6-RNA Polymerase zusammen mit Nuklease freiem Wasser auf 50 µl eingestellt, gemischt und bei 30°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM Methionin gestoppt. Zur Abtrennung unspezifisch aggregierter Proteine wurde das Lysat zentrifugiert (20 min, 30000 UpM, TLA100.4-Rotor, Beckman, 4°C) und der Überstand bei -80°C weggefroren.

2.2.8. Reinigung rekombinant exprimierter Proteine aus *E.coli*

a) Induktion der Proteinexpression in *E.coli*

Rekombinante Proteine, die N-terminal entweder an das Maltosebindungsprotein (MBP), an das Pentahistidinpeptid (His₅) oder C-terminal an die Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert waren, wurden unter der Kontrolle des lac-Promoters im *E.coli* -Stamm XL1-Blue exprimiert. Jeweils ein positiver Klon wurde über Nacht in einer 5 ml Vorkultur bei 37°C in LB-Amp-Medium kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Amp-Medium auf eine OD_{598nm} 0.1 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{598nm} von 0.4 hochgezogen. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-1-Thio-β-Galaktopyranosid (IPTG) induziert und die Zellen in der Regel 2 h - 4 h bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall). Für Zinkbindungsexperimente erfolgte die Induktion der Zellen in Gegenwart von 1 mM Zink-Acetat (ZnAc₂) für 4 - 16 h bei 30°C.

b) Reinigung von Pentahistidinpeptid-Fusionsproteinen aus *E.coli*

Für die Herstellung eines Proteins mit einem N-terminalen Pentahistidin-Peptid ("His₅-Tag"), wurde das entsprechende Gen in den Expressionsvektor pQE40 (Qiagen) kloniert. Durch die Ausnutzung entsprechender Restriktionsschnittstellen des Vektors wurde N-terminal an das zu exprimierende Protein ein Pentahistidin-Peptid fusioniert. Die endständigen Histidinreste erlauben die Reinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriacetic-Agarose (Ni-NTA)-Agarose (Qiagen). Dabei bindet das Pentahistidin-Peptid des Fusionsproteins an immobilisierte Nickel-Ionen. Die Elution erfolgt über Zugabe von Imidazol, wodurch das Fusionsprotein aus der Bindung mit den Nickel-Ionen verdrängt wird. Die Fusionsproteine (His₅-DDP1, His₅-DDP1^{C66W}) wurden wie beschrieben als lösliche Proteine in *E.coli* exprimiert. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer (1 x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 10 mM Imidazol) aufgenommen und zum Zellaufschluss Lysozym (100 µg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen durch wiederholtes Beschallen (Branson Sonifier, Stufe 3, 80% Leistung, 5 x 30 sec Pulse)

aufgeschlossen. Nach Abtrennung nicht-aufgeschlossener Zellen und unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (15 min, 15000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C) wurde der Überstand auf eine zuvor mit 5 Säulenvolumina Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben (Flussrate: 0.2 ml/min, 1.5 ml Gelbett, Ni-NTA-Agarose, Qiagen). Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumina Waschpuffer (1 x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 20 - 50 mM Imidazol) gewaschen und anschließend das gebundene Protein durch Zugabe von 300 mM Imidazol zum Waschpuffer in 1 ml-Fractionen von der Säule eluiert. Protein-enhaltende Fractionen wurden vereinigt und über eine Ionenaustauscher Säule entsalzt (PD10, Amersham Pharmacia). Proteinhaltige Fractionen wurden wiederum vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt und mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassi-Färbung analysiert.

c) Reinigung von MBP-Fusionsproteinen über Amylose-Resin

Zur Herstellung von Proteinen, die N-terminal an das Maltosebindungsprotein (MBP) fusioniert waren, wurde das entsprechende Gen in den pMal-cRI-Vektor (New England Biolabs) kloniert und nach Transformation in *E.coli* -Zellen (XL1-Blue) exprimiert. Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM ZnAc₂) aufgenommen, 100 μ g/ml Lysozym zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte wie beschrieben durch Beschallung mit Ultraschall. Nach Abtrennung nicht aufgeschlossener Zellen und unlöslicher Bestandteile, wurde der Überstand entweder 1 h mit 40 mM N-ethylmaleimide (NEM) inkubiert oder direkt zur Affinitätsreinigung auf eine zuvor mit Lysis-Puffer äquilibrierte Amylosesäule (Flussrate: 0.2 ml/min, 1.5 ml Gelbett, Amylose Resin, New England Biolabs) aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit 20 Säulenvolumina Waschpuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen und das Protein im Anschluss durch Zugabe von 10 mM Maltose zum Waschpuffer eluiert. Die Eluate wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassi-Färbung analysiert. Protein enthaltende Fractionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration sowie der Zinkgehalt bestimmt.

2.2.9. Nachweis der Interaktion rekombinant in *E.coli* exprimierter Proteine in zwei aufeinanderfolgenden Anreicherungs-schritten:

In der ersten Anreicherung (Reinigungsschritt 1) wurde das Protein1 aus löslichem *E.coli*-Zell-extrakt über ein N-terminal fusioniertes Pentahistidinpeptid (His₅-Protein1) mittels Affinitätschromatographie an eine mit Nickel-Nitrilotriacetic-Agarose gefüllte Säule (Ni-NTA-Säule) gebunden. Unspezifisch assoziierte Proteine wurden durch wiederholtes

Waschen von der Säulenmatrix entfernt. Das Protein2 wurde parallel mit einer C-terminalen Fusion der Glutathion-S-Transferase (GST) ebenfalls in *E.coli* exprimiert (Protein2-GST). Nach Aufschluss der *E.coli*-Zellen wurde der lösliche Zellextrakt mit dem Protein2-GST auf die Ni-NTA Säule mit vorgebundenem His₅-Protein1 gegeben und unter ständigem Mischen in Ni^{2+} inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Auf der Ni-NTA Säule verblieben das gebundene His₅-Protein1 und das interagierende Protein2-GST. Durch steigende Konzentrationen an Imidazol (20 mM - 300 mM) wurde das His₅-Protein1 mit dem interagierenden Protein2-GST von der Ni-NTA-Säule eluiert. Um eine unspezifische Bindung von Protein2-GST an Ni-NTA-Agarose auszuschließen wurden in einem zweiten Anreicherungsschritt (Reinigungsschritt 2) die Elutionsfraktionen der Ni-NTA Säule mit reduzierter Glutathion-Sepharose versetzt und in Ni^{2+} rotierend inkubiert. Protein2-GST wurde dabei an das immobilisierte Glutathion gebunden. Über die Interaktion mit Protein2-GST verblieb auch His₅-Protein1 an der Glutathion-Sepharose. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert, gewaschen und assoziierte Proteine durch Aufkochen in 1 x Laemmli-Puffer eluiert. Das Eluat wurde zweigeteilt. Eine Hälfte diente zur Ermittlung der Stöchiometrie der interagierenden Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau die andere Hälfte wurde zur immunologischen Detektion der interagierenden Proteine durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting untersucht.

2.2.10. Bestimmung des Zinkgehalts rekombinant gereinigter Proteine

Zur Bestimmung des Zinkgehalts wurden über Amylose-Resin aufgereinigte MBP-Fusionsproteine (MBP-DDP1, MBP-DDP1^{C66W}, MBP-Tim13, MBP-Iac α) mit Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM β -Mercaptoethanol) auf eine Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und der Zinkgehalt durch induktiv gekoppelte Plasma Atomemission Spektroskopie (ICP) bei einer zinkspezifischen Absorption von 213.857 nm (Varian-Vista Simultan Spektrometer) gemessen.

2.2.11. TCA-Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen erfolgte unter Zugabe von 12% (w/v) Tri-Chlor-Essigsäure (TCA). Die Lösung wurde in den gefrorenen Zustand überführt, wieder aufgetaut und die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (20 min, 14000 UpM Tischzentrifuge, 4°C) gefällt. Das Pellet zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen, 2 min bei 56°C getrocknet und in 1x Laemmli-Puffer gelöst.

2.2.12. Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch Gelfiltration

Zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von DDP1 und Tim13 wurden isolierte Mitochondrien (0.5 - 1 mg Protein) in 500 µl Tritonpuffer [1x PBS, 0.1% - 1.0% (w/v) Triton X-100, 1 mM PMSF] solubilisiert (30 min, auf Eis). Nicht solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation (20 min, 30000 UpM, TLA-100.4 Rotor, Beckman, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 60 ml Laufpuffer [1x PBS, 0.01 % (w/v) Triton X-100] äquilibrierte Superose-12-Gelfiltrationssäule (25 ml Säulenvolumen, Pharmacia) oder Superdex-75-Gelfiltrationssäule (20 ml Säulenvolumen, Pharmacia) aufgetragen. Die Flussrate betrug 0.2 ml/min. Es wurden Fraktionen zu 0.5 ml gesammelt. Nach TCA-Fällung wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE und anschließendem Western-Blotting analysiert. Die Eichung der Gelfiltrationssäule wurde mit Markerproteinen bekannter Größe vorgenommen: Rinderthyroglobulin (669 kDa), β-Amylase aus der Süß-Kartoffel (200 kDa), Alkoholdehydrogenase aus *S.cerevisiae* (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Carbonanhydrase aus Rindererythrozyten (29.5 kDa) und Cytochrom c aus Pferdeherz (14 kDa).

2.3. Immunologische Methoden

2.3.1. Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Zur Herstellung epitopspezifischer Antikörper wurden entweder chemisch synthetisierte Oligopeptide (Neosystem S.A.) oder rekombinant exprimierte Proteine als Antigene verwendet. Die Peptide wurden zunächst an ein aktiviertes Trägerprotein (Maleimid aktiviertes Ovalalbumin, Pierce) gebunden und Konjugat-Fractionen zu 100 - 200 µg Protein gesammelt. Rekombinante Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels Ponceau S Reagenz sichtbar gemacht. Die entsprechende Proteinbande wurde ausgeschnitten und in DMSO gelöst (50 µg - 200 µg Protein/Injektion). Für jede Injektion wurden 200 µl der Antigenlösung (Peptid-Konjugat; rekombinantes Protein) mit 200 µl Immunstimulans (für die Erstinjektion TiterMax™, CytRX, Norcross, USA), für Folgeinjektionen Freund's inkomplettes Adjuvans, Behringwerke, Marburg) gemischt. Die homogen vermischte Antigen-Lösung wurde dem Kaninchen subkutan injiziert. Nach der Erstinjektion wurde die Folgeinjektion nach 2 Wochen durchgeführt. Im Anschluss erfolgten die Injektionen alle 4 - 6 Wochen. 10 - 12 Tage nach der Immunisierung wurde dem Kaninchen 20 -30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Zur vollständigen Blutgerinnung wurde das Blut ca. 4 h im Kühlschrank (8°C) aufbewahrt.

Anschließend wurden partikuläre Bestandteile durch zwei Zentrifugationsschritte (5 min, 2500 UpM, Hettich, RT, danach 15 min 8000 UpM, Hettich, RT) aus dem Serum sedimentiert. Das Serum wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Aufreinigung von Antikörpern, die gegen ein Peptid gerichtet waren, wurde dieses über einen endständigen Cysteinrest an Sulfolink-Sepharose (Pierce) gekoppelt, eine Säule damit beladen und das Serum auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde gewaschen und die Antikörper in 2 Schritten durch Zugabe von 0.1 M Citrat (pH 4.0) und anschließend 0.1 M Glycin (pH 2.5) eluiert. Im Fall der Aufreinigung von Antikörpern gegen ein rekombinantes Protein wurde BrCN-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) als Kopplungsmatrix verwendet.

Als Antigene dienten synthetische Peptide, die in ihrer Sequenz den C-Termini bzw. den N-Termini der vorhergesagten Proteine entsprachen.

Antikörper	Peptidsequenz
DDP1-C	CKSKPVFSESLSD
DDP2-C	CSRFAQIVQKGGQ
DDP1-N	CMAELGEADEAEL
Tim13-C	CYNSRLQRERANM
Tim9-C	CLAAKAGLLGQPR
Tim10a-C	CLMKRVQSSGPA
Tim10b-C	CAAEPGVSPSGS

Im Fall von DDP2 wurden auch das Fusionsprotein MBP-DDP2 als Antigen verwendet.

Zur Bestimmung der immunologischen Reaktivität der affinitätsgereinigten Antikörper wurden Verdünnungsreihen von rekombinant in *E.coli* exprimierten menschlichen Tim-Proteinen auf SDS-Gele aufgetragen, geblottet, und die Proteine durch Immundekoration mit den spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für alle Antikörper, mit Ausnahme von α DDP2, lag die untere Detektionsgrenze bei einer Antigen-Konzentration von ca. 0.5 ng rekombinantem Protein. Die Detektionsgrenze von α DDP2 lag bei ca. 500 ng Protein.

2.3.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Nach dem Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde zur Immundetektion spezifischer Proteine diese mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Alle Inkubationen wurden unter Schütteln oder Rollen bei Raumtemperatur ggf. über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zu Beginn wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch 30 min Inkubation mit 5% (w/v)

Magermilchpulver in Tween-TBS (TTBS) [10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20, Sigma-Aldrich] abgesättigt. Einzelne Proteine wurden anschließend durch Inkubation (1 h - 24 h) mit spezifischen Antiseren oder gereinigten Antikörpern immundekoriert. Die Konzentrationen variierten je nach Titer zwischen 1:50 bis 1:1000 (Ak/Milch-TTBS). Die Membran wurde anschließend 3 mal für 10 min mit Tween-TBS gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein gegen Kaninchen- oder Maus-Immunglobulin G gerichteter Antikörper aus Ziege verwendet, an den die Meerettich-Peroxidase gekoppelt war (Dako, Dänemark). Der zweite Antikörper wurde 1:1000 bis 1:5000 in Milchpulver/Tween-TBS verdünnt und 1 h - 3 h mit der Membran inkubiert. Es folgte die Wiederholung der Waschschrte. Die gebundene Peroxidase wurde mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham Pharmacia) durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm Super RX) nachgewiesen.

2.3.3. Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden mit Hilfe von Protein-A-Sepharose-Partikeln (PAS-Beads, Pharmacia) durchgeführt, die eine hohe Affinität für Immunglobuline der Klasse G besitzen und sich leicht durch kurze Zentrifugation sedimentieren lassen.

a) Kopplung der Antikörper an Protein-A-Sepharose

Zunächst wurden die entsprechenden Antikörper an die PAS gebunden. 0.5 - 1.0 mg PAS wurden 2x in IP-Puffer [1x PBS pH 7.4, 1 mM PMSF, 10%(w/v) Glycerin] gewaschen und äquilibriert. Nach Zugabe von 20 - 50 µl affinitätsgereinigtem Antikörper bzw. 30 µl Präimmenserum wurde das Volumen mit IP-Puffer auf 500 µl eingestellt und die Antikörper an die PAS-Partikel gebunden (3 h, ÜK-Rotor, 4°C). Durch 2 Waschschrte mit Solubilisierungspuffer [0.2% - 0.5% (w/v) Digitonin, ggf. 0.2% - 0.5% (w/v) Triton X-100, 1x PBS pH 7.4, 10%(w/v) Glycerin, 1 mM PMSF] wurden nicht gebundene Antikörper entfernt.

b) Koimmunfällung aus Mitochondrien

Um die physikalische Interaktion von Proteinen nachzuweisen wurde die Methodik der Koimmunfällung angewandt. Dabei lassen sich Proteine innerhalb eines Proteinkomplexes mit gegen den potenziellen Komplexpartner gerichteten Antikörper präzipitieren. Mitochondrien (0.5 - 1 mg Protein) wurden in Solubilisierungspuffer für 30 min auf Eis lysiert und zur Abtrennung des solubilisierten Materials zentrifugiert (20 min, 30000 UpM, TLA-100.4 Rotor Beckman, 4°C). 10% vom Überstand und vom in 1x Laemmli-Puffer gelöstem Pellet wurden zur Überprüfung der Solubilisierungseffizienz zusammen mit den

immungefällten Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Der verbleibende Überstand (100 µl - 300 µl Probe) wurde zusammen mit den an Protein-A-Sepharose gebundenen Antikörpern in einem Volumen von 500 µl Solubilisierungspuffer inkubiert (2 – 16 h, ÜK-Rotor, 4°C). Im Anschluss wurden die PAS-Partikel sedimentiert und 2 mal mit Solubilisierungspuffer (ohne Detergenz) gewaschen. Das Partikel-Pellet wurde zur Elution der gebundenen Proteine in 30 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, für 5 - 10 min bei 95°C inkubiert, abzentrifugiert (30 sec, 13000 UpM) und die eluierten Proteine durch SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit Immundekoration analysiert. Der verbleibende Überstand nach der Zentrifugation der PAS-Partikel wurde durch Zugabe von 12% TCA gefällt und die präzipitierten Proteine ebenfalls durch SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung von Mitochondrien aus *S.cerevisiae*

Mitochondrien aus Hefezellen wurden nach der Methode von Daum (Daum et al., 1982) isoliert. Dazu wurden Hefezellen in Flüssigmedium kultiviert und bei einer OD_{598nm} von 1 - 1.5 durch Zentrifugation (5 min, 4000 UpM, SLA3000 Rotor, Sorvall, RT) pelletiert. Das Zellsediment wurde mit ddH₂O gewaschen, das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und anschließend die Zellen in DTT-Puffer (10 mM DTT, 0.1 M Tris/HCl pH 7.5) mit einer Konzentration von 0.5 g/ml resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, anschließend zentrifugiert und mit 1.2 M Sorbitol gewaschen. Die Zellwand wurde durch Resuspension der Zellen in Zymolyase-Puffer (1.2 M Sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH 7.5, 6 mg Zymolyase/g Feuchtgewicht) bei 30°C unter Schütteln enzymatisch abgebaut (Bildung von Sphäroblasten). Die Sphäroblastenbildung wurde durch osmotische Lyse getestet. Die Inkubation wurde beendet, wenn die OD_{598nm} einer 1:40 Verdünnung der Zellen in Wasser im Vergleich zu einer entsprechenden Verdünnung in 1.2 M Sorbitol noch 10% - 20% betrug. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 2500 UpM, SLA3000-Rotor, Sorvall, 4°C) sedimentiert und in kalten Homogenisierungspuffer [0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.2% BSA (w/v), 1 mM PMSF] aufgenommen (0,15 g/ml). Anschließend erfolgte der Zellaufschluss auf Eis im Dounce-Homogenisator (2 x 10 Stöße, 1 Verdünnungsschritt). Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (5 min, 2500 UpM, SLA3000-Rotor, Sorvall, 4°C) abgetrennt. Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand sedimentiert (12 min, 12000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml HS-

Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7.5) gelöst und die Mitochondrien in einem weiteren "low-speed" Zentrifugationsschritt (5 min, 4000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C) angereichert. Mittels einer zweiten "high-speed" Zentrifugation (12 min, 12000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C) wurden die Mitochondrien pelletiert und in HS-Puffer aufgenommen. Nach der Proteinbestimmung wurden die Mitochondrien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2. Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe bzw. menschlichen Zellen

Die Präparation von Mitochondrien aus menschlichen Zellen bzw. menschlichem oder tierischem Gewebe erfolgte durch differentielle Zentrifugation und anschließende Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugation (Rossmanith et al., 1995). Entnommenes Gewebe (Muskel, Leber, Herz, Hirn) wurde mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebestücke wurden für 10 min in 10 ml/g RSB-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 1,5 mM CaCl₂) zum Quellen der Zellen inkubiert. Anschließend wurde das Gewebematerial mit einem Volumen 2x MS-Puffer (420 mM Mannitol, 140 mM Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA) versetzt und in einem Glas-Teflon Homogenisator zerkleinert. Durch dreimaliges Zentrifugieren des Homogenats (10 min, 4000 UpM SS34-Rotor, Sorvall, 4°C) wurden Zellkerne und Zellreste sedimentiert. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 12000 UpM, SS34-Rotor, Sorvall, 4°C) pelletiert.

Die durch differentielle Zentrifugation angereicherten Mitochondrien wurden in einem kleinen Volumen M1-Puffer (0,6 M Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) gelöst und auf einen 2-Stufen-Sucrosegradienten in einem Ultrazentrifugations-Gefäß (12 ml) geschichtet. Die untere Lösung (USL) des Stufen-Gradienten enthielt 1.5 M Sucrose in (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA), die obere Lösung enthielt 1 M Sucrose im gleichen Puffer. Im Anschluss erfolgte die Ultrazentrifugation (20 min, 70000xg, L8-60M-Rotor, Beckman, 4°C). Nach der Zentrifugation hatten sich intakte Mitochondrien an der Interphase des Stufen-Gradienten angesammelt. Noch vorhandene Kerne wurden pelletiert und nicht intakte Mitochondrien schwammen am oberen Rand des Zentrifugen-Röhrchens. Die intakten Mitochondrien wurden von der Interphase abgesaugt, mit einem Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) versetzt, durch Zentrifugation (15 min, 13000 UpM Tischzentrifuge, 4°C) konzentriert und bei -80°C eingefroren.

2.4.3. Subfraktionierung von Säugerzellen

Menschliche Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen und zur Sedimentation der Zellkerne bei 750g zentrifugiert. Der verbleibende postnukleäre Überstand wurde durch Differential-Zentrifugation (10 min, 10000 UpM, SS34, Sorvall, 4°C) in eine mitochondriale Fraktion (Pellet) und postmitochondrialen Überstand fraktioniert. Die Mitochondrien wurden über Saccharosedichte-Zentrifugation weiter gereinigt (Rossmanith et al., 1995). Aus dem postmitochondrialen Überstand wurde durch eine Ultrazentrifugation mit (30 min, 100000xg, L8-60M-Rotor, Beckman, 4°C) Zytoplasma (Überstand) und Mikrosomen (Pellet) getrennt.

2.4.4. Import *in vitro* synthetisierter Vorstufenproteine in isolierte Mitochondrien

Für den Import in isolierte Mitochondrien wurden mit [³⁵S]Methionin radioaktiv markierte Vorstufenproteine verwendet. Ein Standard-Importansatz enthielt 100 µg Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (0,6 M Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH pH 7.4, 80 mM KCl, 10 mM MgAc₂, 2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA), 2.5 mM ATP und 5 mM NADH (als Elektronendonator der Atmungskette). Zur Aufhebung des Membranpotentials wurden die Mitochondrien ohne ATP und NADH mit dem Ionophor Valinomycin (1 µM) und dem Protonophor Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (2.5 µM) behandelt. Valinomycin erhöht selektiv die Permeabilität der Innenmembran für Kaliumionen. Durch den Ladungsausgleich auf beiden Seiten der Membran wird das Membranpotential zerstört. FCCP funktioniert als Entkoppler. Durch den Transport von Protonen über die Innenmembran wird der elektrochemische Gradient zerstört. Nach Vorinkubation (5 min, 25°C) wurde der Import durch Zugabe von 1 - 5% Retikulozyten-Lysat gestartet (25°C). Die Importreaktion wurde nach 1 - 30 min durch Überführung der Proben auf Eis gestoppt. Der Importansatz wurde im Anschluss geteilt um die Importeffizienz und die submitochondriale Lokalisation der Proteine zu bestimmen.

2.4.5. Proteasebehandlung von Mitochondrien unter isotonischen und hypotonischen Bedingungen

Um importiertes von unspezifisch an Mitochondrien haftendem Protein zu unterscheiden und damit die Importeffizienz zu bestimmen, wurden die Mitochondrien unter isotonischen Bedingungen (HS-Puffer) mit Proteinase K (30 - 100 µg) oder Trypsin (30 -100 µg) inkubiert (20 min, Eis) und die Reaktion durch Zugabe von 2 mM PMSF bzw. 2 mg/ml Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (STI, Sigma) gestoppt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (7 min, 12000 UpM, Tischzentrifuge, 4°C) pelletiert, gewaschen, in 1x

Laemmli-Puffer gelöst und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und anschließender Autoradiographie analysiert. Als Vergleich wurden 10% - 20% des radioaktiv markierten Vorstufenproteins mit aufgetragen.

Um importiertes Protein submitochondrial zu lokalisieren wurden aus Mitochondrien durch Inkubation in einem hypotonischen Puffer Mitoplasten erzeugt. Durch anschließende Behandlung mit Proteasen (Proteinase K bzw. Trypsin) wurden Proteine des Intermembranraums degradiert während Matrix lokalisierte oder in die Innenmembran inserierte Proteine bzw. Proteindomänen vor einem proteolytischen Abbau geschützt blieben. Ein Aliquot des Importansatzes wurde 1:10 in Schwellpuffer [20 mM HEPES/KOH pH 7.4, ggf. 0.1% (w/v) Digitonin] verdünnt und mit 30 - 100 µg Proteinase K, ggf. 30 - 100 µg Trypsin inkubiert (20 min, Eis). Der proteolytische Verdau wurde durch Zugabe von 2 mM PMSF bzw. 2 mg/ml STI gestoppt und die Proben wie beschrieben behandelt.

2.4.6. Chemische Quervernetzung von mitochondrialen Proteinen

Enge räumliche Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen lassen sich mit Hilfe chemischer Quervernetzer nachweisen, welche eine kovalente Verknüpfung der in Kontakt befindlichen Proteine mediiieren. Voraussetzung hierbei ist die räumliche Nähe funktioneller Gruppen entsprechender Proteine, mit denen der Quervernetzer kovalente Bindungen eingehen kann. Für die Quervernetzung mitochondrialer Proteine wurde MBS (m-Maleimidbenzyl-N-Hydroxysuccinimidester, Pierce) verwendet. MBS ist membrangängig und verknüpft Proteine über eine freie Aminogruppe eines Lysinrestes mit der freien Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes.

Nach dem Import radioaktiv markierter Vorstufenproteine wurden die Mitochondrien sedimentiert und in HS-Puffer zu einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml resuspendiert. Die Proben wurden 20 min auf Eis mit 100 µM MBS (gelöst in DMSO) inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit reinem DMSO. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 mM Tris/HCl pH8.0 gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und mit HS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Mitochondrien entweder in 1x Laemmli-Puffer gelöst und durch SDS-PAGE analysiert oder solubilisiert und zur Immunfällung eingesetzt.

