



Funktionelle Charakterisierung
des mitochondrialen
ABC-Transportkomplexes
MDL1
in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Simone Gompf aus Marburg/Lahn

Frankfurt am Main, 2007
(D30)

Dissertation

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation:

meinen Eltern

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Gompf, S., Zutz, A., Hofacker, M., Haase, W., van der Does, C. & Tampé, R.

Switching of the homooligomeric ABC transport complex MDL1 from posttranslational mitochondrial import to ER insertion.

FEBS Journal, in Revision, 2007

Hofacker, M., **Gompf, S.**, Zutz, A., Presenti, C., Haase, W., van der Does, C., Model, K. & Tampé, R.

Structural and Functional Fingerprint of the Mitochondrial ATP-Binding Cassette Transporter Mdl1 from Saccharomyces cerevisiae.

J. Biol. Chem., Vol. 282, No. 6, 3951-61, 2007

Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., **Gompf, S.**, van der Does, C. & Tampé, R.

The ATP Hydrolysis Cycle of the Nucleotide-binding Domain of the Mitochondrial ATP-binding Cassette Transporter Mdl1p.

J. Biol. Chem., Vol. 278, No. 29, 26862–9, 2003

Zusammenfassung

Für den mitochondrialen ABC-Transporter MDL1 (*multidrug resistance like*) aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Funktion als intrazellulärer Peptidexporter vorhergesagt. MDL1 ist wahrscheinlich am Export von Degradationsprodukten der m-AAA (*matrixoriented ATPases associated with a variety of cellular activities*) Protease in den Intermembranraum beteiligt (Young *et al.*, 2001). Das MDL1-Homodimer besteht aus zwei Transmembrandomänen mit jeweils sechs potentiellen α -Helices und zwei Nukleotidbindedomänen.

Eine Überexpression des ABC-Transporters in *E. coli* und *L. lactis* ist nicht möglich. Nur im homologen Expressionssystem kann eine bis zu 100-fach gesteigerte MDL1-Konzentration in Anwesenheit des induzierbaren *GAL1*-Promotors gegenüber dem endogenen Protein erreicht werden. Differentielle Zentrifugation, Immunogold-Markierungen und Proteasezugänglichkeitsexperimente zeigen, dass MDL1 ausschließlich in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist und die Nukleotidbindedomänen zur Matrix orientiert vorliegen. Mit Hilfe von Edman Sequenzierung des gereinigten His-*getaggt*en MDL1 wurde eine 59 Aminosäuren lange mitochondriale Leitsequenz identifiziert. Die Deletionsvariante MDL1(60-695) wird ausschließlich in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums exprimiert. Ihre Motordomänen liegen zytosolisch orientiert vor. Beide MDL1-Varianten bilden homooligomere Komplexe vergleichbarer Größe und weisen ähnliche ATPase Aktivitäten auf. Die physiologischen Konsequenzen der Lokalisation in unterschiedlichen Membranen wurden in Zellen näher untersucht, deren mitochondrialer ABC-Transporter ATM1 (*ABC transporter of mitochondria*) deletiert ist. ATM1 ist von essentieller Bedeutung für die Biogenese zytosolischer Eisen/Schwefel-Proteine (Lill und Kispal, 2000). Der mitochondriale MDL1-Komplex kann zum Teil die ATM1-Funktion übernehmen, wohingegen ER-ständiges MDL1, als auch ATP Binde- und Hydrolyse inaktive Mutanten, den $\Delta atm1$ Wachstumsphänotyp nicht komplementieren können. Die physiologische Funktion von MDL1 ist somit eng mit der mitochondrialen Innenmembran und der Funktionalität des Proteins verbunden. Durch *in vivo* Komplementationsstudien wurden zwei mitochondriale ABC-Transporter ABCB10 und Pa_2_9660 aus *H. sapiens* bzw. *P. anserina* als funktionelle MDL1-Homologe identifiziert.

Summary

The mitochondrial ABC transporter MDL1 (multidrug resistance like) of *Saccharomyces cerevisiae* is postulated to be involved in the export of peptides, derived from proteolysis of non-assembled or misassembled respiratory chain complexes out of the mitochondrial matrix (Young *et al.*, 2001). MDL1 forms a homodimeric complex consisting of two transmembrane domains with six putative α -helices and two nucleotide-binding domains.