2.5. Methoden der Hefegenetik

2.5.1. Verwendete Hefestämme

Hefestamm	Synonym	Genotyp	Referenz
MB2	WT	MATa/ α ADE2/ade2-101 ^{ochre} his3/his3- Δ 200 leu2/leu2- Δ 1 lys2-801 ^{amber} trp1-289/TRP1 ura3-52/ura3-52	(Maarse et al., 1992)
W334a	WT	MATa pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu2-3, 112 reg1-501 gal1	(Hovland et al., 1989)
MB2 Δ Tim8/ Δ Tim13	Δ 8/ Δ 13	MB2 tim8::URA3 tim13::HIS3	(Paschen et al., 2000)
MB2 Δ Tim8/ Δ Tim13 DDP1/Tim13	Δ 8/ Δ 13+DDP1/Tim13	MB2 tim8::URA3 tim13::HIS3 + Plasmid DDP1 pYX232(TRP) +Plasmid Tim13 pYX142(LEU)	(Rothbauer et al., 2001)
MB2 Δ Tim8/ Δ Tim13 DDP1 ^{C66W} /Tim13	Δ 8/ Δ 13+DDP1 ^{C66W} /Tim13	MB2 tim8::URA3 tim13::HIS3 + Plasmid DDP1 ^{C66W} pYX232(TRP) +Plasmid Tim13 pYX142(LEU)	(Hofmann et al., 2002)

Tab.3: verwendete Hefestämme

2.5.2. Kultivierung von *S.cerevisiae*

Wildtyp-Hefezellen wurden in YPD- oder Laktatmedium kultiviert. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurden SC-Agarplatten oder SD-Laktatmedium verwendet, die den Selektionsbedingungen entsprechend mit Markersubstanzen supplementiert waren. Die Standardtemperatur für die Kultivierung von Hefezellen war 30°C. Flüssigkulturen wurden in sterilem Erlmayer-Kolben unter Schütteln (120 - 160 UpM, Unitron, Infors) inkubiert.

Als Dauerkulturen wurden die Hefestämme in 15% (v/v) Glycerinlösung bei -80°C gelagert. Ausgehend von einer Stammkultur wurde diese auf entsprechende Agarplatten (YPD- oder Selektivmedium) ausgestrichen. Aus einer Einzelkolonie wurde eine 20 ml Vorkultur (Selektivmedium) angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Für die Isolierung von

Mitochondrien wurde diese Vorkultur mehrmals mit frischem Medium auf eine OD_{598nm} von 0,1-0,15 verdünnt. Die Hauptkultur wurde auf 0,1 - 0,2 OD_{598nm} angeimpft und entsprechend der Verdopplungszeit des Hefestammes bei 30°C geschüttelt bis die Kultur zum Zeitpunkt der Ernte eine OD₅₉₈ von 1.0 – 1.5 hatte.

verwendete Hefemedien:

SD-Laktat-Medium:	0,67% Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), 0,5% Ammoniumsulfat, 2% Laktat, pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen.
YPD-Medium:	1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton, Nach Autoklavieren Zugabe von 2% Glukose
YPG-Medium	1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton, Nach Autoklavieren: Zugabe von 3%(v/v) Glycerin
SC-Medium	0,67% Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), 2% Glukose, 0,2% Mix aus essentiellen Aminosäuren (Drop-out Mix)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien jeweils 2% Bacto-Agar zugesetzt. Alle verwendeten Medien, Aminosäure- (10 g/l) sowie Uracil- und Adenin-Lösungen (2 g/l) wurden mit Ausnahme der Tryptophan-Lösung autoklaviert. Die Tryptophan-Lösung wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt gelagert.

2.5.3. Bestimmung des Wachstumsphänotyps von *S.cerevisiae* ("Tüpfeltest")

Das Wachstum von Hefe wurde unter unterschiedlichen Bedingungen hinsichtlich der Kohlenstoffquelle und der Temperatur untersucht. Die Aktivität der Atmungskette lässt sich durch Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie z.B. Glycerin oder Ethanol überprüfen. Eine eingeschränkte respiratorische Aktivität führt im Gegensatz zur fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose zu einem verminderten Wachstum auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Die Bestimmung des Wachstumsphänotyps bezüglich der Kohlenstoffquelle wurde auf Agarplatten, die entweder Glycerin (YPG) oder Glukose (YPD) als Kohlenstoffquelle enthielten, überprüft. Dazu wurden Hefestämme auf YPD-Platten ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Hefezellen wurden von der Platte mit einem sterilem Spatel in 1 ml Wasser (steril) überführt und die OD_{598nm} bestimmt. Es wurde eine Zellsuspension von OD_{598nm} 1 in 100µl Wasser (steril) hergestellt und daraus eine Verdünnungsreihe angesetzt. Pro Verdünnung wurden 2µl auf eine YPD- und auf eine YPG-Platte aufgetragen. Zur Bestimmung des Temperaturabhängigen Phänotyps wurden die Platten bei verschiedenen Temperaturen (15°C, 25°C, 30°C, 37°C) für 2 - 5 Tage inkubiert.

2.5.4. Transformation von *S.cerevisiae*

Zur Transformation von *S.cerevisiae* wurde die modifizierte Lithiumacetat-Methode (Gietz et al., 1992) angewendet. Dabei wurden 25 µl einer Hefekolonie von einer entsprechenden Agarplatte mit einem sterilem Spatel in 1 ml Wasser überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 sec, Tischzentrifuge) sedimentiert, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und für 5 min bei 30°C inkubiert. 500 µl der Suspension wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch eine weitere Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde mit 240 µl Transformationspuffer [50% (w/v) PEG-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 10 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), 64 µl ddH₂O] und 5 µl Plasmid-DNA (0,1 - 5 µg) versetzt und gemischt (1 min, Vortex, Janke & Kunkel). Der Transformationsansatz wurde für 20 min bei 42°C inkubiert und die Zellen anschließend sedimentiert (10 sec, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde durch vorsichtiges Pipettieren in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert.

2.6. Chemikalien und Geräte

2.6.1 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

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

Dako, Hamburg: Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelte Anti-Maus IgG (aus Ziege)

DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Pepton, Hefeextrakt, "Yeast Nitrogen Base" (ohne Aminosäuren).

GIBCO-BRL, Karlsruhe: T4-DNA-Ligase, Restriktionsenzyme

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat XR

Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide

Nestlé-Alete, München: Magermilchpulver

New England Biolabs, Schwalbach: Amylose-Resin, pMal-cRI-Vektor

Pierce, Rochester, USA: MBS

Promega, Heidelberg: pGEM-Vektoren

Qiagen, Hilden: Mini-, Midipräp-Kit

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

Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Serva Blau G, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, TEMED

Sigma, München: Ammoniumperoxodisulfat (APS), Aminosäuren, BSA (fettsäurefrei), Cytochrom *c*, Glycerin, Lachsspermien-DNS, β -Mercaptoethanol, Oligomycin, PMSF, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A, Proteinase K, DTT, RNase A, Nukleotide

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

2.6.2. Laborgeräte und sonstige Materialien

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevamatc 60

Beckman Instruments, München: Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100A, einschließlich der Rotoren und Zentrifugenröhrchen

BioRad, München: Mini-Protean II und III, Semi-Dry Blotkammern

Branson, Heusenstamm: Ultraschallgerät Sonifier 250

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifugen (kühlbar), Reaktionsgefäße

Heraeus, Osterode: Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge

Hettich, München: Zentrifuge Rotixa KS

Perkin Elmer, Überlingen: PCR-Maschine

Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-240 und UV-120-02

Sigma, München: Tisch-Kühlzentrifugen

Kendro, Langenselbold: Zentrifugen Sorvall RC5B-Plus und Rotoren

Unitron, Zürich, Schweiz: Schüttelinkubatoren

Varian, Paolo Alto, USA: ICP-AE Spektrometer Varian Vista

3. ERGEBNISSE

3.1. DDP1 ist Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie

Das krankheitsassoziierte DDP1 ist das menschliche Homolog des γ Tim8-Proteins, ein nicht-essentielles kleines Tim-Protein der Hefe. Die kleinen Tim-Proteine der Hefe sind strukturell verwandte lösliche Proteine des mitochondrialen Intermembranraum die am Import kernkodierter Vorstufen in die mitochondriale Innenmembran beteiligt sind. Durch umfangreiche Homologie-Suchen in EST- ("expressed sequence tags") Datenbanken konnten mehr als fünfzig neue kodierende Sequenzen in verschiedensten eukaryontischen Organismen identifiziert werden, deren Produkte Homologie zu den bekannten kleinen Tim-Proteinen der Hefe zeigen (Bauer et al., 2000; Bauer et al., 1999b). Homologe dieser kleinen Tim-Proteine scheinen somit in allen eukaryontischen Organismen exprimiert zu sein. Alle vorhergesagten kleinen Tim-Proteine besitzen molekulare Massen von in etwa 10 kDa und enthalten ein sogenanntes Cys₄-Motiv mit der charakteristischen Konsensus-Signatur Cys-X₃-Cys-X₁₄₋₁₇-Cys-X₃-Cys. Keines enthält eine offensichtliche, typische mitochondriale "Targeting"-Sequenz.

Aminosäuresequenz-Vergleiche gruppieren die potentiellen Proteine in zwei evolutionär konservierte Hauptgruppen: Homologe der nicht-essentiellen Hefe-Komponenten γ Tim8 und γ Tim13 fallen in die erste Hauptgruppe; die Homologe der essentiellen Komponenten γ Tim9, γ Tim10 und γ Tim12 fallen in eine zweite Hauptgruppe. Die Mitglieder dieser Hauptgruppen unterscheiden sich in der Sequenz und Zahl der Aminosäuren zwischen den beiden konservierten Cystein-Paaren.

Im Gegensatz zu niederen Eukaryonten sind in Säugern zwei Tim8- und zwei Tim10-Homologe exprimiert. So wurde neben DDP1 ein zweites Tim8-Homolog identifiziert, welches als DDP2 bezeichnet wurde. Die Aminosäuresequenzen von DDP1 und DDP2 sind zu 56 % homolog; nur DDP1 wurde bisher mit einer menschlichen Erkrankung assoziiert. Die beiden menschlichen Homologe des Hefe-Tim10 wurden Tim10a und Tim10b genannt; sie zeigen untereinander nur eine Ähnlichkeit von 41 %. Ein Tim12-Protein konnte bisher ausschließlich in *S.cerevisiae* identifiziert werden. Im Menschen sind somit sechs Mitglieder dieser Familie exprimiert: DDP1, DDP2, Tim13, Tim9, Tim10a und Tim10b (Abb.3).

```

DDP1   MDSSSSSSAAGLG--AVDP-QLQHFIEVETQKQRFQQLVHQMTTEL-----
DDP2   -----MAELG--EADEAELQRLVAAEQKAQFTAQVHHFMEL-----
Tim13  MDSGFGSDFGGTGGGKLDPGAIMEQVKVQIAVANAQELLQRMTDK-----
Tim9   -----MAA-QIPESDQIK-QFKEFLGTYNKLTET-----
Tim10a -----MDP-LRAQQLAAELEVEMMADMYNRMTSA-----
Tim10b -----MER-QQQQQQLR-NLRDFLLVYNRMTEL-----
                .                               ::: .

DDP1   -----CWEKC-MDK--PGPKLDSRAEA-CFVNC-----
DDP2   -----CWDKC-VEK--PGNRLDSRTEN-CLSSC-----
Tim13  -----CFRKC-IGK--PGGSLDNSEQK-CIAMC-----
Tim9   -----CFLDC-VKD-FTTREVKPEETT-CSEHC-----
Tim10a -----CHRKC-VPPHYKEAELSKGESV-CLDRC-----
Tim10b -----CFQRC-VPS-LHHRALDAEEEA-CLHSC-----
                * * :           :. * *

DDP1   VERFIDTSQFILNRLEQTQ--KSKPVFSESLSD-----
DDP2   VDRFIDTTLAITSRFAQIV--QKGGQ-----
Tim13  MDRYMDAWNTVSRAYNSRL--QRERANM-----
Tim9   LQKYLKMTQRISMRFQYH-IQQNEALAAKAGLLGQPR-----
Tim10a VSKYLDIHERMGKKLTELS--MQDEELMKRVQQSSGPA-----
Tim10b AGKLIHSNHRLMAAYVQLMPALVQRRRIADYEAAASAVPGVAEQPGVSPSGS
                :... : .

```

Abb.3: Aminosäure-Sequenzen der menschlichen kleinen Tim-Proteine.

Das Alignment der Aminosäuresequenzen zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der menschlichen Tim-Proteine untereinander. Die vier konservierten Cysteinreste innerhalb der Konsensus-Sequenz Cys-X₃-Cys-X₁₄₋₁₇-Cys-X₃-Cys sind grau unterlegt; funktionell identische Aminosäuren sind durch einen Doppelpunkt, ähnliche Aminosäuren durch einen Punkt gekennzeichnet. Alignment wurde erstellt mit Hilfe von Megalign (DNA-Star).

Alle menschlichen Homologe wurden im Rahmen von Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe kloniert und chromosomal lokalisiert (siehe Tabelle 4) (Bauer et al., 2000; Bauer et al., 1999b). Bis auf das X-chromosomal lokalisierte *DDP1*-Gen kartieren die Gene aller anderen

kleinen Tim-Proteine auf Autosomen. Darüber hinaus zeigen Expressionsanalysen, dass sämtliche kleinen Tim-Proteine ubiquitär in allen untersuchten menschlichen Geweben exprimiert werden. Insbesondere scheint es sich bei DDP1 und DDP2, sowie bei Tim10a und Tim10b nicht um gewebsspezifisch exprimierte Isoformen zu handeln.

Menschl. Protein	<i>S.cerevisiae</i> Homolog	Transkriptlänge	Proteingröße	chromosomale Lokalisation	Accession-Nummer	Referenz
Tim8a/DDP1	Tim8	1,169bp	97aa	Xq22.1	U66035	(Jin et al., 1996)
Tim8b/DDP2	Tim8	423bp	83aa	11q22.1q22.2	AF150087	(Bauer et al., 1999b)
Tim9	Tim9	1,027bp	89aa	14q21	AF150100	(Bauer et al., 1999b)
Tim10a	Tim10	658bp	90aa	11p11-p12	AF150089	(Bauer et al., 1999b)
Tim10b	Tim10 Tim12	1,469bp	103aa	11p15.3-p15.5	AF150105	(Bauer et al., 1999b)
Tim13	Tim13	763bp	95aa	19p13.1-19p13.3	AF144700	(Bauer et al., 1999b)

Tab. 4: Die menschlichen Mitglieder der kleinen Tim-Proteine

3.2. DDP1 und Tim13 sind lösliche Proteine im mitochondrialen Intermembranraum des Menschen

Die vorangegangenen Untersuchungen auf mRNA- und genomischer Ebene gaben keine Auskunft darüber, ob die identifizierten menschlichen Sequenzen auf Proteinebene exprimiert werden und tatsächlich für mitochondrial lokalisierte Komponenten kodieren. Immunfluoreszenz-Analysen an *DDP1*-transfizierten COS-7-Zellen und *in vitro*-Importstudien in Mitochondrien ließen allerdings vermuten, dass zumindest das *DDP1*-Gen für ein authentisches und mitochondrial lokalisiertes Protein kodiert (Koehler et al., 1999a). Der Nachweis von endogenem DDP1 konnte zu Beginn der Untersuchungen noch nicht geführt werden.

Für Untersuchungen auf Protein-Ebene wurden daher spezifische Peptid-Antikörper gegen DDP1 und Tim13, sowie gegen die Tim9, Tim10a und Tim10b generiert. Die entnommenen Antiseren waren in der Lage, die entsprechenden rekombinant exprimierten menschlichen Antigene spezifisch zu erkennen (ohne Abbildung). Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation der kleinen Tim-Proteine in menschlichen Zellen wurden HeLa-Zellfraktionen (Zytosol, mikrosomale Fraktion und angereicherte Mitochondrien) mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Als Kontrolle dienten Antikörper gegen bekannte Proteine der

verschiedenen subzellulären Fraktionen: Argininosuccinat-Lyase (Zytosol), Grp78 (Mikrosomen) und Tim23 (Mitochondrien).



Abb.4: Subzelluläre Lokalisation der menschlichen Tim-Proteine

HeLa-Zellhomogenat wurde durch Differentialzentrifugation in verschiedene Fraktionen getrennt. Gleiche Proteinmengen der zytosolischen, mikrosomalen und mitochondrialen Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen DDP1, Tim13, Tim9, Tim10a und Tim10b immundekoriert.

Als Kontrolle für die Reinheit der einzelnen subzellulären Fraktionen wurden Antikörper gegen die zytosolische Argininosuccinat-Lyase (ASL), das mikrosomale Grp78/BIP-Protein und gegen das mitochondriale Tim23-Protein eingesetzt

Antikörper gegen DDP1 und Tim13 erkannten jeweils spezifische Proteinbanden auf Höhe der berechneten Molekulargewichte von 11 bzw. 10.4 kDa (Abb.4). Beide Proteine kolokalisierten mit dem Markerprotein Tim23 in der mitochondrialen Fraktion; in anderen subzellulären Fraktionen waren keine spezifischen Signale nachzuweisen. Die Signale konnten auch nach Behandlung der gereinigten Mitochondrien mit Proteinase K detektiert werden (ohne Abbildung).

Die intramitochondriale Lokalisation wurde durch selektive Öffnung der Außenmembran und Freisetzung löslicher Intermembranraumkomponenten menschlicher Mitochondrien durch Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen des Detergenz Digitonin durchgeführt. Bei einer Digitonin-Konzentration von 0.1% verblieben sowohl das integrale Innenmembranprotein Tim23 als auch das Matrixprotein Tim44 im Pellet, während DDP1 und Tim13 in den löslichen Überstand freigesetzt wurden (Abb.5A und 5B). Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass DDP1 und Tim13 als lösliche Proteine im Intermembranraum menschlicher Mitochondrien lokalisiert sind.

Die Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen die weiteren kleinen Tim-Proteine ergab ebenfalls ausschließlich spezifische Signale in der mitochondrialen Fraktion (Abb.4). Bei Tim9, Tim10a und Tim10b handelt es sich somit auch um authentische mitochondriale Proteine. Die Immundekoration mit N- und C-terminalen Antikörpern gegen DDP2 ergab

kein spezifisches Signal, weder in den verschiedenen subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen, noch in verschiedenen untersuchten Zell- und Gewebsextrakten der Maus (ohne Abbildung). Bisher ist nicht geklärt, ob DDP2 in menschlichen Geweben tatsächlich als Protein exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich um eine gewebsspezifische Isoform oder um ein transkribiertes Pseudogen.

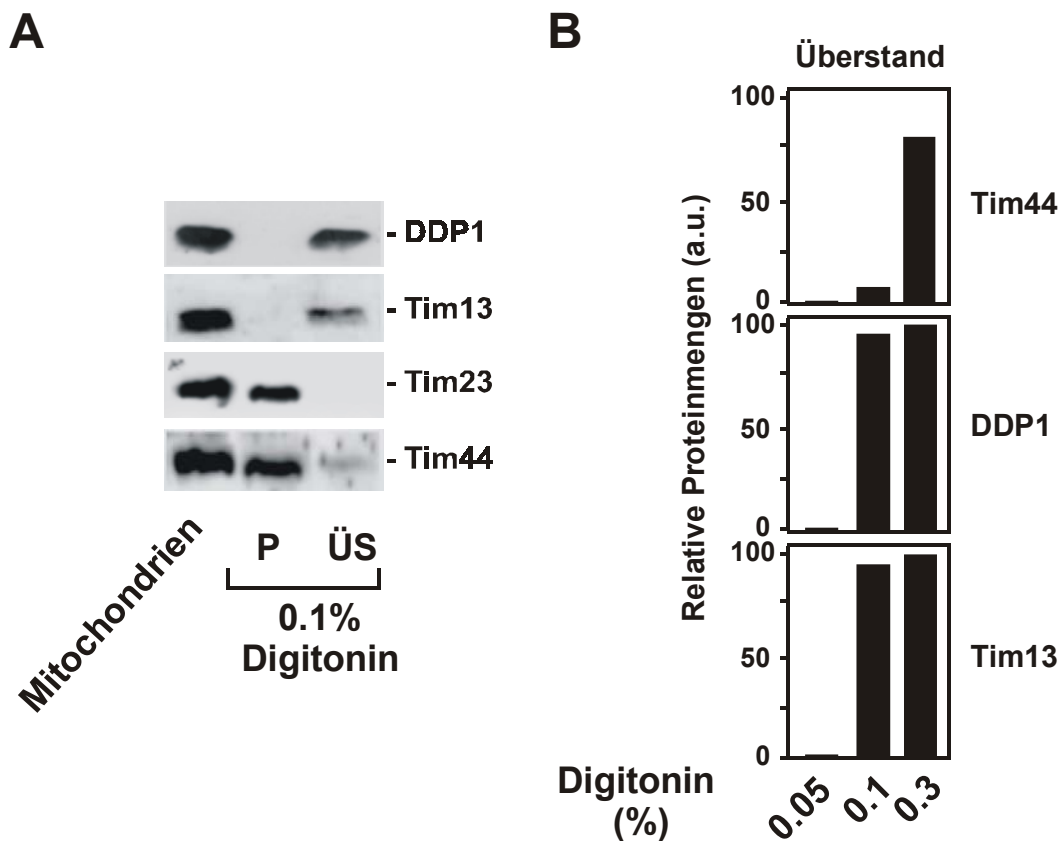


Abb.5 (A) Submitochondriale Lokalisierung von DDP1 und Tim13

Zur selektiven Öffnung der Außenmembran wurden isolierte Mitochondrien aus HeLa-Zellen mit 0.1% (w/v) Digitonin solubilisiert und die Membranen anschließend durch Zentrifugation reisoliert. Gleiche Proteinmengen des entstandenen Pellets und des löslichen Überstands wurden durch SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 analysiert. Als Kontrolle dienten Antikörper gegen das Innenmembranprotein Tim23 und das Matrixprotein Tim44.

(B) Selektive Öffnung der Außenmembran durch aufsteigende Detergenz-Konzentrationen

Aus HeLa-Zellen isolierte Mitochondrien wurden zur selektiven Öffnung der Außenmembran mit aufsteigenden Konzentrationen von Digitonin inkubiert. Die durch Solubilisierung freigesetzten Proteine wurden durch Zentrifugation in den Überstand überführt, mit Trichloressigsäure (TCA) versetzt und gefällt. Die Präzipitate und die Pelletfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen Tim44, DDP1 und Tim13 analysiert. Die in den Überstand freigesetzten Proteinmengen wurden densitometrisch quantifiziert.

3.3. Strukturelle Organisation von DDP1 und Tim13 im mitochondrialen Intermembranraum von Säugerzellen

3.3.1. DDP1 und Tim13 assemblieren zu höhermolekularen Komplexen

Um einen Hinweis auf die Organisation und die Struktur der menschlichen Tim-Proteine DDP1 und Tim13 im Intermembranraum von Mitochondrien zu erhalten, wurde die molekulare Masse der Proteine unter nativen Bedingungen mittels Gelfiltration analysiert. Dazu wurden aus HeLa-Zellen isolierte Mitochondrien solubilisiert und der lösliche Proteinüberstand über eine Superose 12-Säule fraktioniert.

Die Immunoblotanalyse der Fraktionen zeigte, dass DDP1 und Tim13 in den gleichen Fraktionen von der Superose 12-Säule eluierten (Abb.6). Die Elutionsspitze korreliert für beide Proteine mit einer estimierten molekularen Masse von 70 - 80 kDa. Weder DDP1 noch Tim13 konnte in Fraktionen, entsprechend zu höheren molekularen Massen detektiert werden, ebenso eluierte keines der beiden Proteine in Fraktionen, die der molekularen Masse eines Monomers entsprechen. Dies lässt vermuten, dass sowohl DDP1 als auch Tim13 in Mitochondrien ausschließlich in höhermolekularen Komplexen von ca. 70 - 80 kDa organisiert sind.

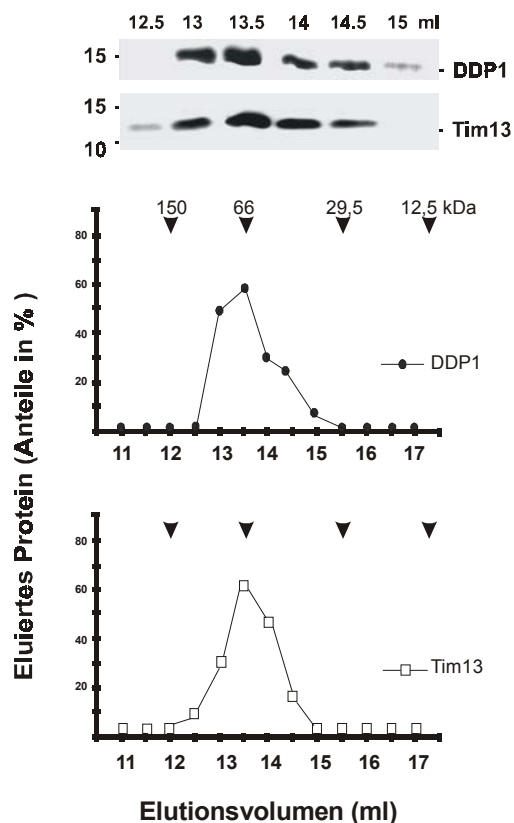


Abb.6 Molekulare Massenbestimmung von DDP1 und Tim13 unter nativen Bedingungen

500 µg Mitochondrien aus HeLa-Zellen wurden für 30 min auf Eis solubilisiert (0.5% Triton X-100). Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Superose 12-Säule aufgetragen. Fraktionen zu 0.5 ml wurden gesammelt, unter Zugabe von Trichloroessigsäure (TCA) gefällt und mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 analysiert.

Die eluierten Proteinmengen wurden durch Densitometrie quantifiziert. Das Elutions-Maximum korrespondiert zu einer molekularen Masse von 70 - 80 kDa.

Ein zweiter Ansatz zur Analyse höhermolekularer Proteinkomplexe, an denen DDP1 und Tim13 beteiligt sind, war die native Blaugelelektrophorese:

Solubilisierte Mitochondrien wurden auf ein "blaues" Nativgel aufgetragen und mittels Westernblot analysiert. Die Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 zeigte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa (Abb.7). Mit Antikörpern gegen Tim13 war ebenfalls ein deutliches Signal auf gleicher Höhe nachweisbar. Wie zuvor bei der Gelfiltrationsanalyse konnten auch in diesem Ansatz keine höher- oder niedermolekularen Komplexe von DDP1 und Tim13 detektiert werden.

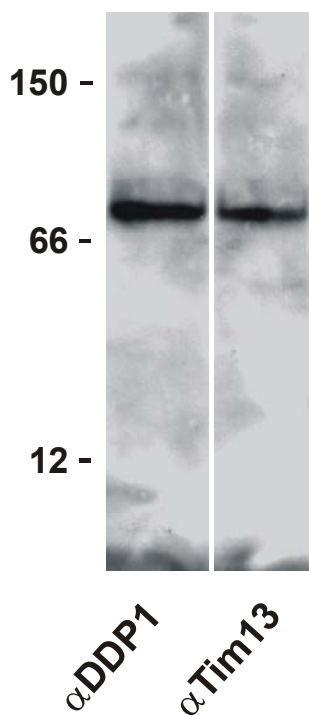


Abb.7

Blaue Nativ-Gelelektrophorese

100 µg Mitochondrien aus HeLa-Zellen wurden für 30 min auf Eis solubilisiert (0.5% Digitonin) und die im Überstand nach einer Zentrifugation enthaltene Proteine auf einem blauen Nativgel (6 - 16.5% Polyacrylamidkonzentration) separiert. Nach Transfer auf Nitrozellulose erfolgte die Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13. Als Markerproteine wurden Alkoholdehydrogenase aus *S.cerevisiae* (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Cytochrom *c* (12.5 kDa) auf das blaue Nativgel aufgetragen. Sowohl DDP1 als auch Tim13 sind nach Immundekoration als Banden mit einer molekularen Masse von ca. 70 kDa erkennbar

Beide Ansätze zur Analyse der nativen molekularen Masse bestätigen, dass DDP1 und Tim13 spezifisch zu höhermolekularen Komplexen mit einer estimierten molekularen Masse von ca. 70 kDa assemblieren. Welche Proteine an der Komplexbildung beteiligt sind, ist noch unklar. Aufgrund der in etwa gleichen molekularen Masse von DDP1 und Tim13 wurde spekuliert, dass im Falle einer homo-oligomeren oder hetero-oligomeren Zusammensetzung unter Beteiligung von DDP1 und Tim13 ein Komplex aus etwa sechs bis sieben Untereinheiten aufgebaut sein könnte.

3.3.2. DDP1 und Tim13 interagieren im Intermembranraum menschlicher

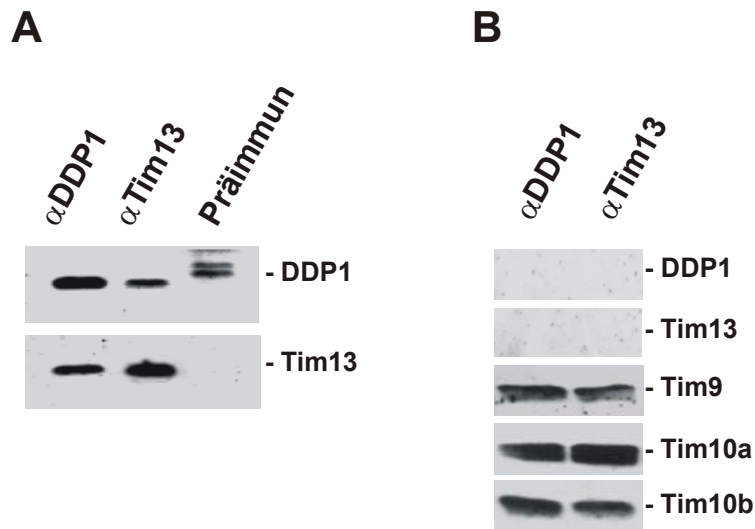
Mitochondrien

DDP1 und Tim13 scheinen in Komplexen mit gleicher oder fast gleicher molekularer Masse enthalten zu sein. Es lag deshalb nahe zu fragen: Sind beide Proteine zusammen in einem gemeinsamen hetero-oligomeren Komplex organisiert, möglicherweise unter Beteiligung weiterer kleiner Tim-Proteine oder bilden DDP1 und Tim13 jeweils homo-oligomere Komplexe gleicher Größe?

Um dies zu klären, sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine physikalisch interagieren. Dazu wurden Mitochondrien aus HeLa-Zellen solubilisiert und aus dem löslichen Proteinüberstand mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 gefällt.

DDP1 wurde sowohl mit Antikörpern gegen DDP1 als auch mit Antikörpern gegen Tim13 präzipitiert (Abb.8A). Tim13 konnte ebenfalls mit Antikörpern gegen Tim13 wie auch mit Antikörpern gegen DDP1 gefällt werden. Weder DDP1 noch Tim13 waren im Überstand nach der Fällung nachweisbar (Abb.8B). Offensichtlich werden sowohl DDP1 als auch Tim13 durch Antikörper gegen das jeweils andere Protein quantitativ gefällt. Dies legt nahe, dass sich beide Komponenten in physikalischer Wechselwirkung befinden. Die gegenseitige quantitative Fällung aus solubilisierten Mitochondrien deutet darauf hin, dass beide Proteine in ihrer Gesamtheit miteinander interagieren. Darüber hinaus scheinen beide Proteine in ungefähr gleichen Mengen in Mitochondrien vorhanden zu sein.

Um zu untersuchen, ob DDP1 und Tim13 im Intermembranraum mit weiteren Mitgliedern der menschlichen kleinen Tim-Familie, Tim9, Tim10a oder Tim10b interagieren, wurden nach der Fällung mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 sowohl die Präzipitate, als auch die Überstände immunologisch mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b analysiert. Tim9, Tim10a und Tim10b waren nach der Immunfällung mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 ausschließlich im Überstand nachweisbar (Abb.8B). Darüber hinaus konnten weder DDP1 noch Tim13 nach Fällung mit Antikörpern gegen Tim9, Tim10a und Tim10b im Präzipitat nachgewiesen werden. Beide Proteine verblieben im Überstand (ohne Abbildung). Offensichtlich interagieren weder DDP1 noch Tim13 mit einem der anderen kleinen Tim-Proteine des Intermembranraumes.

**Abb.8****(A) Koimmunpräzipitation von DDP1 und Tim13 aus HeLa-Mitochondrien**

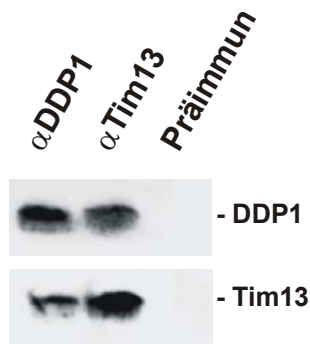
500 μ g Mitochondrien aus HeLa-Zellen wurden für 30 min auf Eis solubilisiert (0.5% Digitonin). Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden eluiert und durch SDS-PAGE mit anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

(B) Analyse von nicht-präzipitierten Proteinen

Proteine im Überstand nach der Immunfällung mit DDP1- bzw. Tim13-Antikörpern wurden TCA gefällt und die Proben durch SDS-PAGE und anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1, Tim13, Tim9, Tim10a und Tim10b untersucht.

Die Zusammensetzung der Komplexe wurde zusätzlich in den Fraktionen der Superose 12-Säule, in denen DDP1 und Tim13 koeluierten, untersucht (siehe Abb.6). Bei direkter Präzipitation von DDP1 und Tim13 aus der 70 kDa-Fraktion wurden in etwa gleiche Mengen des jeweiligen Partnerproteins detektiert (Abb.9). Eine geringfügig reduzierte Menge an nachgewiesenem Tim13-Protein nach Fällung mit Antikörpern gegen DDP1 ist möglicherweise auf die Dissoziation des Komplexes während der einzelnen Waschschriffe zurückzuführen. Die Immunoblotanalyse des Überstandes nach der Koimmunfällung ergab in keinem Fall ein DDP1- oder Tim13- spezifisches Signal (ohne Abbildung).

Die vollständige wechselseitige Fällbarkeit unterstützt die Modellvorstellung, dass DDP1 und Tim13 in einem hetero-oligomeren Komplex im mitochondrialen Intermembranraum organisiert sind.

**Abb.9****Koimmunpräzipitation von DDP1 und Tim13 aus Elutionsfraktionen der Gelfiltration**

Aus der 70 kDa-Elutionsfraktion einer Gelfiltration wurde mit PAS-gekoppelten Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

Zusammenfassend zeigen die Analysen der nativen Molekulargewichte und die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen, dass DDP1 und Tim13 in menschlichen Mitochondrien spezifisch zu einem hetero-oligomeren Komplex mit einer nativen molekularen Masse von ca. 70 kDa assemblieren. Offensichtlich sind an diesem Komplex keine der anderen kleinen menschlichen Tim-Proteine beteiligt. Sowohl die vollständige gegenseitige Präzipitation aus solubilisierten Mitochondrien, als auch die Fällung gleicher Proteinmengen aus der 70 kDa Elutionsfraktion deuten auf eine 1:1 Stöchiometrie von DDP1 und Tim13 in Mitochondrien hin. Die native Komplexgröße von 70 kDa, die quantitative Präzipitation und der Nachweis äquimolarer Proteinmengen lassen vermuten, dass DDP1 und Tim13 unter Beteiligung in etwa gleicher Mengen in einem hetero-hexameren Komplex organisiert sind. Es lässt sich daher über ein Komplex-Modell, bestehend aus drei Molekülen DDP1 und drei Molekülen Tim13 spekulieren ($DDP1_3/Tim13_3$).

3.3.3. DDP1 und Tim13 besitzen unterschiedliche Resistenzen gegen proteolytischen**Abbau**

Nach der Aufklärung der Zusammensetzung des menschlichen DDP1/Tim13-Komplexes sollte die räumliche Anordnung der beteiligten Komponenten innerhalb des Komplexes analysiert werden. Die proteolytische Sensitivität könnte dabei einen Hinweis geben, ob eine der beteiligten Komponenten durch seine Position innerhalb des DDP1/Tim13-Komplexes entweder vor Degradation geschützt oder bevorzugt degradiert wird.

Dazu wurde der DDP1/Tim13-Komplex aus dem Intermembranraum freigesetzt und die Degradation der Einzelkomponenten DDP1 und Tim13 bei Inkubation mit zunehmenden Konzentrationen an Trypsin untersucht. Dabei muss erwähnt werden, dass beide Proteine eine

gleiche Anzahl an Trypsinschnittstellen besitzen, die sich an konservierten Positionen befinden.

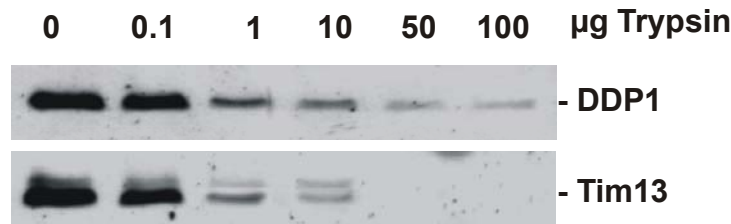


Abb.10 Trypsinbehandlung des DDP1/Tim13-Komplex in Mitochondrien aus Mäuseleber

300 µg Mitochondrien (isoliert aus Mäuseleber) wurden für 30 min auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation, wurde der Überstand entweder unbehandelt gelassen oder mit 0.1, 1, 10, 50 oder 100 µg Trypsin für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden mit TCA versetzt, gefällt und durch SDS-PAGE mit anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

DDP1 und Tim13 zeigten eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Trypsin (Abb.10). Während DDP1 bis zu Konzentrationen von 100 µg Trypsin nachgewiesen werden konnte, war Tim13 bereits ab einer Konzentration von 50 µg Trypsin nicht mehr detektierbar. Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Trypsin deutet darauf hin, dass DDP1 durch seine Position innerhalb des DDP1/Tim13-Komplexes möglicherweise besser vor proteolytischem Abbau geschützt ist.

3.4. Rekonstitution des menschlichen DDP1/Tim13-Komplexes in Hefe

In einem genetischen Ansatz wurde untersucht, ob DDP1 und Tim13 analoge Funktionen wie die Hefeproteine γ Tim8 und γ Tim13 besitzen bzw. es sich möglicherweise um funktionelle Orthologe der Hefekomponenten handelt. Dazu sollte der menschliche DDP1/Tim13-Komplex in der Hefe *S.cerevisiae* rekonstituiert und seine Funktion durch Komplementationsanalysen untersucht werden.

Grundlage bildete ein haploider Hefestamm, dessen Allele für *TIM8* und *TIM13* disruptiert wurden. Die resultierende Hefemutante wurde als $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante ($\Delta 8/\Delta 13$ -Stamm) bezeichnet (Paschen, Diplomarbeit). In *S.cerevisiae* führt der Verlust eines funktionellen γ Tim8/ γ Tim13-Komplex zu einem spezifischen Wachstumsphänotyp. Auf fermentierbarem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle zeigt die $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm einen kältesensitiven Phänotyp in Form von stark reduziertem Wachstum bei 15°C während bei Temperaturen von 25°C, 30°C oder 37°C das Wachstum von Zellen des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes nicht beeinträchtigt ist (Paschen et al., 2000).

3.4.1. DDP1 und Tim13 assemblieren in Mitochondrien der Hefe zu einem hetero-hexameren Komplex

Zunächst sollte geklärt werden, ob die humanen Komponenten DDP1 und Tim13 stabil in *S.cerevisiae* exprimiert werden und im Intermembranraum der Hefe zu einem hetero-oligomeren Komplex assemblieren. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob DDP1 und Tim13 in der Lage sind den Wachstumsphänotyp zu komplementieren.

Zur Expression von DDP1 und Tim13 in Zellen des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes wurden die entsprechenden Gene in Hefe-Expressionsvektoren kloniert und einzeln und gemeinsam exprimiert. Zum Nachweis der mitochondrialen Lokalisation und Komplexgrößen der heterolog exprimierten Komponenten, wurden Mitochondrien des transgenen Hefestammes ($\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13) isoliert und mittels Immunoblot-Analyse, Koimmunpräzipitation und Gelfiltration untersucht.

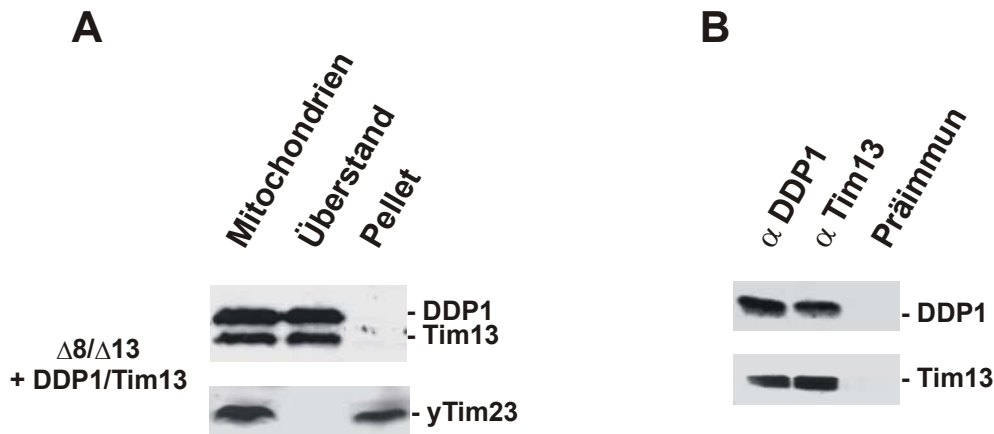


Abb.11

(A) Nachweis von DDP1 und Tim13 im Intermembranraum von Mitochondrien der kotransformierten $\Delta tim8/\Delta tim13$ Doppeldisruptante ($\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13)

Isolierte Mitochondrien (50 μ l, 1 μ g Protein/ μ l) wurden 10-fach mit Schwellpuffer (20 mM HEPES pH 7.5) verdünnt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze zentrifugiert und der Überstand TCA präzipitiert. 50 μ g Mitochondrien, das Pellet der Zentrifugation sowie das TCA-Präzipitat wurden durch SDS-PAGE und Immundeckoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht. Als Kontrolle wurde das Tim23-Protein mit Antikörpern nachgewiesen.

(B) Koimmunpräzipitation von DDP1 und Tim13 aus Mitochondrien des $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Stammes

500 μ g Mitochondrien des $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Stammes wurden für 30 min auf Eis solubilisiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand mit an Protein-A-Sepharose (PAS) gekoppelten Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden eluiert und durch SDS-PAGE mit anschließender Immundeckoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

Zur submitochondrialen Lokalisation wurde die mitochondriale Außenmembran durch osmotisches Schwellen in hypotonem Puffer selektiv geöffnet und die freigesetzten Proteine durch Zentrifugation in den Überstand überführt. Gleiche Mengen an mitochondrialem Protein, löslichem Proteinüberstand und der Pelletfraktion wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 analysiert.

DDP1 und Tim13 konnten ausschließlich in Mitochondrien, im löslichen Überstand nach Schwellen, nicht jedoch in der Pelletfraktion detektiert werden. Das integrale Innenmembranprotein Tim23 verblieb unter diesen Bedingungen im Pellet (Abb.11A). Die Immundekoration der Koimmunpräzipitation aus dem löslichen Proteinüberstand zeigte, dass beide Proteine mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 gefällt wurden (Abb.11B).

Zur Bestimmung der nativen molekularen Masse des DDP1/Tim13-Komplexes in der Hefe wurde der lösliche Proteinüberstand nach osmotischem Schwellen unter Zugabe von 0.5% Triton X-100 über eine Superdex 75-Säule aufgetrennt. DDP1 und Tim13 koeluierten in Fraktionen, die einer molekularen Masse von ca. 70 - 80 kDa entsprachen (Abb.12).

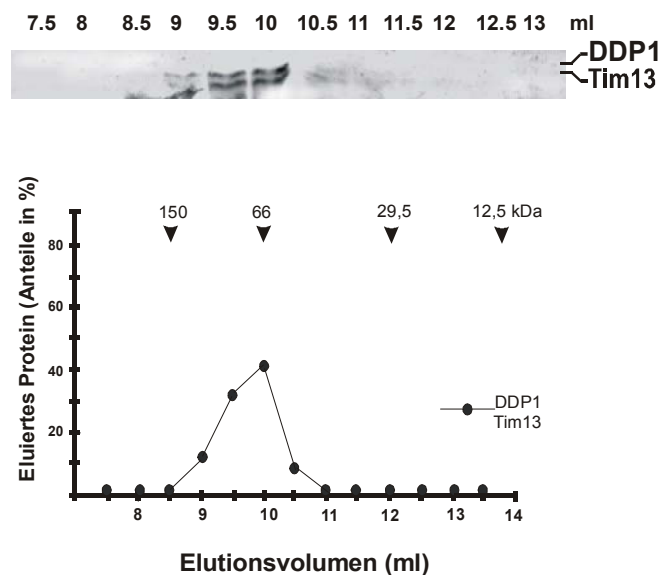


Abb.12

Analyse der nativen Masse von DDP1 und Tim13 im Intermembranraum von $\Delta 8/\Delta 13$ + DDP1/Tim13-Mitochondrien

Elutionsprofil der Gelfiltration

500 μ g Mitochondrien aus $\Delta 8/\Delta 13$ + DDP1/Tim13-Zellen wurden für 30 min auf Eis solubilisiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Superdex75-Säule aufgetragen. Fraktionen zu 0.5 ml wurden gesammelt, mit TCA versetzt, gefällt und mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch im heterologen Expressionssystem der Hefe DDP1 und Tim13, wie es bereits im System der Säugermitochondrien gezeigt wurde, im mitochondrialen Intermembranraum der Hefe lokalisieren, dort miteinander interagieren und zu einem hetero-oligomeren Komplex von ca. 70 kDa assemblieren.

3.4.2. DDP1 und Tim13 sind Orthologe der Hefeproteine yTim8 und yTim13

Nach dem Nachweis der korrekten Lokalisation und Assemblierung von DDP1 und Tim13 im Intermembranraum sollte in der $\Delta 8/\Delta 13$ -Deletionsmutante untersucht werden, ob der menschliche DDP1/Tim13-Komplex in der Lage ist den kältesensitiven Wachstumsphänotyp zu komplementieren und damit die Funktion des yTim8/yTim13-Komplexes zu übernehmen. Dazu wurden gleiche Zellzahlen des $\Delta 8/\Delta 13$ -, des transgenen $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13- und des isogenen Wildtyp-Stammes in Verdünnungsreihen auf Mediumplatten, die Glukose als fermentierbaren Kohlenstoff enthielten, ausgebracht. Die Platten wurden bei Temperaturen 30°C und 15°C über mehrere Tage inkubiert.

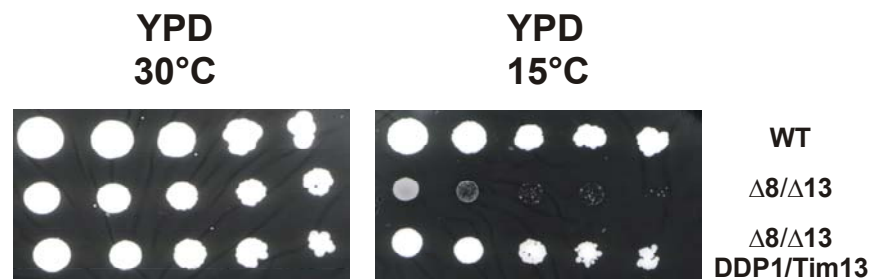


Abb.13: Der menschliche DDP1/Tim13-Komplex ist in der Lage den kältesensitiven Wachstumsphänotyp einer $\Delta tim8/\Delta tim13$ Doppeldisruptante zu komplementieren.

Die DDP1 und Tim13 koexprimierende $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante, die $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante und der isogene Wildtypstamm MB2 wurden bei 30°C in YPD-Medium vorinkubiert. Von den Kulturen ($OD_{598nm} = 1$) wurde eine Verdünnungsreihe in Wasser hergestellt und jeweils 2 μ l von jeder Verdünnung auf YPD-Platten aufgetragen. Die Platten bei 30°C, respektive 15°C inkubiert.

Bei 30°C zeigten alle drei Hefestämme ein vergleichbares Wachstum. Bei 15°C war eine deutliche Reduzierung der Teilungsraten der $\Delta 8/\Delta 13$ -Hefezellen gegenüber Wildtyp-Zellen zu beobachten (kältesensitiver Phänotyp) (Abb.13). $\Delta 8/\Delta 13$ -Hefezellen, die DDP1 und Tim13 enthielten, erreichten dagegen ein mit Wildtypzellen vergleichbares Wachstum bei 15°C. DDP1 und Tim13 sind somit in der Lage, den kältesensitiven Phänotyp des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes zu komplementieren. Unter den untersuchten Bedingungen übernimmt der menschliche DDP1/Tim13-Komplex offensichtlich zumindest teilweise die Funktion der Hefekomponenten yTim8 und yTim13. Bei DDP1 und Tim13 handelt es sich daher vermutlich um Orthologe der Hefeproteine yTim8 und yTim13.

3.5. Molekulare Funktion des humanen DDP1/Tim13-Komplex

Die möglichen Funktionen des γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes der Hefe sind bisher nur teilweise bekannt. Es wird vermutet, dass der γ Tim8/ γ Tim13-Komplex entlang des TIM22-Importweges agiert (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998). Neuere Untersuchungen belegen darüber hinaus die Unterstützung des mitochondrialen Imports von Tim23 in die Innenmembran durch den γ Tim8/ γ Tim13-Komplex. Allerdings scheint der Import des Tim23-Vorstufenproteins nur unter bestimmten energetischen Voraussetzungen, einem verminderten Membranpotential ($-\Delta\psi$), auf die Unterstützung durch den γ Tim8/ γ Tim13-Komplex angewiesen zu sein (Paschen et al., 2000).

Es stellt sich die Frage, ob auch der humane DDP1/Tim13-Komplex den Import von Tim23-Vorstufenproteinen in Mitochondrien unterstützt, und wenn ja unter welchen besonderen energetischen Bedingungen er von Nöten ist. Diese Frage sollte durch vergleichende *in vitro* Importstudien in Mitochondrien des Wildtyp-, des $\Delta 8/\Delta 13$ - und des transgenen $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Hefestammes untersucht werden.

3.5.1. Der menschliche DDP1/Tim13-Komplex komplementiert den Importdefekt der $\Delta tim 8/\Delta tim 13$ -Deletionsmutante

Für den Fall, dass der menschliche DDP1/Tim13-Komplex eine ähnliche molekulare Funktion wie der γ Tim8/ γ Tim13-Komplex besitzt, sollte der Importdefekt des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes durch die Koexpression von DDP1 und Tim13 komplementierbar sein. Um dies zu untersuchen wurde das radioaktiv markierte Tim23-Vorstufenprotein der Hefe (γ Tim23) in An- und Abwesenheit eines Membranpotentials ($+\Delta\psi$ / $-\Delta\psi$) in Mitochondrien des Wildtyp-, des $\Delta 8/\Delta 13$ - und des transgenen $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Stammes importiert und die Importeffizienz analysiert.

In Anwesenheit eines Membranpotentials ($+\Delta\psi$) wurde das γ Tim23-Vorstufenprotein in vergleichbaren Mengen in die Wildtyp- und die $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien importiert (Abb.14A). Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Beobachtungen, wonach der *in vitro* Import des γ Tim23-Vorstufenproteins in Mitochondrien der Hefe bei Anwesenheit eines ausreichend starken Membranpotentials nicht auf die Unterstützung durch den γ Tim8/ γ Tim13-Komplex angewiesen ist. In Abwesenheit eines Membranpotentials ($-\Delta\psi$) war dagegen der Import von γ Tim23 in $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien um ca. 50% reduziert (Abb.14B). Dies verdeutlicht die bereits beschriebene Abhängigkeit der Importeffizienz des γ Tim23-Moleküls von der Anwesenheit eines Membranpotentials. In

Abwesenheit des Membranpotentials verläuft die Insertion des Tim23-Proteins in die Innenmembran, vermittelt durch ein $\Delta\psi$ -abhängiges Importsignal im C-Terminus des Proteins (Kaldi et al., 1998), nur ineffizient und es kommt zur Akkumulation des Vorläuferproteins im Intermembranraum.

Die Untersuchungen zeigten, dass der menschliche Komplex offensichtlich in der Lage ist, die Funktion des γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes zu übernehmen: (1) In Abwesenheit des Membranpotentials wurde der Importdefekt des γ Tim23-Proteins in $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien durch die Expression von DDP1 und Tim13 komplementiert (Abb.14B) und (2) in Anwesenheit von $\Delta\psi$ konnte die Importrate von γ Tim23 sogar um 40% über das Wildtyp-Niveau hinaus gesteigert werden (Abb.14A).

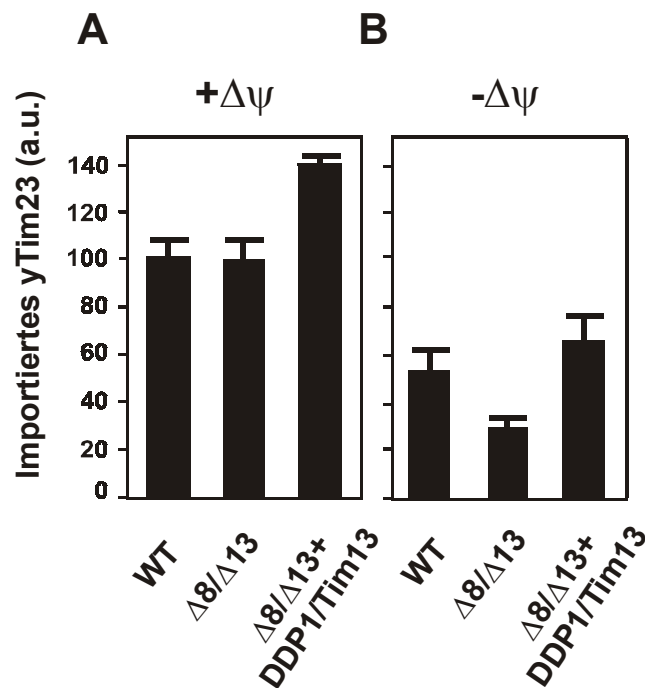


Abb.14: *In vitro* Import des Tim23-Vorstufenproteins der Hefe (γ Tim23) in Mitochondrien des Wildtyp-, $\Delta 8/\Delta 13$ - und $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1/Tim13}$ -Stammes

(A) mit Membranpotential (+ $\Delta\psi$)

180 μ g Mitochondrien, isoliert aus Wildtyp-Hefe (WT), aus der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante ($\Delta 8/\Delta 13$) und der mit DDP1 und Tim13 kotransformierten $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante ($\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1/Tim13}$) wurden zur Energetisierung vor Beginn der Importreaktion für 10 min bei 25°C mit 5 mM NADH inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Import von [35 S]-markierten Vorstufen des Tim23-Proteins. Nicht importiertes Vorstufenprotein wurde durch Proteinase K abgebaut. Die Mitochondrien wurden sedimentiert, gewaschen und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Der Import des γ Tim23-Vorstufenproteins in Wildtyp-Mitochondrien wurde gleich 100% gesetzt.

(B) ohne Membranpotential (- $\Delta\psi$)

Versuchsablauf wie in Abb.14A. Zur Aufhebung des Membranpotentials wurden die Mitochondrien 5 min vor Beginn der Importreaktion mit 1 μ M Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP) und 25 μ M Valinomycin auf Eis inkubiert.

3.5.2. Unterschiedliche energetische Anforderungen des Imports von humanen Tim23-Vorstufenproteinen

Weiterhin sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen der Import des humanen Tim23-Vorstufenproteins (hTim23) von der Unterstützung des γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes bzw. DDP1/Tim13-Komplexes abhängig ist.

Hierzu wurde, wie zuvor, radioaktiv markiertes hTim23-Vorstufenprotein in An- und Abwesenheit eines Membranpotentials in die Mitochondrien der verschiedenen Hefestämme importiert. Es zeigte sich, dass mit hTim23 als Substrat der Importdefekt des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes schon in Anwesenheit eines Membranpotentials manifest wurde: Der Import des hTim23-Vorstufenproteins in $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien war im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien um ca. 50 - 60% reduziert (Abb.15A). Die Expression der menschlichen Komponenten DDP1 und Tim13 konnte die Importdefizienz vollständig komplementieren. Im Gegensatz zum Tim23-Vorstufenprotein der Hefe benötigt das menschliche hTim23-Vorstufenprotein offenbar schon in Anwesenheit eines Membranpotentials die Unterstützung durch einen funktionellen DDP1/Tim13-Komplex.

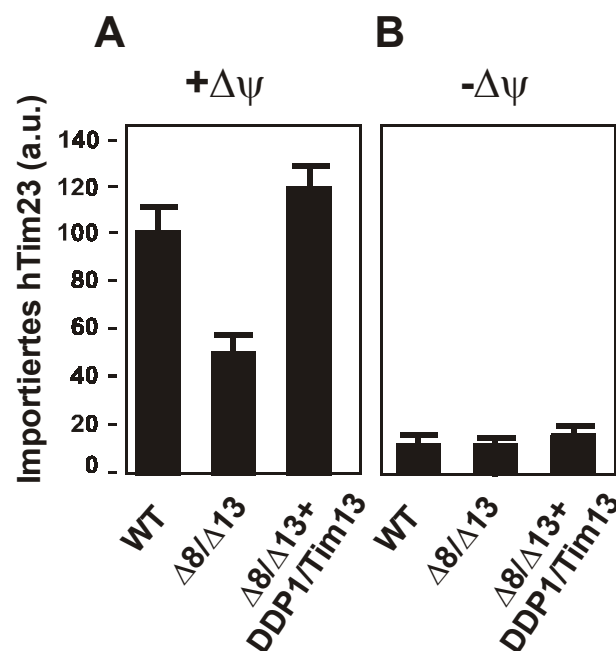


Abb.15: *In vitro* Import des menschlichen Tim23-Vorstufenprotein (hTim23) in Mitochondrien des Wildtyp-, $\Delta 8/\Delta 13$ - und $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1/Tim13}$ -Stammes

(A) mit Membranpotential ($+\Delta\psi$)

Versuchsablauf wie Abb.14A. Zur Importreaktion wurde statt des Tim23-Vorstufenproteins der Hefe das humane Tim23-Vorstufenprotein (hTim23) eingesetzt.

(B) ohne Membranpotential ($-\Delta\psi$)

Versuchsablauf wie in Abb.14B. Zur Importreaktion wurde statt des γ Tim23- das hTim23-Vorstufenprotein eingesetzt.

In Abwesenheit eines Membranpotentials waren in allen drei untersuchten Mitochondrientypen nur noch Hintergrundspuren an importierten hTim23-Protein nachweisbar (Abb.15B). Die Menge des importierten Vorstufenproteins reduzierte sich gegenüber dem Import bei $+\Delta\psi$ in allen Mitochondrientypen um ca. 90%. Diese Beobachtungen zeigen, dass der Import des menschlichen hTim23-Proteins im Gegensatz zum Tim23-Vorstufenprotein der Hefe weitaus stärker von der Energetisierung der Mitochondrien abhängig ist. Unter diesen Bedingungen konnte der DDP1/Tim13-Komplex die Importeffizienz nicht mehr positiv beeinflussen.

Das integrale Innenmembranprotein Tim23 wird über den TIM22-Importweg in die mitochondriale Innenmembran importiert. Über diese Translokase inserieren eine Reihe hydrophober Innenmembranproteine, wie z.B. der ADP/ATP-Carrier. Als Kontrolle, ob der Import des ADP/ATP-Carriers durch die An- bzw. Abwesenheit eines funktionellen γ Tim8/ γ Tim13- bzw. DDP1/Tim13-Komplexes beeinflusst wird, wurde der ADP/ATP-Carrier unter verschiedenen energetischen Voraussetzungen ($+\Delta\psi/-\Delta\psi$) als radioaktiv markiertes Vorstufenprotein in die Mitochondrien der verschiedenen Hefestämme importiert. Die autoradiographische Auswertung zeigte gleiche Importraten des Vorstufenproteins des ADP/ATP-Carriers in Mitochondrien des Wildtypstammes, des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes und des $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Stammes (Abb.16). Offensichtlich beeinflusst der DDP1/Tim13-Komplex in keiner Weise die Importeffizienz des ADP/ATP-Carriers in Mitochondrien.

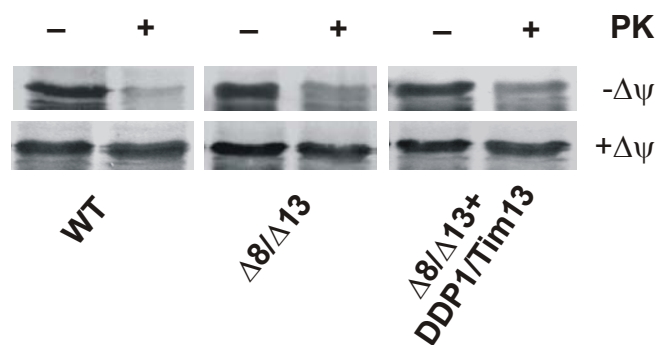


Abb.16:Der *in vitro* Import des ADP/ATP-Carriers wird nicht durch den DDP1/Tim13-Komplex beeinflusst.

Mitochondrien aus WT-, $\Delta 8/\Delta 13$ -, $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13-Hefezellen (jeweils 180 μ g Protein) wurden energetisiert ($+\Delta\psi$) oder das Membranpotential aufgehoben ($-\Delta\psi$). Im Anschluss erfolgte der Import von [35 S]-markierten Vorstufen des ADP/ATP-Carriers. Die Proben wurden entweder unbehandelt gelassen (-PK) oder nicht importiertes Protein durch Zugabe von Proteinase K abgebaut (+PK). Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und die Importeffizienz durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Durch die Importuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der humane DDP1/Tim13-Komplex die Rolle des γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes während des mitochondrialen Imports von Tim23-Vorstufenproteinen übernehmen kann. Im Gegensatz zum Tim23-Protein der Hefe benötigt das humane Tim23-Protein für den effizienten Import in Mitochondrien unter allen energetischen Bedingungen die Anwesenheit eines γ Tim8/ γ Tim13- bzw. DDP1/Tim13-Komplexes. Der Import des humanen Tim23-Proteins benötigt darüber hinaus unter allen Umständen ein ausreichend hohes Membranpotential. Die Beobachtungen zeigten, dass in Abwesenheit von $\Delta\psi$ das humane Tim23-Vorstufenprotein in keine der untersuchten Mitochondrientypen mehr importiert wird.

3.5.3. In Säugermitochondrien interagiert der menschliche DDP1/Tim13-Komplex mit dem Translokationsintermediat des humanen Tim23-Vorstufenproteins

Die Ergebnisse der Importstudien lassen vermuten, dass der DDP1/Tim13-Komplex auch in menschlichen Mitochondrien eine Funktion beim Import des Tim23-Vorstufenproteins besitzt. Es sollte daher die Frage beantwortet werden, ob es im Intermembranraum von Säugermitochondrien tatsächlich zu einer physikalischen Interaktion zwischen dem humanen Tim23-Protein und dem DDP1/Tim13-Komplex kommt.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Importeffizienz des humanen Tim23-Vorstufenproteins von der Anwesenheit eines Membranpotentials analysiert. Hierzu wurde das humane Tim23-Vorstufenprotein in An- bzw. Abwesenheit eines Membranpotentials in isolierte Mitochondrien aus Mäuseleber importiert und die Importeffizienz durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht.

Der Import des humanen Tim23-Proteins in Säugermitochondrien zeigte in ähnlicher Weise wie es zuvor beim Import in Hefemitochondrien beobachtet wurde, eine starke Abhängigkeit von der Anwesenheit eines Membranpotentials (Abb.17A). In Mitochondrien mit fehlendem Membranpotential konnten im Vergleich zu energetisierten Mitochondrien noch ca. 25% - 35% des hTim23-Proteins detektiert werden (Abb.17B). Im Gegensatz zum Import in Hefemitochondrien kommt der Import des hTim23-Vorstufenproteins in Säugermitochondrien nach Aufhebung des Membranpotentials nicht vollständig zum Erliegen. Ein Grund für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass das Membranpotential von Maus-Mitochondrien unter den untersuchten Bedingungen nicht vollständig zerstört, sondern nur stark abgeschwächt wurde.

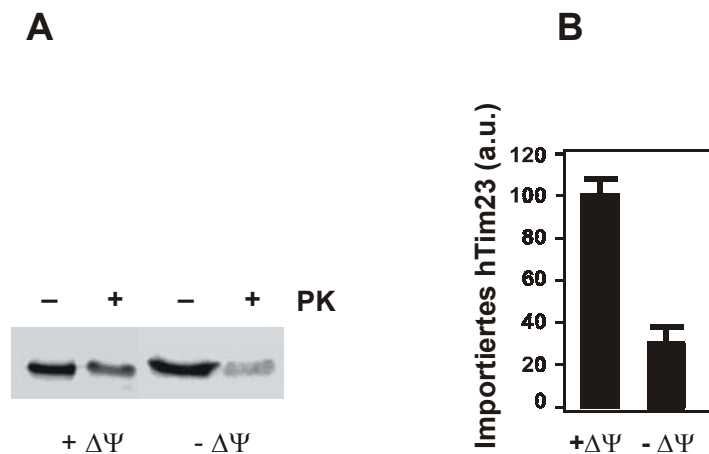


Abb.17: Das humane Tim23-Vorstufenprotein wird in Abhängigkeit vom Membranpotential in Säugermitchondrien importiert.

(A) Import des humanen Tim23-Vorstufenproteins in Anwesenheit (+ $\Delta\psi$) oder Abwesenheit (- $\Delta\psi$) eines Membranpotentials in Mitochondrien aus Mäuseleber. Nach erfolgtem Import wurden die Proben unbehandelt gelassen (-PK) oder nicht importiertes Protein durch Zugabe von Proteinase K abgebaut (+PK). Die Mitochondrien wurden sedimentiert, gewaschen und die Importeffizienz durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

(B) Darstellung der Ergebnisse von fünf Importexperimenten mit Standardabweichung.

Um eine direkte physikalische Interaktion zwischen dem humanen Tim23-Vorstufenprotein und dem DDP1/Tim13-Komplex nachzuweisen, wurde das hTim23-Protein zur Akkumulation im Intermembranraum bei reduziertem Membranpotential in Säugermitchondrien importiert und chemisch quervernetzt. Zur Vernetzungsreaktion wurde der membrangängige chemische Crosslinker m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimid-Ester (MBS) eingesetzt.

Die Quervernetzungsreaktion des im Intermembranraum akkumulierten hTim23 ergab zwei spezifische Addukte mit einem Molekulargewicht von 33 bzw. 35 kDa (Abb.18A). Das entspricht einer Quervernetzung von hTim23 mit je einem Molekül DDP1 bzw. einem Molekül Tim13. In der Probe ohne Crosslinker wurden diese Banden nicht detektiert. Zudem wurden keine Crosslink-Banden mit höherem Molekulargewicht nachgewiesen.

Zum Nachweis, ob diese hTim23-Quervernetzungsprodukte tatsächlich Interaktionen mit DDP1 und Tim13 darstellen, wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 durchgeführt. Dazu wurde humanes Tim23-Vorstufenprotein bei reduziertem Membranpotential in Säugermitchondrien importiert, wechselwirkende Proteine mit MBS kovalent quervernetzt und die isolierten Mitochondrien solubilisiert. Aus dem löslichen Proteinüberstand wurde mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 immungefällt und die präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

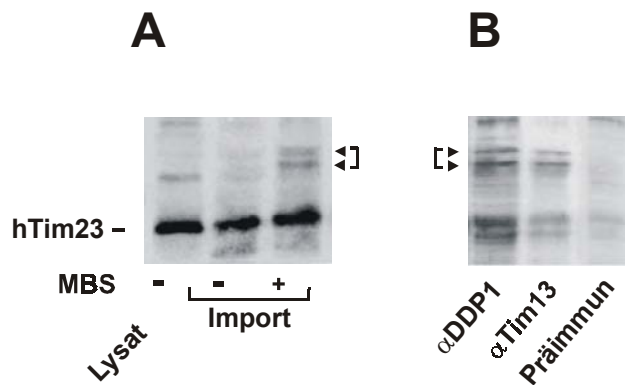


Abb.18: Interaktion von DDP1 und Tim13 mit dem humanen Tim23-Vorstufenprotein

(A) Import von hTim23 in Säugermitochondrien nach Reduktion des Membranpotentials und anschließende Quervernetzungsreaktion. Mitochondrien aus Mäuseleber wurden zur Reduktion des Membranpotentials für 5 min auf Eis mit 1 μ M Valinomycin inkubiert. Anschließend erfolgte der Import von radioaktiv markiertem hTim23-Vorstufenprotein. Die Mitochondrien wurden reisoliert und zur Quervernetzung der Proteine mit 100 μ M MBS inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 mM Tris pH 8.0 gestoppt, die Mitochondrien isoliert, gewaschen und die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert. Quervernetzungsprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet

(B) Immunpräzipitation der Quervernetzungsprodukte

Nach Import und Quervernetzungsreaktion (wie unter A beschrieben) wurden die Mitochondrien reisoliert und solubilisiert (0.5% Digitonin). Aus dem löslichen Proteinüberstand wurde mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 gefällt. Als Kontrolle diente Präimmunsereum. Nach Isolierung der Antikörper-Antigen-Präzipitate durch Zentrifugation wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Sowohl mit Antikörpern gegen DDP1 als auch gegen Tim13 ließen sich die Tim23-Quervernetzungsprodukte fällen, wohingegen eingesetztes Präimmunsereum als Kontrolle keines der Addukte von hTim23 präzipitierte (Abb.18B). Wie in vorangegangenen Koimmunpräzipitationen gezeigt wurde, konnten unter nativen Bedingungen mit einem Antikörper gegen DDP1 auch Quervernetzungsprodukte von Tim13 mit hTim23 gefällt werden und umgekehrt.

Die spezifische Immunpräzipitation von Quervernetzungsprodukten unter Beteiligung von hTim23 mit Antikörpern gegen DDP1 bzw. Tim13 zeigt die physikalische Interaktion zwischen dem Tim23-Translokationsintermediat und dem DDP1/Tim13-Komplex im Intermembranraum von Säugermitochondrien.

3.6. DDP1 und Tim13 sind Zink-bindende Proteine

Homologe der kleinen Tim-Proteine existieren offensichtlich in allen eukaryontischen Organismen. Analysen von über 50 verschiedenen Sequenzen zeigen, dass alle bisher bekannten Mitglieder der Familie der kleinen Tim-Proteine eine evolutionär hochkonservierte, charakteristische Konsensus-Signatur: -Cys-X₃-Cys-X₁₄₋₁₇-Cys-X₃-Cys-

(das Cys₄-Motiv) (Bauer et al., 1999b) besitzen. Es wurde vermutet, dass dieses Motiv ein potenzielles Metallbindungszentrum darstellt, wobei durch die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste zweiwertige Metall-Ionen wie z.B. Zn²⁺-Ionen komplexiert werden und sich dadurch eine Zinkfinger-ähnliche Struktur ausbilden kann. Für die yTim10- und yTim12-Proteine aus *S.cerevisiae* konnte schon früher gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, Zn²⁺-Ionen zu binden (Sirrenberg et al., 1998).

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei dem Cys₄-Motiv des menschlichen DDP1-Proteins bzw. des Tim13-Proteins ebenfalls um eine Zinkbindungsstruktur handelt, sollte die Metallbindungskapazität beider Proteine bestimmt werden. Dazu wurden DDP1 und Tim13 als Fusionsproteine mit dem Maltosebindungssprotein (MBP) rekombinant in *E.coli* exprimiert. Während der Anzucht wurde dem Medium Zink-Acetat (ZnAc₂) zugegeben. Als Kontrolle diente ein Fusionsprotein aus MBP und der α -Untereinheit der β -Galaktosidase (MBP-Lac α), das unter gleichen Bedingungen in *E.coli* exprimiert wurde. Die rekombinanten MBP-Fusionsproteine wurden in Anwesenheit von 1 mM ZnAc₂ im Lysepuffer an Amylosesäulen gebunden. Zur Entfernung nicht gebundener Zn²⁺-Ionen wurde das an die Säule gebundene Protein mit zinkfreiem Waschpuffer gewaschen und die MBP-Fusionsproteine anschließend mit Maltose eluiert. Die Proteinkonzentration der eluierten Proteine wurde auf 300 μ g/ml eingestellt (Abb.19).

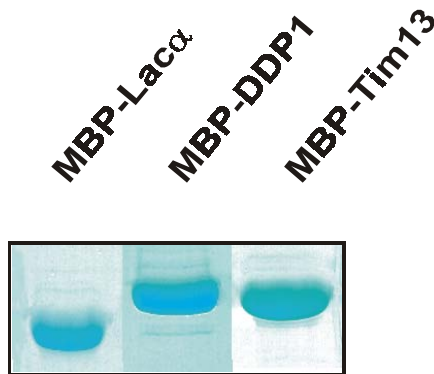


Abb.19: Expression und Reinigung der Fusionsproteine MBP-DDP1, MBP-Tim13 und MBP-Lac α .

Zur Reinigung rekombinant exprimierter Proteine wurden lysierte *E.coli*-Zellen auf eine Amylosesäule aufgetragen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgte nach Waschen der Säule mit 10 mM Maltose. Nachfolgend wurde der Proteingehalt der Fraktionen bestimmt. Je 5 μ g rekombinantes Protein wurden durch SDS-PAGE und Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue analysiert.

Die Bestimmung des Zn²⁺-Gehalts der rekombinanten Proteine erfolgte durch induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie (ICP). Die Emission wurde bei den für Zink spezifischen Wellenlängen von 206.200 nm und 213.857 nm bestimmt. Die Kalkulation des

Zinkgehaltes der jeweiligen Proteine basierte dabei auf den bei 213.857 nm gemessenen Signalen.

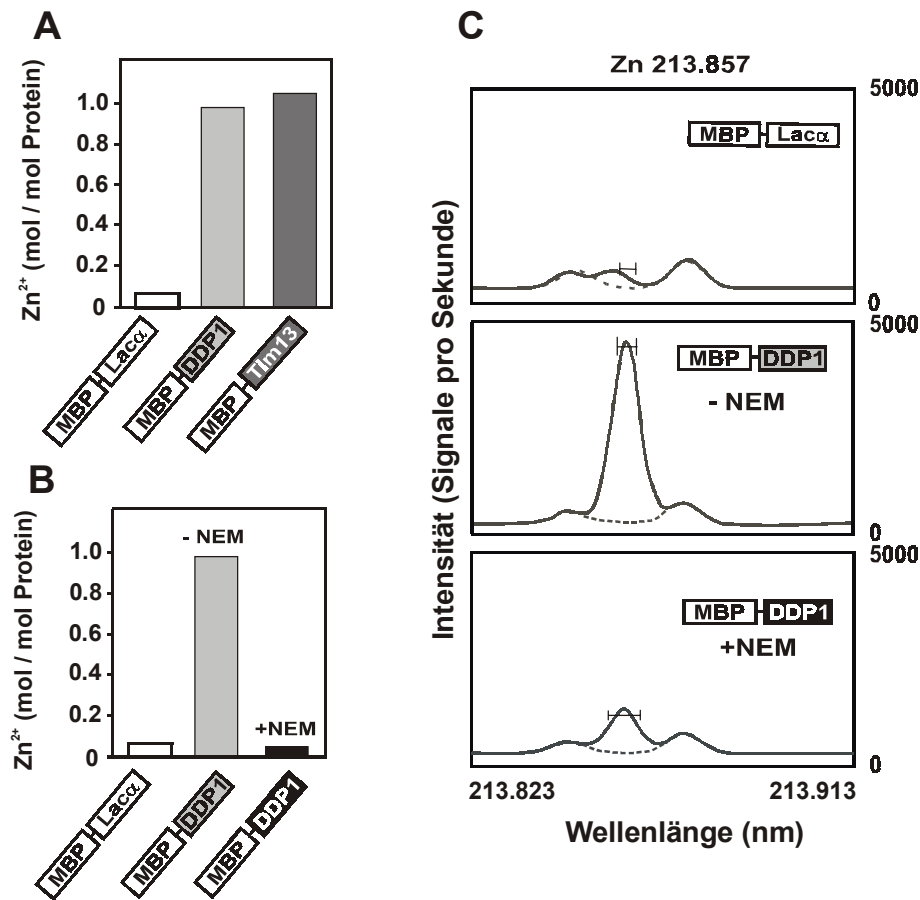


Abb.20: DDP1 und Tim13 sind Zink-bindende Proteine

(A) MBP-DDP1 und MBP-Tim13 binden Zn²⁺-Ionen in äquimolarer Menge

Die Ergebnisse der ICP-Analyse. Darstellung der Zinkbindungskapazitäten von MBP-DDP1 und MBP-Tim13 als Balkengrafik.

(B) Die Zinkbindung von MBP-DDP1 wird durch die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste vermittelt.

In *E.coli* exprimiertes MBP-DDP1 wurde entweder mit 40 mM N-Ethylmaleimid (NEM) inkubiert oder direkt zur Affinitätsreinigung an eine Amlysesäule gebunden. Nach entsprechenden Waschschritten wurde das Protein eluiert und im Anschluss zur Zinkbestimmung eingesetzt.

(C) Induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie (ICP)-Analysen

Zu sehen sind die Signalintensitäten bei der zinkspezifischen Wellenlänge von 213.857 nm.

Für die Fusionsproteine MBP-DDP1 und MBP-Tim13 ergaben die Messungen einen Zinkgehalt entsprechend einer Stöchiometrie von ca. 1:1; d.h. ein Molekül MBP-DDP1 bzw. MBP-Tim13 bindet jeweils ein Zn²⁺-Ion (Abb.20A). Der MBP-Anteil der Fusionsproteine ist nicht an der Zinkbindung beteiligt, da das Kontrollprotein MBP-Lac α nur Hintergrundspuren an Zink enthält.

Um die Beteiligung der Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste an der Zinkbindung zu untersuchen, wurde in einem weiteren Ansatz MBP-DDP1 nach der Bindung an eine Amylosesäule mit N-Ethylmaleimid (NEM) inkubiert. NEM ethyliert spezifisch Sulfhydrylgruppen von Cysteinseitenketten. Die Emissionsanalysen zeigen, dass mit NEM vorbehandeltes MBP-DDP1 im Unterschied zu unbehandeltem MBP-DDP1 keine signifikanten Mengen an Zn^{2+} -Ionen mehr binden kann (Abb. 20B und C).

Die Bestimmung der Zinkbindungskapazität zeigte, dass es sich bei MBP-DDP1 und MBP-Tim13 um Zink-bindende Proteine handelt. Je ein Molekül Protein bindet ein Zn^{2+} -Ion. Die Metallbindungskapazität liegt innerhalb der Fusionsproteine ausschließlich beim Tim-Proteinanteil, da das MBP-Lac α Fusionsprotein nicht in der Lage ist, Zn^{2+} -Ionen zu komplexieren. Die Sulfhydrylgruppen der evolutionär konservierten Cysteinreste sind offensichtlich an der Metallbindung von DDP1 und Tim13 beteiligt, da die Ethylierung der Sulfhydrylgruppen den Einbau von Zink in das Protein inhibiert.

3.7. Strukturelle und funktionelle Konsequenzen einer Krankheits-assoziierten *missense* Mutation im Cys₄-Motiv

Die Mehrzahl der untersuchten MTS-Patienten zeigen *loss-of-function* Mutationen im *DDP1*-Gen, die vermutlich zu einem vollständigen Verlust des DDP1-Proteins führen (siehe auch Tabelle 1). In nur in einem einzig bisher beschriebenen Fall ist das klinische Bild des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms auf eine *missense* Mutation zurückzuführen. Der beschriebene Nukleotidaustausch von Cytosin gegen Thymin (C → T) an Position 233 der DDP1-cDNA führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein gegen Tryptophan (Cys → Trp) im konservierten Cys₄-Motiv (Cys → Trp an Position 66, im Folgenden C66W genannt) (Tranebjaerg et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die funktionellen und strukturellen Konsequenzen dieser *missense* Mutation im *DDP1*-Gen auf die Struktur und Funktion des DDP1-Proteins hin untersucht werden.

3.7.1. Der Cystein → Tryptophan Austausch im Cys₄-Motiv des DDP1-Proteins verhindert die Komplexierung von Zink-Ionen

Durch den Aminosäureaustausch Cys→Trp an Position 66 des DDP1-Proteins wird das allen kleinen Tim-Proteinen gemeinsame Cys₄-Motiv verändert. Es stellt sich daher die Frage, ob durch den Aminosäureaustausch die Metallbindung inhibiert wird oder ob das DDP1^{C66W}-

Protein über die Sulfhydrylgruppen der verbleibenden drei Cysteinreste in der Lage ist, Zn^{2+} -Ionen zu komplexieren.

Zur Untersuchung der Metallbindungskapazität wurde das $DDP1^{C66W}$ -Protein als Fusionsprotein zusammen mit dem Maltosebindungsprotein (MBP- $DDP1^{C66W}$) in *E.coli* unter Zugabe von Zinkacetat ($ZnAc_2$) zum Medium rekombinant exprimiert. Als Positivkontrolle dienten das MBP- $DDP1$ Fusionsprotein und als Negativkontrolle das Fusionsprotein aus MBP zusammen mit der α -Untereinheit der β -Galaktosidase (MBP-Lac α). Die MBP-Fusionsproteine wurden gereinigt und unspezifisch gebundene Zink-Ionen durch wiederholtes Waschen entfernt. Der Zn^{2+} -Gehalt der rekombinanten Fusionsproteine wurde wie dargestellt (siehe Punkt 3.6.) durch induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie (ICP) ermittelt.

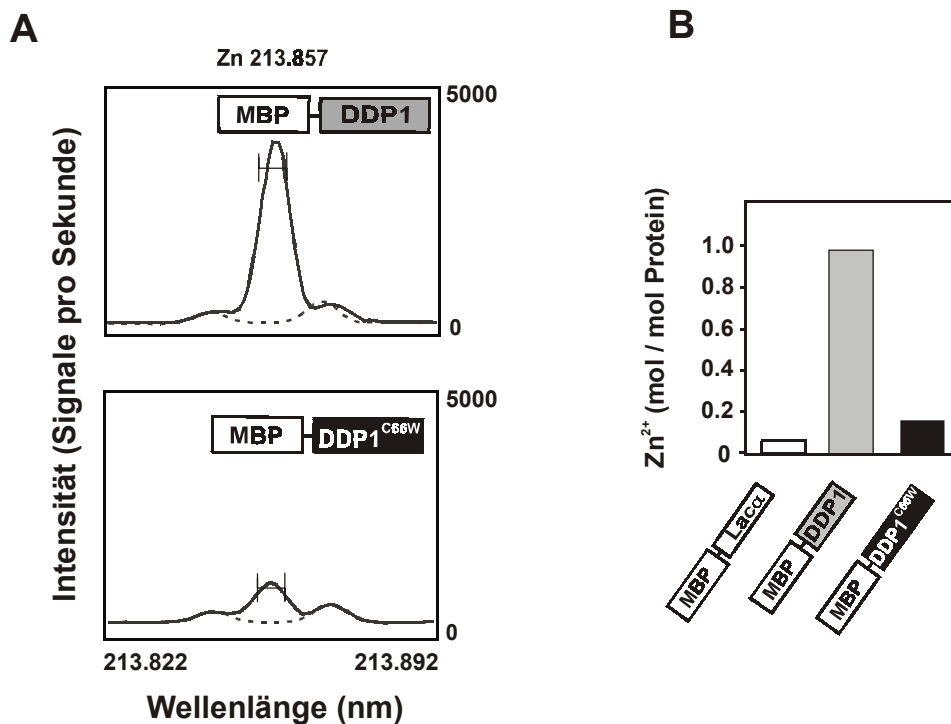


Abb.21: Das $DDP1^{C66W}$ -Protein ist nicht in der Lage Zn^{2+} -Ionen zu komplexieren

$DDP1$ und $DDP1^{C66W}$ wurden in *E.coli* als MBP-Fusionsproteine in Anwesenheit von 1 mM $ZnAc_2$ rekombinant exprimiert und über eine Maltose-Säule aufgereinigt.

(A) Analyse der Zinkbindung durch ICP (induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie) Dargestellt sind die Signalintensitäten bei der für zinkspezifischen Wellenlänge von 213.857 nm.

(B) Quantitative Analysen der induktiv gekoppelte atomare Emissionsspektroskopie (ICP).

Bezogen auf die Menge gereinigten Proteins bindet das gereinigte MBP- $DDP1$ Protein 1 Mol Zn^{2+} pro Mol Fusionsprotein. Im Gegensatz dazu konnte im Fusionsprotein MBP- $DDP1^{C66W}$ keine signifikanten Mengen an Zinkionen nachgewiesen werden (Abb.21A und 21B). In seinen zinkbindenden Eigenschaften verhält es sich wie das als Negativkontrolle eingesetzte

MBP-Lacα. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Austausch eines Cysteinrestes im Cys₄-Motiv des DDP1-Proteins zum Verlust der Metallbindungskapazität führt.

3.7.2. Das DDP1^{C66W}-Protein komplementiert nicht die Funktion des γTim8-Proteins

Die zuvor gezeigte Komplementation des kältesensitiven Phänotyps des Δ8/Δ13-Deletionsmutante durch den menschlichen DDP1/Tim13-Komplex (siehe Punkt 3.4.2.) ermöglichte es, die Auswirkung pathogener Mutationen des *DDP1*-Gens auf die Funktion des DDP1-Proteins durch Komplementationsstudien zu untersuchen. Hierfür wurde das *DDP1*^{C66W}-Gen in einen Hefe-Expressionsvektor kloniert und zusammen mit dem *Tim13*-Gen in Δ8/Δ13-Hefezellen transformiert.

Zur Untersuchung des Phänotyps wurden Zellen des Δ8/Δ13-, Δ8/Δ13+DDP1^{C66W}/Tim13-, Δ8/Δ13+DDP1/Tim13- und der isogene Wildtypstamm in Verdünnungsreihen auf Mediumplatten mit Glukose als fermentierbare Kohlenstoffquelle ausgebracht. Die Platten wurden bei 30°C bzw. 15°C über mehrere Tage inkubiert.

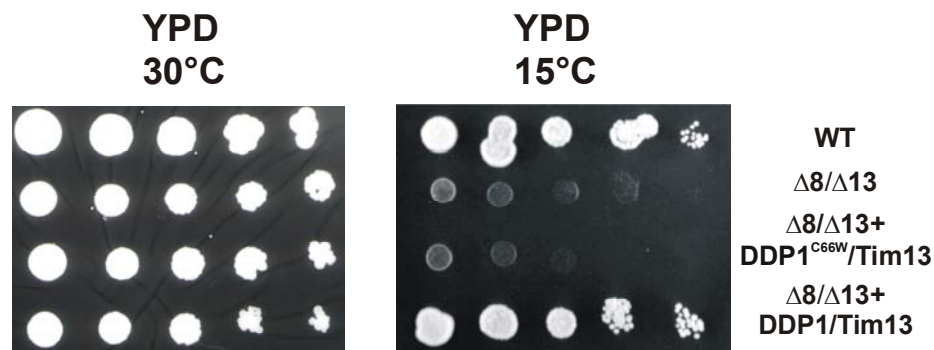


Abb.22: DDP1^{C66W} übernimmt nicht die Funktion von γTim8

Die Δ*tim8*/Δ*tim13* Doppeldisruptante, die DDP1^{C66W} und Tim13 koexprimierende Δ*tim8*/Δ*tim13* Doppeldisruptante, die DDP1 und Tim13 koexprimierende Δ*tim8*/Δ*tim13* Doppeldisruptante und der isogene Wildtypstamm MB2 wurden bei 30°C in YPD-Medium vorinkubiert. Von den Kulturen (OD₅₉₈ =1) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 2 μl von jeder Verdünnung auf YPD-Platten aufgetragen. Die Platten wurden bei 30°C bzw. bei 15°C inkubiert.

Bei einer Temperatur von 30°C zeigten alle Stämme vergleichbares Wachstum (Abb.22). Bei 15°C war die Teilungsrate der Zellen des Δ8/Δ13+DDP1^{C66W}/Tim13- und des Δ8/Δ13-Stammes gegenüber dem Wildtypstamm deutlich reduziert (kältesensitiver Phänotyp). Δ8/Δ13+DDP1/Tim13-Zellen zeigten hingegen wie erwartet, ein mit Wildtyp-Zellen vergleichbares Wachstum. Der kältesensitive Phänotyp des Δ8/Δ13-Stammes konnte durch die Koexpression von DDP1^{C66W} und Tim13 nicht komplementiert werden. Es ist daher

anzunehmen, dass der Austausch eines Cysteins gegen ein Tryptophan im Cys₄-Motiv einen Funktionsverlust des DDP1-Proteins bedingt.

3.7.3. Der transgene $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1}^{\text{C66W}}/\text{Tim13}$ -Hefestamm besitzt einen Importdefekt

In vorangegangenen mitochondrialen Importuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der humane DDP1/Tim13-Komplex den Import von Tim23-Vorstufenproteinen in Mitochondrien der Hefe unterstützt. Es stellte sich daher die Frage, ob durch die C66W-Mutation im DDP1-Protein die Importeffizienz von Tim23 in Mitochondrien beeinflusst wird. Durch Importstudien sollten die Importeffizienz des humanen Tim23-Vorstufenproteins in Mitochondrien von $\Delta 8/\Delta 13$ -Hefezellen, die das mutierte $\text{DDP1}^{\text{C66W}}$ zusammen mit dem menschlichen Tim13-Protein exprimieren und $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1}/\text{Tim13}$ -Hefemitochondrien untersucht werden. Dazu wurden radioaktiv markierte Vorstufen des humanen Tim23-Proteins in die verschiedenen Mitochondrien importiert und die Importrate nach SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt.

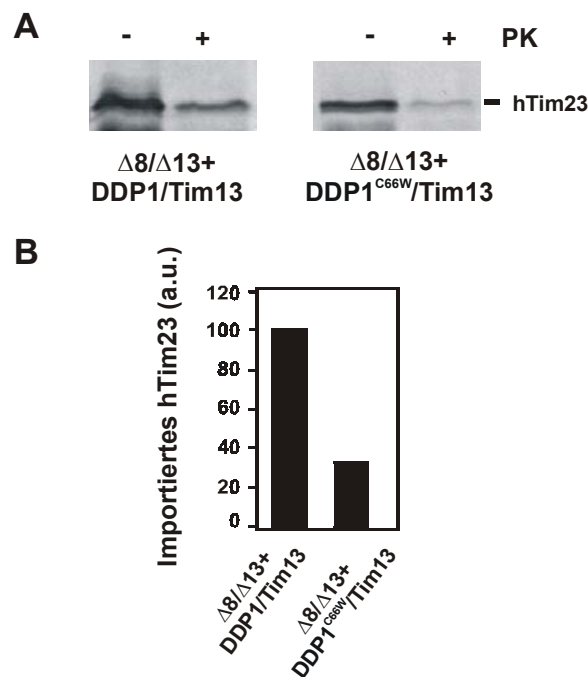


Abb.23: Das $\text{DDP1}^{\text{C66W}}$ -Protein unterstützt nicht den Import des humanen Tim23-Vorstufenproteins in Mitochondrien der Hefe

(A) Das humane Tim23-Vorstufenprotein (hTim23) wurde in isolierte, energetisierte Mitochondrien ($\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1}/\text{Tim13}$ - und $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1}^{\text{C66W}}/\text{Tim13}$) importiert. Die Proben wurden entweder unbehandelt gelassen (-PK) oder nicht importiertes Protein durch Inkubation mit Proteinase K (+PK) abgebaut. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

(B) Verhältnis der Importeffizienz von hTim23-Protein in die entsprechenden Mitochondrien dargestellt als Balkengrafik. Import in $\Delta 8/\Delta 13 + \text{DDP1}/\text{Tim13}$ -Mitochondrien=100

Die Importeffizienz des menschlichen Tim23-Vorstufenproteins in Mitochondrien, die das mutierte $\text{DDP1}^{\text{C66W}}$ -Protein enthalten, war im Vergleich zu DDP1 exprimierenden Mitochondrien um ca. 75% reduziert (Abb.23). Die mutierte DDP1 -Variante ist offensichtlich nicht in der Lage die Funktion von γTim8 zu ersetzen und den Import des humanen Tim23-Proteins in Mitochondrien zu unterstützen.

3.7.4. Untersuchungen zur Biogenese und Stabilität des DDP1^{C66W}-Proteins in Mitochondrien

Die funktionellen Untersuchungen im Hefesystem zur C66W-Mutation haben gezeigt, dass bei Koexpression von Tim13 mit dem mutierten DDP1 weder der kältesensitiven Phänotyp noch der Importdefekt der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante komplementiert werden. Wie es zum Funktionsverlust des Komplexes kommt ist jedoch noch ungeklärt. Insbesondere ist nicht klar, ob die Mutation zur verringerten Stabilität von DDP1 führt oder ob es zu einem Fehlen der Bildung funktioneller Komplexe kommt. Es sollte daher der Einfluss der C66W-Mutation auf die Transkription, die Biogenese, die Stabilität und die Komplexbildung des DDP1-Proteins untersucht werden.

3.7.4.1. DDP1^{C66W} wird in reduzierten Mengen in $\Delta 8/\Delta 13$ -Mitochondrien exprimiert

Möglicherweise beeinträchtigt der eingeführte Basenaustausch die Transkription des DDP1^{C66W}-Gens bzw. die Stabilität des DDP1^{C66W} Transkriptes. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde aus transformierten Hefezellen Gesamt-RNA präpariert, und die spezifischen DDP1-Transkripte mittels RT-PCR untersucht. Die eingebrachte mutierte DDP1^{C66W}-Sequenz war wie die Wildtyp-DDP1-Sequenz nach der Amplifikation nachweisbar (Abb.24A). Die Mutation scheint somit keinen negativen Einfluss auf die Transkription des menschlichen *DDP1*-Gens in der Hefe zu besitzen.

Um die Auswirkungen der Mutation auf Proteinebene zu untersuchen, wurde aus $\Delta 8/\Delta 13 + DDP1^{C66W}/Tim13$ - und $\Delta 8/\Delta 13 + DDP1/Tim13$ -Hefezellen Mitochondrien isoliert und mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht (Abb.24B). Im Vergleich zum Wildtyp-DDP1 war die nachweisbare Proteinmenge an DDP1^{C66W} um ca. 70% verringert. Auch die Menge des Partnerproteins Tim13 war bei Koexpression mit DDP1^{C66W} im Vergleich zur Koexpression mit DDP1 deutlich reduziert.

Der Austausch von Cystein nach Tryptophan im mutierten DDP1-Protein führt offensichtlich zu einer signifikant reduzierten "steady state" Menge von DDP1^{C66W} im Intermembranraum. Es galt zu klären, ob die reduzierte Proteinmenge auf 1) einen ineffizienten Import in Mitochondrien, 2) eine Fehlsortierung oder 3) eine Instabilität des importierten Proteins zurückzuführen ist.

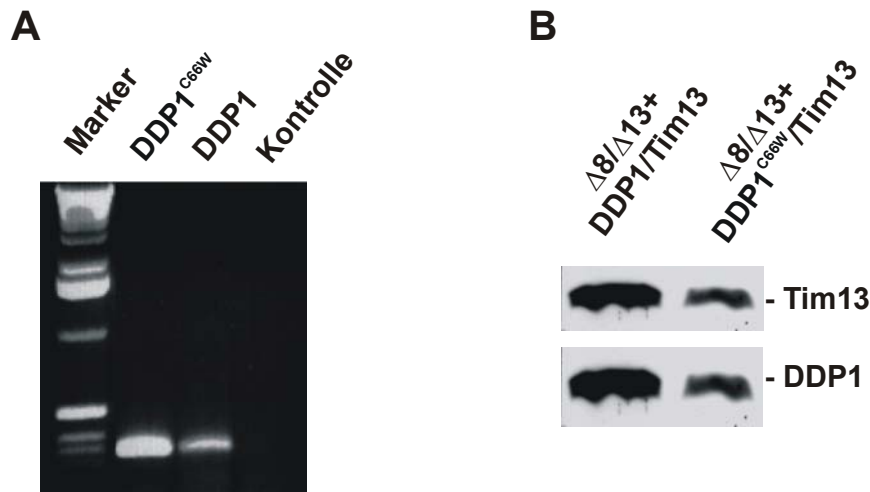


Abb 24 DDP1^{C66W} wird in Hefemitochondrien exprimiert.

(A) Detektion von DDP1^{C66W}- und DDP1-spezifischen Transkripten durch reverse Transkription (RT-PCR)

Aus $\Delta 8/\Delta 13$ -, $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13- und $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1^{C66W}/Tim13-Hefezellen wurde GesamtmRNA extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Vorlage für eine PCR-Reaktion mit DDP1-spezifischen Primern. Als Kontrolle wurde cDNA aus Zellen des $\Delta 8/\Delta 13$ -Stammes als Vorlage für die PCR-Reaktion eingesetzt.

(B) Lokalisation von DDP1^{C66W} in Mitochondrien.

50 μ g mitochondriales Protein aus $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1/Tim13- bzw. $\Delta 8/\Delta 13$ +DDP1^{C66W}/Tim13-Mitochondrien wurde durch SDS-PAGE und anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

3.7.4.2. Der mitochondriale Import von DDP1^{C66W} ist nicht beeinträchtigt

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede in der DDP1-Menge auf eine reduzierte mitochondriale Importeffizienz des mutierten Proteins zurückgehen, wurden radioaktiv markierten Vorstufen von DDP1^{C66W} und DDP1 *in vitro* in isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes importiert und ihre submitochondriale Lokalisation bestimmt. DDP1^{C66W} wurde mit gleicher Effizienz wie das Wildtyp-DDP1 in Mitochondrien der Hefe importiert (Abb.25A). Beide Proteine wurden erst nach selektiver Öffnung der Außenmembran zugänglich für proteolytische Degradation. Zur Kontrolle der Öffnung der Außenmembran wurde der entsprechende Blot mit Antikörpern gegen das endogene Hefe-Tim13 immunologisch untersucht (Abb.25B). Die Immundekoration zeigt die Zugänglichkeit des endogenen Intermembranraum-Proteins Tim13 für Proteinase K nach Schwellen der Mitochondrien und der Konversion in Mitoplasten.

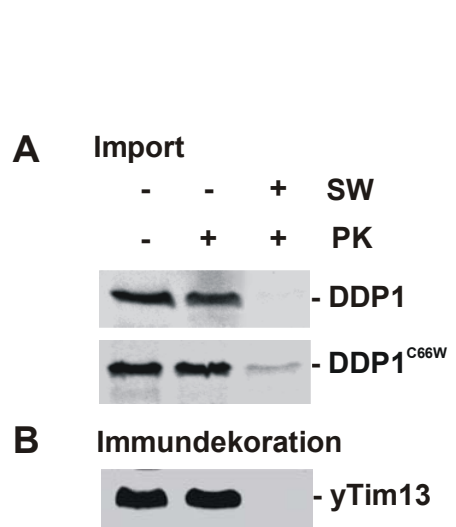


Abb25.: DDP1^{C66W} wird in Mitochondrien aus Hefe importiert

(A) Die radioaktiv markierten DDP1- bzw. DDP1^{C66W}-Vorstufen-proteine wurden in isolierte Mitochondrien aus Hefe (wt) importiert. Die Reaktionsansätze wurden entweder unbehandelt gelassen oder zur Degradation von nicht importiertem Vorstufen-protein mit Proteinase K (+PK) inkubiert. Zur Erzeugung von Mitoplasten wurde die Außenmembran durch osmotisches Schwellen (+SW) selektiv geöffnet und der Ansatz mit Proteinase K (50 µg/ml) inkubiert. Die Mitochondrien bzw. Mitoplasten wurden durch Zentrifugation reisoliert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht.

(B) Nachweis der Öffnung der mitochondrialen Außenmembran durch Immundekoration mit Antikörpern gegen das endogene Hefe-Tim13 (yTim13).

Die *in vitro* Importanalysen zeigen den effizienten Import des DDP1^{C66W}-Proteins in Mitochondrien der Hefe und seine korrekte Sortierung in den Intermembranraum. Die reduzierte Proteinmenge des DDP1^{C66W}-Proteins ist folglich nicht auf einen mitochondrialen Importdefekt des mutierten Proteins zurückzuführen.

3.7.4.3. Das DDP1^{C66W}-Protein unterliegt in Mitochondrien einer bevorzugten proteolytischen Degradation

Um einen möglichen Einfluss der C66W-Mutation auf die Stabilität des DDP1-Proteins im Intermembranraum zu untersuchen, sollte die Degradationskinetik von in Hefemitochondrien importiertem DDP1^{C66W} mit wtDDP1 verglichen werden. Dabei wurde von der Beobachtung ausgegangen, dass im mitochondrialen Intermembranraum der Hefe nicht assemblierte und missgefaltete Proteine durch diverse Proteasen, unter anderem durch die AAA-Protease (ATP abhängige membrangebundene Protease, Yme1p) spezifisch erkannt und degradiert werden (Leonhard et al., 1996b). In Säugermitochondrien existieren entsprechende homologe Proteasen mit vergleichbarer proteolytischer Aktivität (Shah et al., 2000).

DDP1^{C66W} und DDP1 wurden als radioaktiv markierte Vorstufenstufenmoleküle in Mitochondrien aus Wildtyp-Hefezellen importiert und zur Stimulation der proteolytischen Aktivität der Yme1p-Protease in einem ATP regenerierendem System inkubiert. Nach 5 min,

10 min, 30 min, 60 min und 90 min wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie untersucht.

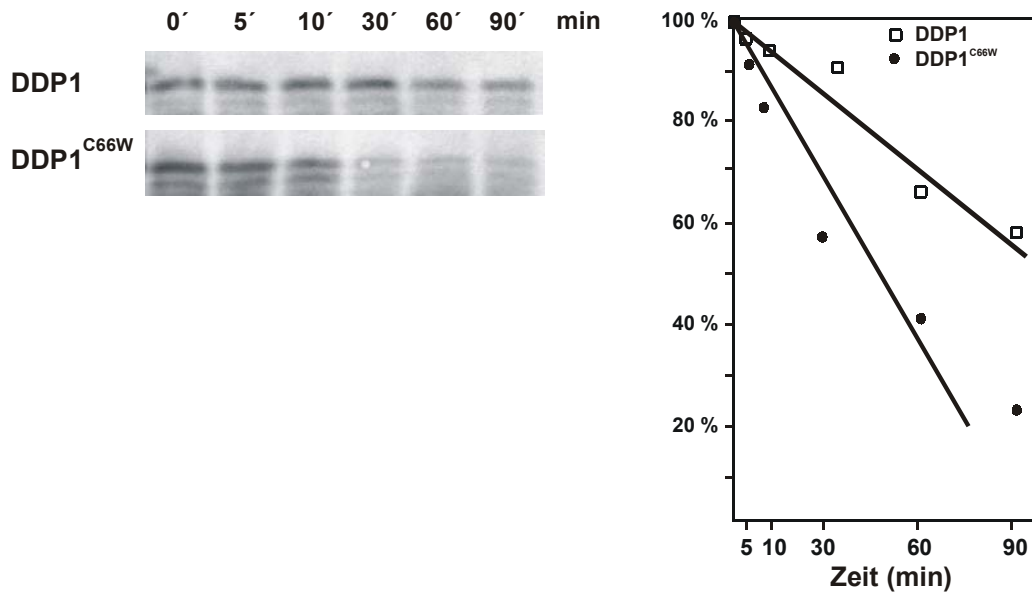


Abb. 26

***In vitro* in Mitochondrien importiertes DDP1^{C66W} wird bevorzugt degradiert.**

Radioaktiv markierte DDP1- und DDP1^{C66W}-Vorstufenproteine wurde in isolierte Mitochondrien aus Wildtyp-Hefezellen importiert. Nicht importiertes Protein wurde durch Zugabe Trypsin degradiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, gewaschen und anschließend für 90 min bei 37°C in einem ATP-regenerierendem System (2.5 mM ATP, 5 mM NADH, 0.1 mg/ml Kreatin-Kinase und 10 mM Kreatin-Phosphat) reinkubiert. Dem Ansatz wurden nach 5, 10, 30, 60 und 90 min Proben entnommen, die 50 µg mitochondrialem Gesamtprotein entsprachen und die Proteine nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose gebロットet. Die Signale wurden auf dem Phosphorimager-System quantifiziert. Die Signalintensität von importiertem DDP1 zum Zeitpunkt t = 0 min wurde als 100% angenommen.

Während vom wt-DDP1-Protein nach 90 min noch ca. 62% detektiert werden konnte, wurde im gleichen Zeitraum nur noch 22% der Ausgangsmenge an DDP1^{C66W} nachgewiesen (Abb.26). In den Intermembranraum importiertes DDP1^{C66W} wird offensichtlich im Vergleich zum Wildtyp-Protein bevorzugt degradiert. Möglicherweise ist die erhöhte Abbaueffizienz auf eine Missfaltung oder Assemblierungsdefizienz des mutierten Proteins zurückzuführen.

3.7.5. Die C66W-Mutation verhindert die Interaktion von DDP1^{C66W} mit Tim13

Wie zuvor gezeigt, interagieren DDP1 und Tim13 im Intermembranraum von Mitochondrien aus Säuger- und Hefezellen und assemblieren zu einem hetero-oligomeren Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Es wurde spekuliert, dass durch die Missfaltung des DDP1^{C66W}-Proteins die Interaktion mit seinem Partnerprotein Tim13 und damit die Assemblierung zu einem höhermolekularen Komplex verhindert wird und es als Folge davon zu einer Degradation des mutierten Proteins kommt.

Um diese Möglichkeit zu analysieren, sollte die physikalische Interaktion zwischen beiden Proteinen in einem zwei-Schritt *in vitro* Interaktionstest untersucht werden.

Dazu wurden DDP1^{C66W} und DDP1 als Penta-Histidin-Fusionsproteine (His₅-DDP1^{C66W} bzw. His₅-DDP1) und Tim13 als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (Tim13-GST) rekombinant in *E.coli* exprimiert. Sowohl das His₅-DDP1- als auch das His₅-DDP1^{C66W}-Protein wurden an eine Ni-NTA-Säule gebunden. Anschließend wurde der lösliche *E.coli*-Überstand, der Tim13-GST enthielt, auf die vorgebundenen Säulen aufgetragen. Nach Waschen der Ni-NTA wurden an die Säule gebundene Proteine mittels Imidazol in steigenden Konzentrationen eluiert und immunologisch analysiert.

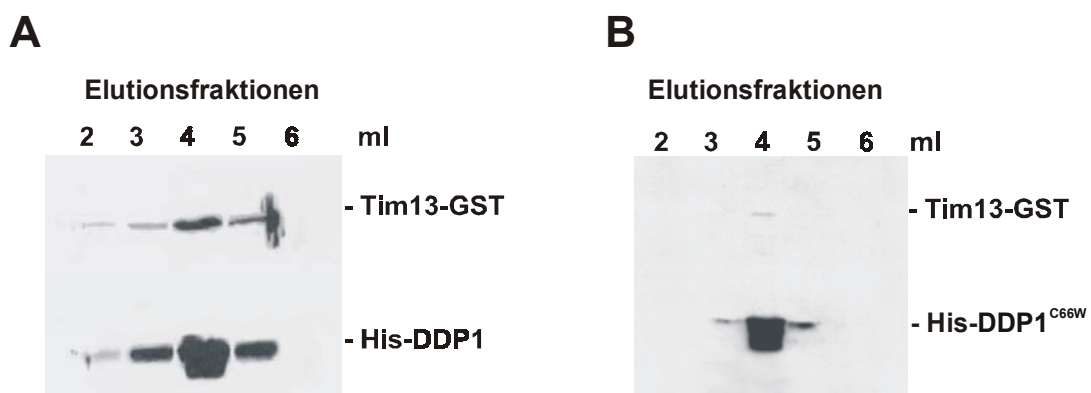


Abb. 27:

DDP1 aber nicht DDP1^{C66W} koeluiert zusammen mit Tim13-GST von der Ni-NTA-Säule.

(A) In *E.coli* rekombinant exprimiertes His₅-DDP1 wurde an Ni-NTA-Agarose gebunden. Zum vorgebundenen His₅-DDP1 wurde der lösliche Überstand von Tim13-GST exprimierenden *E.coli*-Zellen gegeben und der Ansatz über Nacht inkubiert. Die Säule wurde ausführlich gewaschen und gebundene Proteine durch Zugabe von 300 mM Imidazol eluiert. 30 µl der Elutionsfraktionen (1ml) wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen DDP1 und Tim13 untersucht.

(B) In einem parallelen Ansatz wurde, wie unter (A) beschrieben, rekombinant exprimiertes His₅-DDP1^{C66W} an Ni-NTA-Agarose vorgebunden.

Die Immunoblotanalyse der Elutionsfraktionen zeigt, dass sowohl His₅-DDP1 als auch His₅-DDP1^{C66W} an die Ni-NTA-Säule gebunden hatten (Abb.27A und 27B). Beide Proteine eluierten von der Ni-NTA-Säule in der gleichen Fraktion (Elutionsfraktion 4). Während das Tim13-GST Protein mit His₅-DDP1 koeluierte, fanden sich im His₅-DDP1^{C66W}-Eluat nur Spuren von Tim13-GST.

Um eine unspezifische Bindung des Tim13-GST-Proteins an die Ni-NTA-Agarose ausschließen zu können, wurden in einem zweiten Aufreinigungsschritt die Spitzenfraktionen der Ni-NTA-Säulen von His₅-DDP1- bzw. His₅-DDP1^{C66W} mit reduzierter Glutathion-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine wurden eluiert und eine Hälfte zur Proteinanalyse

durch SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting aufbereitet. Die zweite Hälfte wurde zur Bestimmung der Stöchiometrie interagierender Proteine nach SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

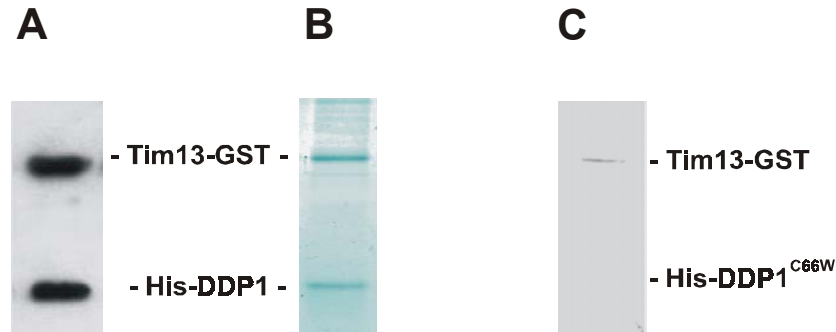


Abb.28: DDP1^{C66W} interagiert nicht mit Tim13-GST.

In einem zweiten Reinigungsschritt (s.Abb.26) wurde die Elutionsfraktion 4 mit an Sepharose gebundenem reduziertem Glutathion versetzt und inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert, gewaschen und gebundene Proteine eluiert.

(A) Immunoblotanalyse der His₅-DDP1-Elution nach Inkubation mit reduzierter Glutathion-Sepharose durch Antikörper gegen DDP1 und Tim13.

(B) Coomassiefärbung der His₅-DDP1-Elution nach Inkubation mit reduzierter Glutathion-Sepharose nach SDS-PAGE.

(C) Immunoblotanalyse der His₅-DDP1^{C66W}-Elution nach Inkubation mit reduzierter Glutathion-Sepharose durch Antikörper gegen DDP1 und Tim13.

Nach dem zweiten Reinigungsschritt zeigte sowohl die Immunoblotanalyse als auch die Anfärbung der eluierten Proteine durch Coomassie Brilliant Blue, dass His₅-DDP1 und Tim13-GST in nahezu äquimolaren Mengen von der Glutathion-Sepharose eluierten (Abb.28A und 28B). Dies legt nahe, dass die rekombinant exprimierten Proteine in einem Verhältnis von 1:1 miteinander interagieren.

Im Gegensatz dazu konnte nach einem zweiten Aufreinigungsschritt kein His₅-DDP1^{C66W} mehr immunologisch detektiert werden. An der Glutathion-Sepharose verblieben offenbar nur noch Restmengen an Tim13-GST (Abb.27C). Dies lässt vermuten, dass die C66W-Mutation eine physikalische Interaktion zwischen DDP1 und seinem Partnerprotein Tim13 verhindert.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass der Austausch eines Cysteins gegen ein Tryptophan an Aminosäureposition 66 des DDP1-Proteins zum Verlust seiner Zinkbindungskapazität führt. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass damit die Ausbildung einer Zinkfinger-ähnlichen Sekundärstruktur verhindert wird, was möglicherweise zur Fehl- oder Missfaltung des resultierenden Proteins führt. Während der mitochondriale Import und die Lokalisation des DDP1^{C66W}-Proteins durch die Mutation nicht negativ beeinflusst werden,

verhindert die Missfaltung wahrscheinlich die physikalische Interaktion und damit die Assemblierung des mutierten DDP1-Proteins mit seinem Partnerprotein Tim13. Eine Folge davon könnte eine bevorzugte proteolytische Degradation des nicht-assemblierten DDP1^{C66W}-Proteins im Intermembranraum von Mitochondrien sein. Der molekulare Mechanismus über den die C66W-Mutation zum Funktionsverlust des DDP1-Proteins beim Mohr-Tranebjaerg-Syndrom führt, ist demnach möglicherweise eine Folge des Mangels funktioneller DDP1/Tim13-Komplexe im mitochondrialen Intermembranraum.

4. DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, geben einen Einblick in die Struktur und Funktion zweier mitochondrialer Proteine des Menschen: DDP1 und Tim13. Beide Proteine gehören zu einer konservierten Familie kleiner Zinkfinger-Proteine des mitochondrialen Intermembranraumes, die entlang des TIM22-vermittelten Importweges agieren. Über diesen Importweg inserieren hydrophobe Proteine, wie z.B. der ADP/ATP-Carrier in die mitochondriale Innenmembran. Das DDP1 ist dabei von besonderem Interesse, da im Menschen ein Funktionsverlust des Proteins zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom führt; einer neurodegenerativen Erkrankung, die mit Taubheit und anderen neurologischen Symptomen einhergeht. Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von DDP1 und seinem Partnerprotein Tim13 geben wichtige Hinweise auf den molekularen Pathomechanismus, der dem Mohr-Tranebjaerg-Syndrom zugrunde liegt. In dieser Arbeit konnten insbesondere die strukturellen Auswirkungen einer pathogenen *missense* Mutation auf die Metallbindungskapazität und die Stabilität des DDP1-Proteins gezeigt werden.

4.1. Evolutionäre Konservierung der menschlichen kleinen Tim-Proteine

Bei der Familie der kleinen Tim-Proteine handelt es sich um eine Gruppe strukturell ähnlicher Proteine, die alle eine charakteristische Konsensus-Signatur besitzen:

-Cys-X₃-Cys-X₁₄₋₁₇-Cys-X₃-Cys-, das Cys₄-Motiv. Homologe der kleinen Tim-Proteine werden offensichtlich in allen eukaryontischen Organismen exprimiert (Bauer et al., 1999b; Jin et al., 1999).

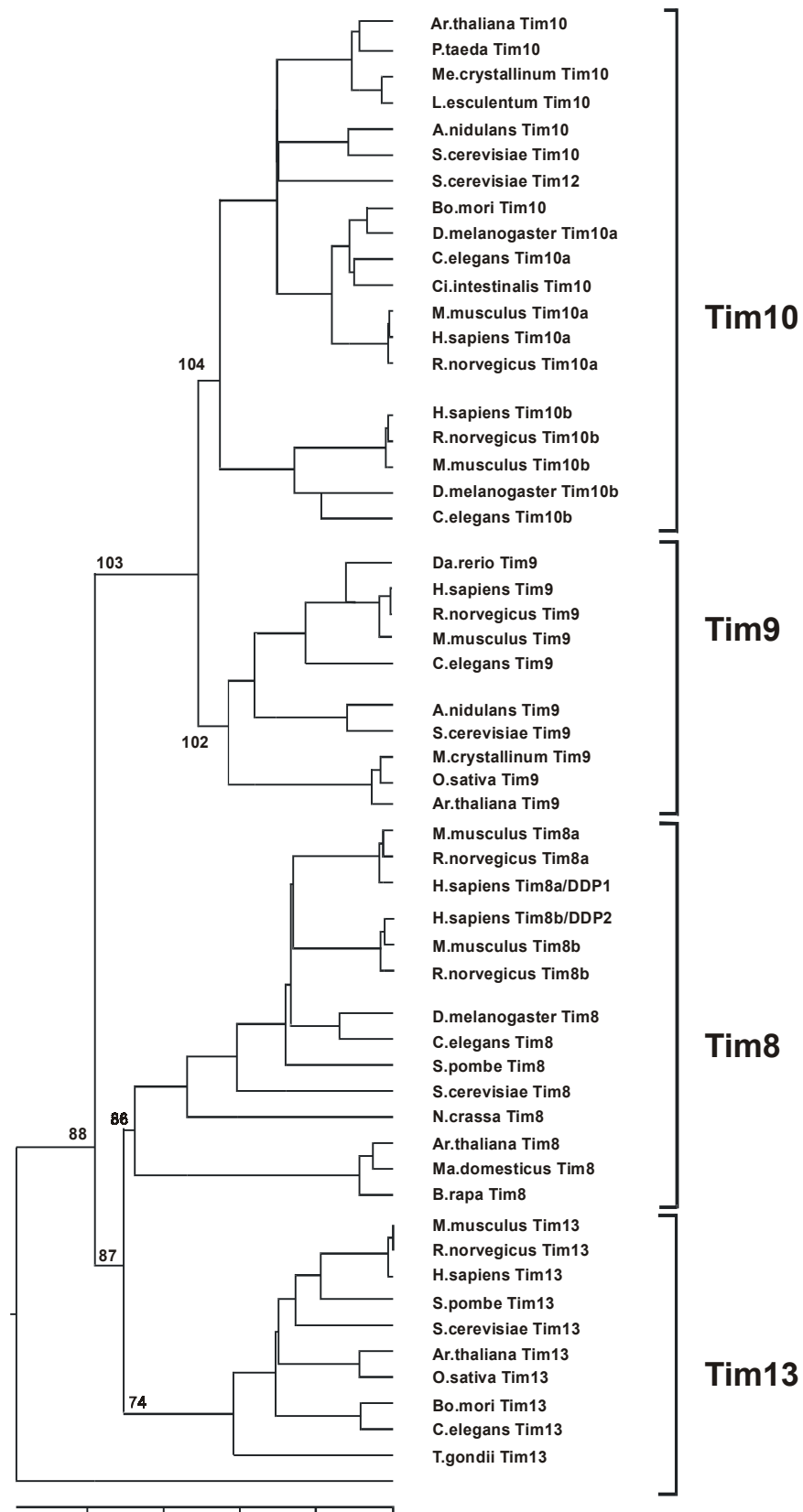


Abb.29: Phylogenetischer Stammbaum der Familie der kleinen Tim-Proteine, basierend auf einem Vergleich von Aminosäuresequenzen.

Die phylogenetische Analyse von 53 potentiellen kleinen Tim-Proteinen aus 21 verschiedenen Eukaryonten ergab, basierend auf der Aminosäure-Sequenz, eine Aufteilung in zwei Hauptgruppen mit eng verwandten Mitgliedern (Abb.29): eine Hauptgruppe wird durch die in *S.cerevisiae* essentiellen Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 charakterisiert, die zweite Hauptgruppe durch die nicht-essentiellen Proteine Tim8 und Tim13. Die Hauptgruppen spalten sich in je zwei Untergruppen auf: eine Tim10/12-, eine Tim9-, eine Tim8- und eine Tim13-Untergruppe. In allen Eukaryonten ist mindestens ein Mitglied der vier Untergruppen kodiert. Die vier Subgruppen unterscheiden sich im Wesentlichen in der Länge des Zinkfingers wie auch in der Abfolge geladener und hydrophober Aminosäuren zwischen den beiden konservierten Cystein-Paaren. Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse war nicht davon abhängig, ob die gesamten Sequenzen oder nur die Zinkfinger-Domänen mit den umgebenden Aminosäuren zur Analyse herangezogen wurden. Im Gegensatz zu niederen Eukaryonten enthält die Untergruppe mit Tim8 und Tim10 bei Säugern je zwei Homologe, die mit DDP1/DDP2 bzw. Tim10a/b bezeichnet wurden (Bauer et al., 1999b).

<i>H.sapiens</i>							
DDP1	DDP2	Tim13	Tim9	Tim10a	Tim10b		
56,70	54,02	46,31	44,94	45,55	42,71	yTim8	<i>S.cerevisiae</i>
43,80	41,90	56,19	29,52	40,95	28,57	yTim13	
51,54	50,57	43,15	60,67	51,11	44,66	yTim9	
50,51	48,38	50,52	45,16	62,36	39,80	yTim10	
37,61	37,61	38,53	42,20	44,95	39,44	yTim12	

Tab. 5: Sequenzähnlichkeit der Mitglieder der Subgruppen in Prozent beim Mensch/Hefe

Im Menschen werden sechs verschiedene Homologe der kleinen Tim-Proteine exprimiert (Bauer et al., 1999b; Jin et al., 1999). Tabelle 5 zeigt den Sequenzvergleich der menschlichen Homologe mit den kleinen Tim-Proteinen der Hefe. Es wird ersichtlich, dass DDP2 ein zweites yTim8-Homolog darstellt, da sowohl DDP1 und DDP2 eine etwa 55%ige Übereinstimmung mit der Komponente der Hefe zeigen. Auch bei Tim13, Tim9 und Tim10a handelt es sich um Homologe der Hefe-Proteine: yTim13 (56% Ähnlichkeit), yTim9 (60%) bzw. yTim10 (62%). Einzig das menschliche Tim10b konnte nicht eindeutig einem Hefe-Protein zugeordnet werden. Die Ähnlichkeit von Tim10b zu den kleinen Tim-Proteinen der Hefe bewegte sich lediglich zwischen 28% (yTim13) und 44% (yTim9). Die Klassifizierung

als Tim10b (und nicht als Tim9b) erfolgte ausschließlich auf Basis der phylogenetischen Analyse (Abb.29), die Tim10b in die Tim10/Tim12-Subgruppe gruppiert.

Interessanterweise gibt es in keinem anderen eukaryontischen Organismus außer *S.cerevisiae* ein Tim12 (Sirrenberg et al., 1998). In der Hefe erfüllt das Tim12-Protein allerdings eine wichtige Funktion während des Imports von Carrier-Proteinen, indem es deren Wechselwirkung mit der membranintegralen Komponente Tim22 vermittelt (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998b; Sirrenberg et al., 1998). Ob in anderen eukaryontischen Organismen diese Funktion von einem anderen Homolog - beispielsweise Tim10b - übernommen wird, oder ob es im Laufe der evolutionären Entwicklung zu veränderten Substratspezifitäten gekommen ist, ist noch ungeklärt.

Fünf der sechs identifizierten menschlichen Homologe kodieren für authentische Proteinkomponenten des mitochondrialen Intermembranraumes. Einzig für DDP2 ist es bisher nicht gelungen, ein entsprechendes endogenes Protein nachzuweisen. Möglicherweise handelt es sich bei DDP2 nicht um ein mitochondriales Protein. Untersuchungen anderer zellulärer Fraktionen (Mikrosomen, Zytosol, Kern) mit verschiedenen Antikörpern gegen DDP2 ergaben allerdings ebenfalls keine spezifischen Signale. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei DDP2 um eine gewebs- oder entwicklungspezifische Isoform handelt. Bisherige Analysen zeigen zwar die ubiquitäre Genexpression in adulten als auch fötalen Geweben (Bauer et al., 1999b; Jin et al., 1999), wobei aber möglicherweise DDP2 nur in spezifischen, im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten Geweben bzw. Organen auf Proteinebene exprimiert wird.

4.2. Struktur und Funktion von DDP1 und Tim13

4.2.1. DDP1 und Tim13 assemblieren im Intermembranraum zu einem hetero-hexameren Komplex

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lokalisieren DDP1 und Tim13 in den Intermembranraum menschlicher Mitochondrien. Beide Proteine assemblieren dort zu einem löslichen höhermolekularen Komplex mit einer nativen molekularen Masse von ca. 70 kDa. Damit zeigen die menschlichen Komponenten die gleiche submitochondriale Lokalisation und Organisationsstruktur wie ihre Hefe-Homologe yTim8 und yTim13. DDP1 und Tim13 interagieren im mitochondrialen Intermembran ausschließlich miteinander. Der Komplex der Hefe dagegen scheint zu einem geringen Anteil mit yTim9 physikalisch zu interagieren (Koehler et al., 1999a; Leuenberger et al., 1999).

Die Komplexgröße von 70 kDa spricht für eine Zusammensetzung aus sechs bis sieben Molekülen DDP1 bzw. Tim13. Die exakte Zusammensetzung ist jedoch bisher ungeklärt. Die vollständige gegenseitige Präzipitation aus solubilisierten Mitochondrien wie auch die Fällung gleicher Proteinmengen aus der 70 kDa-Elutionsfraktion lassen eine 1:1 Stöchiometrie von DDP1 und Tim13 vermuten. Für ein äquimolares Verhältnis beider Proteine spricht auch, dass die Ermittlung der Anteile am mitochondrialen Gesamtprotein ähnliche Werte ergab. Ein hetero-hexamerer Komplex bestehend aus 3 Molekülen DDP1 und 3 Molekülen Tim13 ist damit hochwahrscheinlich.

Der sequentielle Verdau des isolierten endogenen DDP1/Tim13-Komplexes mit Trypsin zeigte eine signifikant höhere Stabilität des DDP1 im Vergleich zu Tim13. Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass DDP1 zentral im Inneren des Komplexes organisiert ist und dadurch besser vor Degradation geschützt wird, während Tim13 von außen leichter proteolytisch abgebaut werden kann. Für diese Hypothese spricht auch, dass DDP1, aber nicht Tim13, alleine stabil im Hefe- wie auch Säugersystem exprimiert werden kann und dabei zu einem trimeren Komplex assembliert (eigene Beobachtungen). Ähnliche Schlussfolgerungen kamen von Untersuchungen des endogenen γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes. Auch hier führte die Behandlung mit Trypsin, Chemotrypsin oder der Protease-V8 zu einer bevorzugten Degradation von γ Tim13 während γ Tim8 stabil nachgewiesen werden konnte (Curran et al., 2002b).

4.2.2. DDP1 und Tim13 sind Zink-bindende Proteine

Alle Mitglieder der Familie kleiner Tim-Proteine besitzen ein konserviertes Zinkfinger-ähnliches Motiv, das sogenannte Cys₄-Motiv (-Cys-X₃-Cys-X₁₄₋₁₇-Cys-X₃-Cys-). Frühere Untersuchungen an γ Tim10 und γ Tim12 der Hefe haben bereits gezeigt, dass dieses Motiv tatsächlich die Bindung von zweiwertigen Metall-Ionen, wie z.B. Zink vermittelt (Sirrenberg et al., 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zinkbindungsmessungen an rekombinant exprimierten menschlichen DDP1- und Tim13-Fusionsproteinen haben bestätigt, dass auch diese in der Lage sind, Zink zu komplexieren; die Zn²⁺-Ionen werden dabei in einem äquimolaren Verhältnis gebunden.

Bei dem für die kleinen Tim-Proteine charakteristischem Cys₄-Motiv handelt es sich um ein bisher unbekanntes Zinkbindungsmotiv (Laity et al., 2001). Es unterscheidet sich signifikant von den gut charakterisierten Zink-bindenden Motiven wie z.B. dem C2H2-Motiv (Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₂-His-X₃₋₅-His) des Transkriptionsfaktors TFIIA aus *Xenopus* (Miller et al., 1985) oder dem Zinkribbon-Motiv, Cys-X₂-Cys-X₂₋₄-Cys-X₂₋₅-Cys (Hirashima et al., 1988).

Welche Rolle spielt das Cys₄-Zinkfinger-Motiv für die Struktur und Funktion der kleinen Tim-Proteine? Zinkfinger sind als kleine funktionelle und durch die Koordination von einem oder mehreren Zink-Ionen unabhängig gefaltete Protein-Domänen definiert, wobei die Strukturen sehr variabel sein können (Übersichtsartikel: Laity et al., 2001). Mittlerweile ist bekannt, dass die Funktionen von Zinkfinger-Domänen sehr vielfältig sind und nicht nur Protein-DNA-Wechselwirkungen sondern auch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. So sind Zinkfinger-Domänen für DNA- oder RNA-Bindung, Aktivierung der Transkription, Regulation von Apoptose oder auch Protein-Faltung und Protein-Assemblierung verantwortlich. Eigene Ergebnisse lassen vermuten, dass das Cys₄-Motiv eine essentielle Bedeutung für die korrekte Faltung der kleinen Tim-Proteine besitzt. Insbesondere scheint die Zinkfingerstruktur direkt für die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen DDP1 und seinem Partnerprotein Tim13 erforderlich zu sein (siehe auch Punkt 4.3). Darüber hinaus könnte der Zinkfinger auch eine Rolle bei der Substraterkennung und Bindung während des mitochondrialen Proteinimports besitzen. Vorangegangene Ergebnisse aus Hefe zeigen, dass die Wegnahme von Zink mit Hilfe chelatierenden Agenzien den Import des ADP/ATP-Carriers als auch des Tim23-Vorstufenproteins beeinträchtigt (Paschen et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Möglicherweise ist dies nur ein indirekter Effekt, welcher primär durch die Missfaltung der kleinen Tim-Proteine bedingt ist.

Es gibt kontroverse Diskussionen darüber, ob die kleinen Tim-Proteine in ihrer physiologischen Umgebung tatsächlich Zink komplexieren. So zeigt eine kürzlich durchgeführte Untersuchung an aus Hefemitochondrien gereinigten γ Tim9/ γ Tim10-Komplexen keine Bindung von Zink (Curran et al., 2002a). Die Ergebnisse wurden so gedeutet, dass zwischen den Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste Disulfidbrücken ausgebildet werden. Verschiedene Punkte sprechen jedoch gegen diese Hypothese: Erstens ist davon auszugehen, dass im reduzierenden Milieu des Intermembranraumes intermolekulare Disulfidbrücken nicht stabil sind. Tatsächlich sind nur wenige Proteine im reduzierenden Milieu der Zelle bekannt, die stabile Disulfidbrücken ausbilden. Zweitens können Metall-Chelatoren wie z.B. EDTA oder o-Phenantrolin die Funktion der kleinen Tim-Proteine während des Import von Vorstufenproteinen reversibel beeinträchtigen (Lister et al., 2002; Paschen et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Im Falle der Existenz von Disulfidbrücken wäre die Hemmung durch Chelatoren nicht möglich. Vermutlich ist die Ausbildung von Disulfidbrücken auf die Oxidation der Sulfhydrylseitenketten bei der Reinigung der γ Tim9/ γ Tim10-Komplexe in Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen. In der Tat bleibt die Zinkbindungsfähigkeit von kleinen Tim-Proteinen erhalten, wenn diese zur Verhinderung der

Oxidation unter anaeroben (Stickstoff) Bedingungen aus Mitochondrien gereinigt werden, wie neueste Untersuchungen am γ Tim13-Protein zeigen (Lutz, 2003).

Eine Bildung transienter Disulfidbrücken, zumindest unter bestimmten Bedingungen, kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Ähnliches kennt man vom bakteriellen Hsp33-Protein: hier werden über vier konservierte Cysteinreste normalerweise Zink-Ionen komplexiert; kommt es zu einer Veränderung des Redox-Zustandes der Zelle, bilden sich zwischen den konservierten Cysteinresten Disulfidbrücken aus (Jakob et al., 2000).

4.2.3. Funktion des menschlichen DDP1/Tim13-Komplexes

In Analogie zur beschriebenen Funktion des γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes der Hefe wurde spekuliert, dass das menschliche Mohr-Tranebjaerg-Syndrom durch einen Defekt der mitochondrialen Biogenese verursacht wird (Davis et al., 2000; Leuenberger et al., 1999; Paschen et al., 2000). Bis vor kurzem jedoch gab es keine experimentellen Daten, die eine Funktion während des mitochondrialen Imports bestätigen konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der menschliche DDP1/Tim13-Komplex eine ähnliche Rolle wie der Hefe-Komplex beim Import von Tim23-Vorstufenproteinen ausübt. In diesem Zusammenhang wurden signifikante Unterschiede in den energetischen Voraussetzungen für einen effizienten Import des Tim23-Proteins der Hefe im Vergleich zum Import des humanen Tim23-Proteins aufgedeckt. Die Ergebnisse könnten erklären, warum der Funktionsverlust des DDP1-Proteins im Menschen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Biogenese der TIM23-Translokasekomponente und damit letztendlich zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom führt.

4.2.3.1. DDP1 und Tim13 sind funktionelle Orthologe von γ Tim8 und γ Tim13

Abhängig vom verwendeten Hefestamm hat die Disruption von *TIM8* und *TIM13* einen Wachstumsphänotyp zur Folge. So fand unsere Arbeitsgruppe, dass auf der Basis eines MB2-Wildtypstammes die Deletion beider Gene zu einem kaltesensitiven Wachstumsphänotyp auf Glukose führt (Paschen et al., 2000). Offensichtlich wirkt sich das Fehlen eines funktionellen γ Tim8/ γ Tim13-Komplexes eher bei niedrigen Temperaturen aus, wodurch Entropie-getriebene Protein-Protein Interaktionen verlangsamt werden und damit die Assemblierung von Proteinkomplexen beeinträchtigt ist (Hampsey, 1997). Darüber hinaus steht der ausschließlich auf Glukose beobachtete Wachstumsphänotyp im Einklang mit der Beobachtung, dass der Importdefekt der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante nur bei vermindertem Membranpotential zu Tage tritt. Das Wachstum auf Glukose bedingt ein

verringertes Membranpotential, das hauptsächlich durch die Funktion des ADP/ATP-Carriers aufrechterhalten wird, der unter diesen Bedingungen den Austausch von zytosolischem ATP gegen ADP der mitochondrialen Matrix vermittelt (Paschen et al., 2000).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann die Koexpression von DDP1 und Tim13 den Wachstumsphänotyp der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Doppeldisruptante komplementieren. Die beiden menschlichen Homologe sind in der Lage, zumindest teilweise, die Funktion von yTim8 und yTim13 zu übernehmen. Bei DDP1 und Tim13 handelt es sich somit um die bisher einzig bekannten menschlichen Translokase-Komponenten, die nicht nur strukturell, sondern auch funktionell im Hefesystem rekonstituiert werden können. So lassen sich beispielsweise die menschlichen Tim23- und Tim17-Proteine in der mitochondrialen Innenmembran der Hefe rekonstituieren; sie sind jedoch nicht in der Lage, die für das Wachstum essentiellen Funktionen der Hefekomponenten zu übernehmen (eigene Beobachtungen).

4.2.3.2. DDP1 und Tim13 assistieren beim Import von Tim23

Wie in der vorliegenden Arbeit experimentell bestätigt werden konnte, besitzt der DDP1/Tim13-Komplex - analog zur Funktion des yTim8/yTim13-Komplexes - eine Rolle während des Imports von Tim23. Zum einen war der DDP1/Tim13-Komplex in der Lage, den Importdefekt der $\Delta 8/\Delta 13$ -Disruptante zu komplementieren, zum anderen konnte eine direkte Wechselwirkung des endogenen DDP1/Tim13-Komplexes mit dem Tim23-Translokationsintermediat gezeigt werden. Wie schon zuvor für die Hefe konnte eine Funktion beim Import von Carrier-Proteinen für den menschlichen DDP1/Tim13-Komplex ausgeschlossen werden.

Trotz der funktionellen Homologie zeigten detaillierte Untersuchungen Unterschiede in den Mechanismen und Energieanforderungen des Imports von menschlichem Tim23 und Tim23 der Hefe. Wie beschrieben, ist der yTim8/yTim13-Komplex der Hefe nur unter ganz bestimmten energetischen Bedingungen für den Import von yTim23 in die mitochondriale Innenmembran erforderlich: während bei starkem Membranpotential die Unterstützung durch den yTim8/yTim13-Komplex für die Translokation entbehrlich ist, wird in Abwesenheit des Membranpotentials das Tim23-Vorstufenprotein nur partiell über die äußere Membran transportiert (Paschen et al., 2000). Die Translokation und Insertion von yTim23 in die Innenmembran ist unter diesen Bedingungen ineffizient. In dieser Situation scheint die Bindung des yTim8/yTim13-Komplexes notwendig, um das yTim23-Translokationsintermediat im Intermembranraum zu halten und dessen retrogrades Herausgleiten aus dem TOM-Komplex zu verhindern (Paschen et al., 2000). Vermutlich ist

der γ Tim8/ γ Tim13-Komplex in der Lage, die Importeffizienz zu erhöhen, indem es das im Intermembranraum stabilisierte Translokationsintermediat dem membranintegralen Anteil der TIM22-Maschinerie zuführt. Die Importuntersuchungen des humanen Tim23-Proteins zeigen ein anderes Bild: hier scheint der DDP1/Tim13-Komplex auch schon in Gegenwart eines Membranpotentials für den effizienten Import notwendig zu sein. In Abwesenheit eines Membranpotentials ist nahezu kein Import von hTim23 mehr nachweisbar.

Wie lassen sich die Unterschiede in den energetischen Voraussetzungen für den Import von menschlichem Tim23 und Hefe-Tim23 erklären?

Eine Erklärungsmöglichkeit lieferte die Analyse der Membranpotential ($\Delta\psi$)-abhängigen C-terminalen Importsignale von Mensch- und Hefe-Tim23. Während sich das $\Delta\psi$ -abhängige Importsignal des Tim23-Proteins der Hefe aus drei positiv geladenen Aminosäureresten zwischen den Transmembrandomänen drei und vier zusammensetzt (-F-K-S-S-K-G-L-K-P-M-) (Kaldi et al., 1998), besitzt das potentielle Importsignal des menschlichen Homologs an den korrespondierenden Positionen nur zwei Aminosäurereste mit einer positiven Ladung (-Y-K-C-T-G-G-L-R-G-) (Bauer et al., 1999a) (Abb.30).

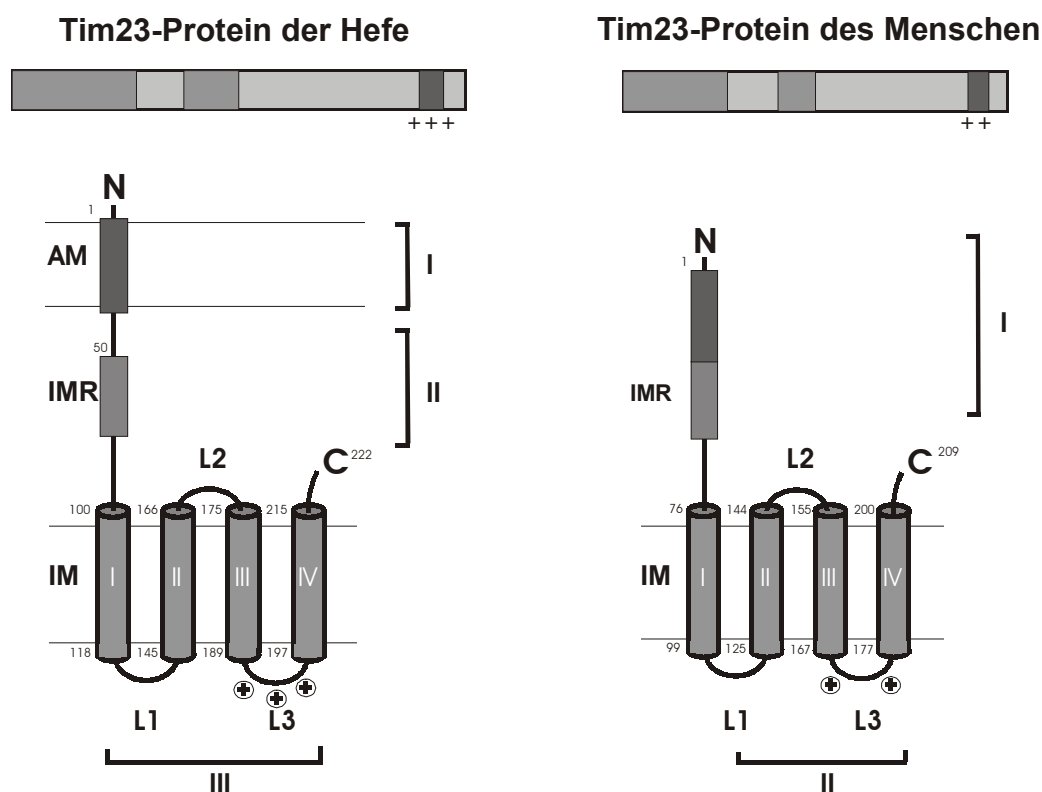


Abb.30: Schematische Darstellung des Tim23-Proteins der Hefe im Vergleich zum Tim23-Protein des Menschen. Es sind die verschiedenen Domänen des Tim23-Proteins (I-III bzw I-II) dargestellt. L1, L2 und L3 markieren die Schleifen zwischen den Transmembrandomänen (I-IV). Das C-terminale Importsignal liegt in der Matrix-lokalisierter Schleife L3.

Von der Hefe ist bekannt, dass in Anwesenheit eines Membranpotentials der effiziente Import und die Insertion von γ Tim23 in die Innenmembran allein durch das $\Delta\psi$ -abhängige C-terminale Importsignal gewährleistet wird (Paschen et al., 2000). Es kann spekuliert werden, dass das Fehlen einer positiven Ladung im menschlichen Tim23 zu einem schwächeren Importsignal führt, welches eine starke Abhängigkeit vom Membranpotential bewirkt und alleine keinen schnellen und effizienten Import gewährleisten kann. Dies würde erklären, warum der Import des menschlichen Tim23 zum einen generell stärker vom Vorhandensein eines Membranpotentials abhängig ist und zum anderen auch in Anwesenheit eines Membranpotentials auf die Unterstützung durch den DDP1/Tim13-Komplex angewiesen ist. Vorläufige experimentelle Daten unterstützen diese Erklärungsmöglichkeit: Wird das C-terminale Importsignal des humanen Tim23-Proteins durch das Importsignal des Hefe-Tim23 ersetzt, scheint der Import und die Insertionseffizienz im Vergleich zum menschlichen Wildtyp-Tim23-Protein gesteigert werden zu können (eigene Beobachtungen).

4.2.3.3. Implikationen für die Pathogenese des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms

Die höheren energetischen Voraussetzungen für den Import des humanen Tim23-Proteins geben auch eine mögliche Erklärung auf die Frage, warum eine in Hefe nicht essentielle Komponente im Menschen eine Erkrankung verursachen kann. Das in Abbildung 31 gezeigte Modell veranschaulicht, wie sich das Fehlen eines funktionellen DDP1-Proteins auf die Biogenese des TIM23-Komplexes auswirken könnte.

Dem menschlichen Mohr-Tranebjaerg-Syndrom könnte nach dieser Modellvorstellung ein ineffizienter Import von Tim23 in die innere Membran und damit eine erschwerte Biogenese des TIM23-Komplexes zu Grunde liegen. Als Konsequenz einer beeinträchtigten TIM23-Biogenese würde der Import von Vorstufenproteine in die mitochondriale Matrix generell gestört sein und in pleiotroper Weise mitochondriale Dysfunktionen nach sich ziehen. Ob die neurodegenerativen Veränderungen beim Mohr-Tranebjaerg-Syndrom tatsächlich durch eine verminderte Bildung des TIM23-Komplexes bedingt werden, lässt sich letztendlich nur mit Hilfe eines entsprechenden Säugetiermodells klären.

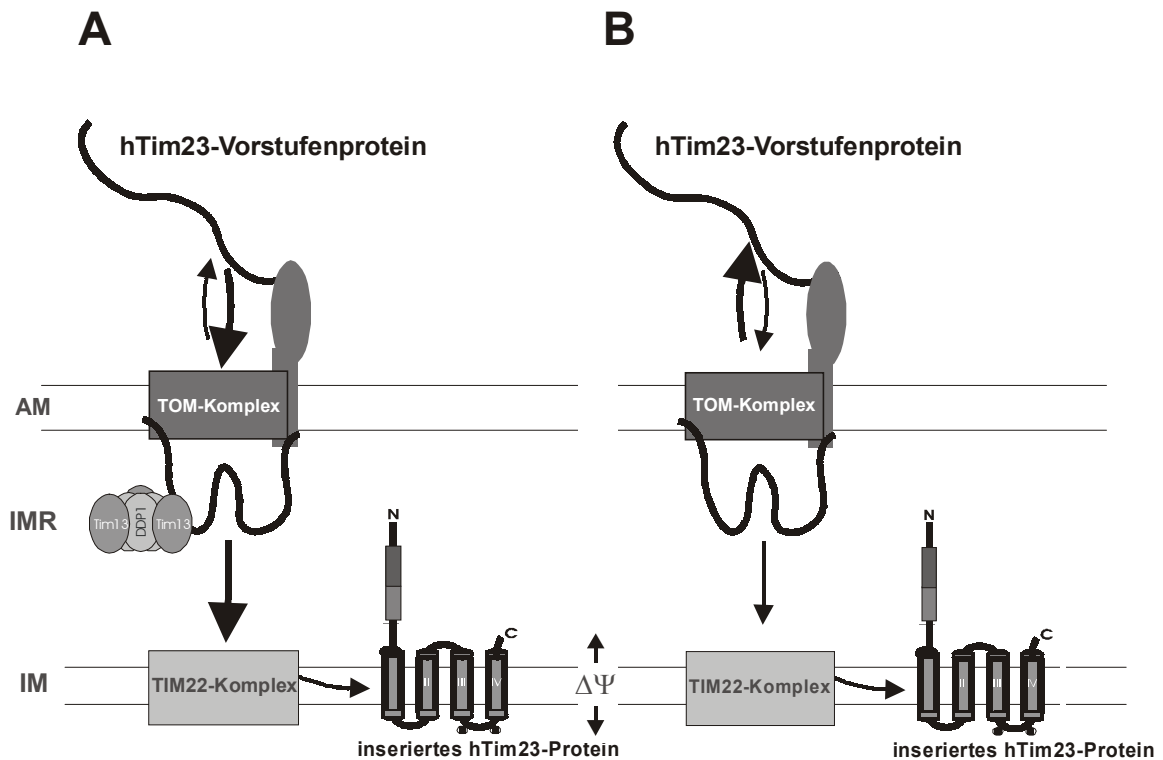


Abb. 31: Modell zur Funktion des DDP1/Tim13-Komplexes beim Import des humanen Tim23-Proteins

(A) Import von hTim23 in intakte Mitochondrien

Über Rezeptoren an die Außenmembran gebundenes hTim23-Vorstufenprotein wird über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transloziert und interagiert dort mit dem löslichen DDP1/Tim13-Komplex. Durch die Wechselwirkung wird die retrograde Translokation von hTim23 zurück ins Zytosol verhindert und das akkumulierte Translokationsintermediat kann über den TIM22-Komplex in Anwesenheit eines Membranpotentials ($\Delta\Psi$) in die mitochondriale Innenmembran inserieren.

(B) Import in Abwesenheit des DDP1/Tim13-Komplexes (Mohr-Tranebjaerg-Syndrom)

Durch das Fehlen eines DDP1/Tim13-Komplexes wird ein Zurückgleiten des translozierten hTim23-Proteins durch die Translokationspore nicht verhindert. hTim23 akkumuliert als Rezeptor-gebundenes Vorstufenprotein an der mitochondrialen Außenmembran. Aufgrund der reduzierten Menge an hTim23-Molekülen im Intermembranraum kommt es zur Beeinträchtigung der Insertion von hTim23 durch den TIM22-Komplex in die Innenmembran.

Bisherige Untersuchungen an MTS-Patienten zeigen, dass zumindest in mutierten Fibroblastenzellen keine Erniedrigung des Tim23-Proteingehaltes erkennbar ist; darüber hinaus finden sich weder in Fibroblasten noch in Skelettmuskelgewebe von MTS-Patienten pathogene Veränderungen der Struktur oder Funktion von Mitochondrien (Binder et al., 2003). Insbesondere waren keine OXPHOS-Enzymdefekte, eine sonst sehr häufige Ursache mitochondrialer Erkrankungen, feststellbar. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass sich das Fehlen von DDP1 möglicherweise nur in den spezifisch bei MTS betroffenen Zelltypen auswirkt; dies sind neuronale Zellen vor allem des Innenohrs, der Hirnrinde und der Basalganglien. Ähnliches kennt man von anderen mitochondrialen Erkrankungen wie z.B. dem Leigh-Syndrom, bei denen das zugrunde liegende Gen (*SURF-1*) zwar ubiquitär

exprimiert wird, allerdings der Funktionsverlust nur in bestimmten neuronalen Zellen des Zentralen Nervensystems zu degenerativen Veränderungen führt (Yao and Shoubridge, 1999). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der DDP1/Tim13-Komplex neben Tim23 noch den Import weiterer Substrate unterstützt. Die dem Tim23-Protein strukturell ähnlichen Innenmembranproteine Tim17 und Tim22 konnten dabei als potentielle Substrate ausgeschlossen werden. Weitere mögliche Substrate müssten systematisch im Hefemodell untersucht werden.

4.3. Auswirkungen einer C66W-Mutation im konservierten Cys₄-Motiv von DDP1

Nahezu alle bisher beschriebenen Mutationen im *DDP1*-Gen sind sogenannte *loss-of-function* Mutationen wie Stop-Mutationen, Insertionen oder Deletionen (siehe auch Tabelle 1). *Loss-of-function* Mutationen werden in der Regel schon auf mRNA-Ebene eliminiert und die Synthese verkürzter Proteine verhindert. Die bisher einzige bekannte *missense* Mutation führt zu einem Austausch eines Cysteins gegen ein Tryptophan an Aminosäureposition 66. (Tranebjaerg et al., 2000). RT-PCR Analysen des betroffenen Patienten konnten normale *DDP1*-Transkriptmengen nachweisen (Roesch et al., 2002), so dass die C66W-Mutation vermutlich als einzige unter den bekannten *DDP1*-Mutationen zu einem vollständigen Genprodukt führt. Phänotypisch unterscheidet sich dieser Patient jedoch nicht von MTS-Patienten mit *loss-of-function* Mutationen des *DDP1*-Gens.

Die C66W-Mutation mutiert das am nächstem am C-terminus gelegene Cystein der vier konservierten Cysteine innerhalb des Cys₄-Motiv. Die vermutete Konsequenz dieser Mutation - der Verlust der Fähigkeit, Zink zu binden - konnte mit Hilfe von Zinkbindungsmessungen an rekombinant exprimiertem DDP1^{C66W}-Protein experimentell bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die strukturellen und funktionellen Konsequenzen dieser Mutation genauer untersucht, insbesondere sollte der molekulare Mechanismus geklärt werden, der zum Funktionsverlust des DDP1-Proteins und zur Erkrankung führt.

Wie *in vivo* Analysen im Hefesystem zeigen konnten, hat die Zerstörung des Cys₄-Motivs einem vollständigen Funktionsverlust des DDP1-Proteins zur Folge. Das mutierte DDP1 verliert die Fähigkeit, sowohl den kaltesensitiven Wachstumsphänotyp als auch den Tim23-Importdefekt der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Deletionsmutante zu komplementieren. Die Analyse der Proteinmengen ergab, dass dieser Funktionsverlust offensichtlich auf einen drastisch reduzierten Proteingehalt des mutierten DDP1 in Mitochondrien zurückzuführen ist.

In vitro Importanalysen konnten ausschließen, dass die erniedrigte DDP1^{C66W}-Proteinmenge auf einen ineffizienten Import in Mitochondrien beruht. Vielmehr scheint das importierte und korrekt sortierte DDP1^{C66W}-Protein im Intermembranraum rasch degradiert zu werden. Diese Vermutung wird durch folgende Beobachtungen gestützt: (1) *In vitro* in Hefemitochondrien importiertes DDP1^{C66W}-Protein wird im Vergleich zu DDP1 bevorzugt durch endogene Proteasen degradiert. Von den im Intermembranraum lokalisierten AAA-Proteasen, wie z.B. Yme1p, ist bekannt, dass sie im Zuge einer Qualitätskontrolle fehlgefaltete, nicht assemblierte Proteine erkennen und rasch degradieren (Leonhard et al., 1996a; Leonhard et al., 1999). (2) Rekombinant exprimiertes DDP1^{C66W} zeigt im Vergleich zu DDP1 eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber Trypsin. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Untersuchung der Trypsin-Sensitivität von Hefe-Tim13, dessen Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden (Lutz, 2003). (3) Die Vorbehandlung des Wildtyp-DDP1-Proteins mit Metall-chelatierenden Agenzien wie EDTA oder o-Phenantrolin hat eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen zur Folge. Dies bedeutet, dass der Verlust der Zinkbindung, sei es durch die Zerstörung des Zinkfinger-Motivs oder durch Wegnahme der Zinkionen zu einer Fehl- oder Missfaltung und als Konsequenz, zu einer Degradation des DDP1-Proteins führt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bildung eines Cys₄-vermittelten Zinkfingers essentiell für die korrekte Faltung und die Stabilität des DDP1-Proteins im Intermembranraum ist. Darüber hinaus hat der Zinkfinger vermutlich eine wichtige Funktion für die Interaktion mit seinem Partnerprotein Tim13 und die Assemblierung in höhermolekulare Komplexe. *In vitro* Analysen an rekombinanten Proteinen konnten eindeutig zeigen, dass DDP1 jedoch nicht DDP1^{C66W} in der Lage ist, mit Tim13 zu interagieren. Unklar bleibt, ob letztendlich die Missfaltung oder der Assemblierungsdefekt des mutierten Proteins oder auch beides für die schnelle Degradation verantwortlich ist. Das mit der C66W-Mutation einhergehende Auftreten des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms scheint in jedem Fall auf das Fehlen funktioneller DDP1/Tim13-Komplexe im mitochondrialen Innenmembranraum zurückzugehen.

Die Entdeckung einer krankheitsrelevanten Mutation in einer am Proteinimport beteiligten Komponente impliziert einen völlig neuen Pathomechanismus mitochondrialer Erkrankungen. Durch die Aufklärung der molekularen Funktion des DDP1-Proteins beim Import hydrophober Vorstufenproteine in die mitochondriale Innenmembran konnte erstmals gezeigt werden, dass unabhängig von krankheitsrelevanten Mutationen in Struktur- und Funktionsgenen, wie z.B. den OXPHOS-Komponenten und den damit verbundenen "klassischen" Störungen der Energieproduktion, auch übergeordnete Mechanismen, wie die

des mitochondrialen Proteinimports zur Entstehung mitochondrialer Erkrankungen beitragen. Welche Auswirkungen das Fehlen eines funktionellen DDP1/Tim13-Komplexes und damit einer möglicherweise verminderten Biogenese der TIM23-Translokase auf die Funktion der Mitochondrien besitzt, bleibt noch zu klären. Die komplexen Zusammenhänge, die zur Entstehung der Degeneration distinkter neuronaler Zellen führen, können letztendlich nur an mehrzelligen Tiermodellen geklärt werden, die eine Analyse entwicklungs- und organspezifischer Veränderungen erlauben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mutationen im *TIMM8A/DDP1*-Gen verursachen das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS), eine X-chromosomal vererbte neurodegenerative Erkrankung, die durch eine progressive sensorineurale Taubheit, Dystonie, mentale Retardierung und kortikale Blindheit gekennzeichnet ist. Das *TIMM8A/DDP1*-Gen kodiert für ein kleines mitochondriales Protein, das "deafness dystonia peptide 1" (DDP1), welches strukturelle Ähnlichkeiten zu einer Familie kleiner Zinkfinger-Proteine aufweist, die in der Hefe *S.cerevisiae* am Import mitochondrialer Innenmembranproteine beteiligt sind. In der Hefe werden fünf Mitglieder dieser Proteinfamilie exprimiert: yTim9, yTim10, yTim12, yTim8 und yTim13. Allen gemeinsam ist ein konserviertes Cys₄-Metallbindungs-Motiv, das vermutlich zur Formation eines Zinkfingers beiträgt. Der Mensch kodiert dagegen für sechs kleine Tim-Proteine: ein Tim9-, zwei Tim10- (Tim10a, Tim10b), zwei Tim8- (DDP1, DDP2) und ein Tim13-Homolog. Schwerpunkt dieser Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des krankheitsassoziierten DDP1-Proteins.

Dabei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

DDP1, wie auch alle anderen im Rahmen dieser Arbeit identifizierten menschlichen kleinen Tim-Proteine, ist als lösliches Protein im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. In ähnlicher Weise wie die Hefe-Komponenten agieren die menschlichen kleinen Tim-Proteine in Form hetero-oligomerer Komplexe. Das MTS-assoziierte DDP1 assembliert zusammen mit seinem Partnerprotein Tim13 zu einem hetero-hexameren Komplex von 70 kDa. Die Funktion des DDP1/Tim13-Komplexes scheint evolutionär konserviert zu sein, da der in Hefe rekonstituierte menschliche Komplex in der Lage ist, den kältesensitiven Phänotyp einer $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Deletionsmutante zu komplementieren.

In gleicher Weise wie der yTim8/yTim13-Komplex der Hefe unterstützt der menschliche DDP1/Tim13-Komplex den mitochondrialen Import von Tim23-Vorstufenproteinen. Es gibt jedoch Unterschiede in den energetischen Erfordernissen zwischen höheren und niederen Eukaryonten: Während in der Hefe *S.cerevisiae* der Import von Tim23-Vorstufenproteinen nur bei einem erniedrigten Membranpotential über der Innenmembran durch den yTim8/yTim13-Komplex unterstützt wird (Paschen et al., 2000) ist das humane Tim23-Vorstufenprotein auch unter günstigen energetischen Bedingungen auf die Unterstützung durch den DDP1/Tim13-Komplex angewiesen. Diese Unterschiede können erklären, warum

eine in Hefe nicht-essentielle Komponente im Menschen mit einer progressiven neurodegenerativen Erkrankung assoziiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem die funktionellen und strukturellen Auswirkungen einer *missense* Mutation im *TIMM8A/DDP1*-Gen aufgeklärt. Durch die Mutation wird das dem C-terminus am nächsten gelegene Cystein der vier konservierten Cysteinreste (Cys₄-Motiv) des DDP1-Proteins gegen ein Tryptophan ausgetauscht (C66W-Mutation) (Tranebjaerg et al., 2000).

Die vier konservierten Cysteinreste vermitteln die koordinierte Bindung von Zinkionen in einem molaren Verhältnis von 1:1, was vermutlich zur Ausbildung einer Zinkfinger-Struktur führt. Die C66W-Mutation hat den vollständigen Verlust der Zinkbindungskapazität des DDP1-Proteins zur Folge. Das DDP1^{C66W}-Protein ist in der Hefe nicht funktionell und kann weder den kältesensitiven Phänotyp noch den Tim23-Importdefekt der $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Deletionsmutante komplementieren. Der Funktionsverlust scheint auf eine erhöhte Instabilität des mutierten Proteins zurückzugehen. Vermutlich kommt es durch die fehlende Ausbildung einer Zinkfingerstruktur zu einer Miss- bzw. Fehlfaltung des DDP1-Proteins und in Folge zur raschen Degradation im mitochondrialen Intermembranraum. Darüber hinaus hat die Zinkfingerstruktur eine wichtige Funktion für die Interaktion von DDP1 mit seinem Partnerprotein. DDP1^{C66W} ist nicht in der Lage mit Tim13 zu höhermolekularen Komplexen zu assemblieren. Dies kann erklären, warum die in einem MTS-Patienten beschriebene *missense* Mutation in ihrer Konsequenz - dem Fehlen von DDP1 - nicht von *loss-of-function* Mutationen, wie Stopmutationen, Insertionen/Deletionen zu unterscheiden ist (Tranebjaerg et al., 2000).

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. and Nussberger, S. (2001) Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **153**, 1151-1160.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Alconada, A., Kübrich, M., Moczko, M., Hönlinger, A. and Pfanner, N. (1995) The mitochondrial receptor complex: The small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 6196-6205.
- Alexander, C.V., M.; Pesch, U. E. A.; Thiselton, D. L.; Mayer, S.; Moore, A.; Rodriguez, M.; Kellner, U.; Leo-Kottler, B.; Auburger, G.; Bhattacharya, S. S.; Wissinger, B. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genetics*, **26**, 211-215.
- Attardi, G., Chomyn, A., Montoya, J. and Ojala, D. (1982) Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Cytogenet Cell Genet*, **32**, 85-98.
- Bauer, M.F., Gempel, K., Reichert, A.S., Rappold, G.A., Lichtner, P., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999a) Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase. *J Mol Biol*, **289**, 69-82.
- Bauer, M.F., Hofmann, I., Neupert, I. and Brunner, I. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol*, **10**, 25-31.
- Bauer, M.F. and Neupert, W. (1996) Protein Transport Across the Outer and Inner Membranes of Mitochondria. In W.N. Konings, H.R.K.a.J.S.L. (ed.), *Transport Processes in Membranes of Prokaryotic and Eukaryotic Organisms*. Elsevier, Oxford, New York, Munich, Tokyo, Vol. 2, pp. 791 - 822.
- Bauer, M.F., Rothbauer, U., N, M., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999b) The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-47.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, **87**, 33-41.

- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. and Brunner, M. (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81**, 1085-1093.
- Binder, J., Hofmann, S., Kreisel, S., Wohrle, J.C., Bazner, H., Krauss, J.K., Hennerici, M.G. and Bauer, M.F. (2003) Clinical and molecular findings in a patient with a novel mutation in the deafness-dystonia peptide (DDP1) gene. *Brain*, **126**, 1814-1820.
- Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B.S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. and Schatz, G. (1994) A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *Embo. J.*, **13**, 1998-2006.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995) Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *Embo J*, **14**, 6318-6326.
- Brix, J., Dietmeier, K. and 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.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423-1427.
- Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L.Hsu. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 3240.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Schmidt, E. and Koehler, C.M. (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol*, **158**, 1017-1027.
- Dahlseid, J.N., Lill, R., Green, J.M., Xu, X., Qiu, Y. and Pierce, S.K. (1994) PBP74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein. *Mol Biol Cell*, **5**, 1265-1275.
- Daum, G., Bohni, P.C. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 13028-13033.
- Davis, A.J., Sepuri, N.B., Holder, J., Johnson, A.E. and Jensen, R.E. (2000) Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol*, **150**, 1271-1282.
- de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A., de Baulny, H.O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P.

- and Rotig, A. (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet*, **29**, 57-60.
- Dekker, P.J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *Febs Lett*, **330**, 66-70.
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J. and 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., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 6515-6524.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B. and Lill, R. (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11752-11757.
- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. and Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*, **388**, 195-200.
- Dietmeier, K., Zara, V., Palmisano, A., Palmieri, F., Voos, W., Schlossmann, J., Moczko, M., Kispal, G. and Pfanner, N. (1993) Targeting and translocation of the phosphate carrier/p32 to the inner membrane of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **268**, 25958-25964.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol*, **122**, 1003-1012.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *Embo J*, **18**, 3214-3221.
- Gärtner, F., Voos, W., Querol, A., Miller, B.R., Craig, E.A., Cumsy, M.G. and 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.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.

- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.
- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, **80**, 11-14.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R.L. and Schatz, G. (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69**, 809-822.
- Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T. and Mihara, K. (1994) MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *Embo J*, **13**, 5146-5154.
- Hahne, K., Haucke, V., Ramage, L. and Schatz, G. (1994) Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments. *Cell*, **79**, 829-839.
- Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1099-1133.
- Hayes, M.W., Ouvrier, R.A., Evans, W., Somerville, E. and Morris, J.G. (1998) X-linked Dystonia-Deafness syndrome. *Mov Disord*, **13**, 303-308.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2250-2255.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J*, **16**, 2217-2226.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature*, **395**, 516-521.
- Hirashima, S., Hirai, H., Nakanishi, Y. and Natori, S. (1988) Molecular cloning and characterization of cDNA for eukaryotic transcription factor S-II. *J Biol Chem*, **263**, 3858-3863.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hoehfeld, J. and Hartl, F.U. (1994) Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J Cell Biol*, **126**, 305-315.
- Hofmann, S., Bauer, M.F. (2003) *Mitochondrial disorders*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Mühlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K.D., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2002) The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **277**, 23287-23293.

- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J*, **15**, 2125-2137.
- Hoogenraad NJ, Ward LA and MT, R. (2002) Import and Assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1592**, 97-105.
- Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schonfeld, H.J., Schatz, G. and Azem, A. (1997) Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *Embo J*, **16**, 1842-1849.
- Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N. and Pease, L.R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, **8**, 528-535.
- Horvath, R., Lochmuller, H., Stucka, R., Yao, J., Shoubbridge, E.A., Kim, S.H., Gerbitz, K.D. and Jaksch, M. (2000) Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 530-533.
- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. and Sclafani, R.A. (1989) Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene*, **83**, 57-64.
- Ishihara, N. and Mihara, K. (1998) Identification of the protein import components of the rat mitochondrial inner membrane, rTIM17, rTIM23, and rTIM44. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 722-732.
- Jakob, U., Eser, M. and Bardwell, J.C. (2000) Redox switch of hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J Biol Chem*, **275**, 38302-38310.
- Jarosch, E., Rodel, G. and Schweyen, R.J. (1997) A soluble 12-kDa protein of the mitochondrial intermembrane space, Mrs11p, is essential for mitochondrial biogenesis and viability of yeast cells. *Mol Gen Genet*, **255**, 157-165.
- Jarosch, E., Tuller, G., Daum, G., Waldherr, M., Voskova, A. and Schweyen, R.J. (1996) Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **271**, 17219-17225.
- Jensen, P.K. (1981) Nerve deafness: optic nerve atrophy, and dementia: a new X-linked recessive syndrome? *Am J Med Genet*, **9**, 55-60.
- Jensen, R.E. and Dunn, C.D. (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 25-34.
- Jin, H., Kendall, E., Freeman, T.C., Roberts, R.G. and Vetrie, D.L. (1999) The human family of Deafness/Dystonia peptide (DDP) related mitochondrial import proteins. *Genomics*, **61**, 259-267.
- Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S.H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S., Stevenson, R., Schwartz, C. and Vetrie, D. (1996) A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet*, **14**, 177-180.

- Kaldi, K., Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *Embo J*, **17**, 1569-1576.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, **139**, 1663-1675.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B. and Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, **11**, 103-116.
- Khyse-Anderson, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-207.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. and Schatz, G. (1999a) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-2146.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J*, **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Merchant, S. and Schatz, G. (1999b) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci*, **24**, 428-432.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000) Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 1187-1193.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. and Mihara, K. (1998) Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *Embo J*, **17**, 3886-3898.
- Komiya, T., Sakaguchi, M. and Mihara, K. (1996) Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *Embo J*, **15**, 399-407.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Muller, H., Jensen, R.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, **9**, 363-373.

- Kubrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M. and Pfanner, N. (1994) The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett*, **349**, 222-228.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Laity, J.H., Lee, B.M. and Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 39-46.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leonhard, K., Hermann, J.M., Stuart, R.A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T. (1996a) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surface comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *Embo J*, **15**, 4218-4229.
- Leonhard, K., Herrmann, J.M., Stuart, R.A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T. (1996b) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *Embo J*, **15**, 4218-4229.
- Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W. and Langer, T. (1999) Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature*, **398**, 348-351.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G. and Koehler, C.M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo J*, **18**, 4816-4822.
- Lill, R., Kispal, G., Künkele, K.-P., Mayer, A., Risse, B., Steiner, H., Heckmeyer, P., van der Klei, I. and Court, D.A. (1996) Protein transport into and across the mitochondrial outer membrane: Recognition, insertion and translocation of preproteins. In J.A.F. op den Kamp, e. (ed.). Springer-Verlag, Berlin
- Lister, R., Mowday, B., Whelan, J. and Millar, A.H. (2002) Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria. *Plant J*, **30**, 555-566.
- Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S. and Schatz, G. (1994) The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 11973-11977.
- Luciano, P., Vial, S., Vergnolle, M.A., Dyall, S.D., Robinson, D.R. and Tokatlidis, K. (2001) Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *Embo J*, **20**, 4099-4106.
- Lutz, T., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, in press

- Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. and Meijer, M. (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *Embo J*, **11**, 3619-3628.
- Margulis, L. (1981) Symbiosis in Cell Evolution: Life and its Environment in the early earth. *Freemann, San Francisco*.
- Martin, J., Mahlke, K. and Pfanner, N. (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18051-18057.
- Mayer, A., Driessen, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995a) Purified and protein-loaded mitochondrial outer membrane vesicles for functional analysis of preprotein transport. *Methods Enzymol*, **260**, 252-263.
- Mayer, A., Nargang, F.E., Neupert, W. and Lill, R. (1995b) MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *Embo J*, **14**, 4204-4211.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, **21**, 2337-2348.
- Milisav, I., Moro, F., Neupert, W. and Brunner, M. (2001) Modular structure of the tim23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 25856-25861.
- Miller, J., McLachlan, A.D. and Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J*, **4**, 1609-1614.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2002) Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol*, **316**, 657-666.
- Mohr, J. and Mageroy, K. (1960) Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet. Statist. Med.*, **10**, 54- 62.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W. and Hell, K. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 816-825.
- Mori, M. and Terada, K. (1998) Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta*, **1403**, 12-27.
- Moro, F., Okamoto, K., Donzeau, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *J Biol Chem*, **277**, 6874-6880.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.-C., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) The TIM17-23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J*, **18**, 3667 - 36745.

- Murakami, K. and Mori, M. (1990) Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *Embo J.*, **9**, 3201-3208.
- Nargang, F.E., Künkele, K.P., Mayer, A., Ritzel, R.G., Neupert, W. and Lill, R. (1995) 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *Embo J.*, **14**, 1099-1108.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**, 555-565.
- Nunnari, J., Fox, D. and Walter, P. (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science*, **262**, 1997-2004.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J.*, **21**, 3659-3671.
- Olichon, A., Emorine, L., Descoins, E., Pelloquin L and Bricchese L, G.N., Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P. (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.*, **523**, 171-176.
- Palmieri, F. (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.*, **346**, 48-54.
- Palmieri, F., Bisaccia, F., Capobianco, L., Dolce, V., Fiermonte, G., Iacobazzi, V., Indiveri, C. and Palmieri, L. (1996) Mitochondrial metabolite transporters. *Biochim Biophys Acta.*, **1275**, 127-132.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J.*, **19**, 6392-6400.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2**, 339-349.
- Pfanner, N., Hartl, F.-U., Guiard, B. and Neupert, W. (1987) Mitochondrial precursor proteins are imported through a hydrophilic membrane environment. *Eur. J. Biochem.*, **169**, 289-293.
- Pfanner, N. and Wiedemann, N. (2002) Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol.*, **14**, 400-411.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. and Schatz, G. (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *Embo J.*, **12**, 4115-4123.
- Rapaport, D., Neupert, W. and Lill, R. (1997) Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *J Biol Chem.*, **272**, 18725-18731.
- Richter, D., Conley, M.E., Rohrer, J., Myers, L.A., Zahradka, K., Kelecic, J., Sertic, J. and Stavljenic-Rukavina, A. (2001) A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. *Pediatr Allergy Immunol.*, **12**, 107-111.

- Roesch, K., Curran, S.P., Tranebjaerg, L. and Koehler, C.M. (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*, **11**, 477-486.
- Rospert, S., Glick, B.S., Jenö, P., Schatz, G., Todd, M.J., Lorimer, G.H. and Viitanen, P.V. (1993) Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10967-10971.
- Rossmann, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. and Sbisà, E. (1995) Human mitochondrial tRNA processing. *J Biol Chem*, **270**, 12885-12891.
- Rothbauer, U., Hofmann, S., Muhlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2001) Role of the DDP1-hTim13 complex in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 37327-37334
- Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. and Neupert, W. (1994) Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, **77**, 249-259.
- Ryan, K.R., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1998) Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol Cell Biol*, **18**, 178-187.
- Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S. and Jensen, R.E. (1994) SMS1, a high-copy suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell*, **5**, 529-538.
- Ryan, M.T. and Pfanner, N. (2001) Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv Protein Chem*, **59**, 223-242.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press, New York*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223 - 231.
- Schatz, G. (1996) The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem*, **271**, 31763-31766.
- Schatz, G. (1997) Just follow the acid chain. *Nature*, **388**, 121-122.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **271**, 1519-1526.

- Scherer, P.E., Krieg, U.C., Hwang, S.T., Vestweber, D. and Schatz, G. (1990) A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kD mitochondrial stress protein. *Embo J.*, **9**, 4315-4322.
- Scherer, P.E., Manning, K.U., Jenö, P., Schatz, G. and Horst, M. (1992) Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 11930-11934.
- Schneider, A. (1991) Mitochondrial inner membrane protease I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Cell Biol.*, **34**, 401-407.
- Schneider, H.-C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Scribanu, N. and Kennedy, C. (1976) Familial syndrome with dystonia, neural deafness, and possible intellectual impairment: clinical course and pathological findings. *Adv Neurol*, **14**, 235-243.
- Shah, Z.H., Hakkaart, G.A., Arku, B., de Jong, L., van der Spek, H., Grivell, L.A. and Jacobs, H.T. (2000) The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett*, **478**, 267-270.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. and Neupert, W. (1989) MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell*, **59**, 1061-1070.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ATP/ADP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nussberger, S., Neupert, W. and Rapaport, D. (2000) Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *Embo J.*, **19**, 4895-4902.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. and Itakura, K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6613-6617.
- Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A. and Mihara, K. (2000) Characterization of rat TOM40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **275**, 37930-37936.
- Swerdlow, R.H. and Wooten, G.F. (2001) A novel deafness/dystonia peptide gene mutation that causes dystonia in female carriers of Mohr-Tranebjaerg syndrome. *Ann Neurol*, **50**, 537-540.

- Terada, K., Kanazawa, M., Bukau, B. and Mori, M. (1997) The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *J Cell Biol*, **139**, 1089-1095.
- Terada, K. and Mori, M. (2000) Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. *J Biol Chem*, **275**, 24728-24734.
- Terada, K., Ohtsuka, K., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Mori, M. (1995) Role of heat shock cognate 70 protein in import of ornithine transcarbamylase precursor into mammalian mitochondria. *Mol Cell Biol*, **15**, 3708-3713.
- Terada, K., Ueda, I., Ohtsuka, K., Oda, T., Ichiyama, A. and Mori, M. (1996) The requirement of heat shock cognate 70 protein for mitochondrial import varies among precursor proteins and depends on precursor length. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6103-6109.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tranebjaerg, L., Hamel, B.C., Gabreels, F.J., Renier, W.O. and Van Ghelue, M. (2000) A de novo missense mutation in a critical domain of the X-linked DDP gene causes the typical deafness-dystonia-optic atrophy syndrome. *Eur J Hum Genet*, **8**, 464-467.
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R.E., May, M., Arena, F. and Barker, D. (1995) A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet*, **32**, 257-263.
- Tranebjaerg, L., van Ghelue, M., Nilssen, O., Hodes, M.E., Dlouhy, S.R., Farlow, M.R., Hamel, B., Arts, W.F.M., Jankovic, J., Beach, J. and Jensen, P.K.A. (1997) Jensen syndrome is allelic to Mohr-Tranebjaerg syndrome and both are caused by stop mutations in the DDP gene. *Am J Hum Genet*, **61**, A349.
- Truscott, K.N., Wiedemann, N., Rehling, P., Muller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. and Guiard, B. (2002) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 7780-7789.
- Ujike, H., Tanabe, Y., Takehisa, Y., Hayabara, T. and Kuroda, S. (2001) A family with X-linked dystonia-deafness syndrome with a novel mutation of the DDP gene. *Arch Neurol*, **58**, 1004-1007.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.
- Von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J*, **5**, 1335-1342.
- Waldherr, M., Ragnini, A., Jank, B., Teply, R., Wiesenberger, G. and Schweyen, R.J. (1993) A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr Genet*, **24**, 301-306.

- Wallace, D. (2001) Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Mental Retardation and Developmental Disabilities*, **7**, 158-166.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Westermann, B., Gaume, B., Herrmann, J.M., Neupert, W. and Schwarz, E. (1996) Role of the mitochondrial DnaJ homologue Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7063-7071.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995a) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *Embo J*, **14**, 3452-3460.
- Westermann, B., Prip-Buus C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995b) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and folding in mitochondria. *Embo J*, **14**, 3452-3460.
- Yaffe, M.P. (1999) Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*, **1**, E149-150.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**, 519-528.
- Yao, J. and Shoubridge, E.A. (1999) Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, **8**, 2541-2549.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Wang, J., Chevrette, M., Brown, G.K., Brown, R.M. and Shoubridge, E.A. (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*, **20**, 337-343.

Lebenslauf

Ulrich Rothbauer

- 14.10.1970 geboren in München
- 1977-1980 Besuch der Grundschule, Unterföhring
- 1980-1990 Besuch des Luitpold-Gymnasiums, München
- Mai 1990 Abitur
- Nov.1990 - Jan. 1992 Zivildienst bei der Münchener Jugendförderung,
Feldmoching
- Okt.1992 - März 1997 Studium der Biologie an der LMU, München
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Mikrobiologie, Humangenetik,
Pharmakologie/Toxikologie
- April 1997 - Feb. 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. S.Pääbo
Institut für Zoologie, LMU, München
"Untersuchungen zur *in vitro* Prozessierung von tRNA-
Transkripten im Mitochondrium des Menschen"
- Mai 1998 - Mai. 1999 Fortführende Arbeiten bei Prof. Dr. S. Pääbo
- Juli 1999 Beginn der vorliegenden Arbeit im Labor von
Prof. Dr. Dr. W. Neupert in der Arbeitsgruppe
von PD. Dr. Mathias Bauer am Institut für
Diabetesforschung, München

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die lehrreiche Zeit an seinem Institut, sein fortwährendes Interesse am Projekt und seine fachlichen Hilfestellungen, die wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen zwei Betreuern bedanken:

PD. Dr. Mathias Bauer, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Durch seine vielfältigen Ideen, seiner konstruktiven Kritik sowie seinem wissenschaftlichem Verständnis hatte er einen entscheidenden Anteil am Gelingen meiner Arbeit.

Dr. Sabine Hofmann danke ich für ihre engagierte Betreuung und Hilfsbereitschaft über die ganze Zeit hinweg in der diese Arbeit entstand. Besonders für ihre Gabe mich für die Wissenschaft zu begeistern, meine Launen zu ertragen und meine unzählige Fragen geduldigst zu beantworten.

Herrn Prof. Dr. Walter Schartau danke ich vielmals für die Bereitschaft meine Dissertation an der Fakultät für Biologie zu vertreten, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine immer freundliche Beratung und Unterstützung

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen wissenschaftlichen Kollegen Nicole Mühlenbein, Tom Lutz, Kai-Stefan Dimmer und Stefan Meier für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre. Hervorheben möchte ich dabei Bettina Treske, die durch ihre freundlich, kompetente Art den Laboralltag verschönerte.

Ganz besonders möchte mich meinen Eltern für ihre immerwährende private Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Diese Arbeit widme ich meiner Frau Iris und meinem Sohn Mirko, den beiden liebsten Menschen auf meiner Welt.