We could not achieve heterologous over-expression of MDL1 in the organisms *E. coli* and *L. lactis*. On the other hand a 100-fold homologous over-expression was possible in *S. cerevisiae*. In this case a plasmidborne copy of MDL1 under the control of the inducible *GAL1*-promoter was used. Subcellular fractionation, immunogold labeling and protease protection assays identified that MDL1 exclusively resides in the inner mitochondrial membrane with its motor domains focus to the matrix. By Edman sequencing of purified His-tagged MDL1 an N-terminal mitochondrial leader sequence of 59 residues was identified, which is cleaved off in the matrix. Strikingly, MDL1 which lacks its presequence is directed to tubulo-vesicular membranes resembling the endoplasmic reticulum, where the NBDs are located in the cytosol. Within both targeting routes, the ABC transporter maintains a default membrane insertion and assembly pathway leading to homooligomeric complexes of comparable sizes and similar activities in ATP hydrolysis. The physiological consequences of both targeting routes were elucidated in cells lacking the mitochondriale ABC transporter ATM1 (*ABC transporter of mitochondria*), which is essentiell for biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins (Lill und Kispal, 2000). The mitochondrial MDL1 complex can complement ATM1 function, whereas the ER-targeted version as well as MDL1 mutants deficient in ATP binding and hydrolysis cannot overcome the $\Delta atm1$ growth phenotyp. These findings demonstrate that the physiological function of the ABC transporter MDL1 is intimately linked to its correct targeting to the inner mitochondrial membrane. Furthermore, the human mitochondrial ABC-transporter ABCB10 as well as the MDL1 homolog in *P. anserina* can complement the ATM1 growth phenotyp.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Publikationen | 4 |
| Zusammenfassung | 5 |
| Summary | 6 |
| Inhaltsverzeichnis | 7 |
| 1. Einleitung | 11 |
| 2. Methoden | 31 |
| 2.1. Molekularbiologische Methoden | 31 |
| 2.1.1. Extraktion totaler RNA..... | 31 |
| 2.1.2. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion..... | 31 |
| 2.1.3. Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| 2.1.4. Präparation mitochondrialer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> | 33 |
| 2.1.5. Nachweis mitochondrialer DNA durch PCR-Amplifikation..... | 33 |
| 2.1.6. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> | 34 |
| 2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion | 34 |
| 2.1.8. Ortsspezifische Mutagenese | 35 |
| 2.1.9. Kolonie-PCR | 36 |
| 2.1.10. Ethanolfällung..... | 36 |
| 2.1.11. Restriktionsanalyse | 37 |
| 2.1.12. Ligation | 37 |
| 2.1.13. Präparation kompetenter <i>E. coli</i> | 37 |
| 2.1.14. Transformation von <i>E. coli</i> | 38 |
| 2.1.15. Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| 2.1.16. Analytische und präparative Gelelektrophorese | 39 |
| 2.1.17. Konzentrationsbestimmung von DNA..... | 40 |
| 2.1.18. Klonierungsstrategien..... | 40 |
| 2.1.18.1. Klonierungs- und Expressionsvektoren für <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.1.18.2. Klonierungs- und Expressionsvektoren für <i>S. cerevisiae</i> | 41 |
| 2.1.18.3. Konstruktion verschiedener <i>MDL1</i> -Plasmide | 41 |
| 2.1.18.4. <i>MDL1</i> -Expressionsplasmide für <i>E. coli</i> und <i>L. lactis</i> | 42 |
| 2.1.18.5. Klonierung von <i>MDL1</i> | 43 |
| 2.1.18.6. <i>MDL1</i> in p426- <i>GPD</i> | 44 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.1.18.7. | <i>MDL1</i> kontrolliert durch einen Glyzerin induzierbaren Promotor.. | 44 |
| 2.1.18.8. | <i>MDL1</i> in pYES2.1/V5-His-TOPO® | 44 |
| 2.1.18.9. | Punktmutationen im <i>MDL1</i> -Gen..... | 45 |
| 2.1.18.10. | Deletion der mitochondrialen Signalsequenz von <i>MDL1</i> | 46 |
| 2.1.18.11. | Mutationen in pMW142 | 48 |
| 2.1.18.12. | Klonierung mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern..... | 50 |
| 2.1.18.13. | Klonierung des MDL1-Homologs aus <i>Podospora anserina</i> | 51 |
| 2.1.18.14. | Chromosomale Integration in <i>S. cerevisiae</i> | 52 |
| 2.1.19. | DNA-Sequenzierung..... | 55 |
| 2.2. | Zellbiologische Methoden | 55 |
| 2.2.1. | Verwendete <i>E. coli</i> Stämme..... | 55 |
| 2.2.2. | Kultivierung von <i>E. coli</i> | 55 |
| 2.2.3. | Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Stämme | 56 |
| 2.2.4. | Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 56 |
| 2.2.5. | Konservierung von Bakterien und Hefen..... | 57 |
| 2.2.6. | Sporulation diploider Hefestämme | 57 |
| 2.2.7. | Tetradendissektion..... | 57 |
| 2.2.8. | Immunogold-Markierung von <i>S. cerevisiae</i> | 58 |
| 2.2.9. | 5-Fluoroorotsäure <i>shuffling</i> Methode | 59 |
| 2.2.10. | Membranpräparation | 60 |
| 2.2.11. | Mitochondrien- und Mikrosomenpräparation | 61 |
| 2.2.12. | Mitoplastenpräparation | 63 |
| 2.2.13. | Präparation von invertierten inneren mitochondrialen Vesikeln | 63 |
| 2.3. | Proteinbiochemische Methoden | 64 |
| 2.3.1. | Reinigung von MDL1 aus Mitochondrien | 64 |
| 2.3.2. | Reinigung von MDL1 aus Membranen..... | 65 |
| 2.3.3. | Gelfiltration von MDL1..... | 65 |
| 2.3.4. | Limitierter Trypsin- und Faktor Xa Verdau | 65 |
| 2.3.5. | <i>Tris</i> NTA(ATTO565) Bindung an His- <i>Tag</i> | 66 |
| 2.3.6. | ATPase Aktivitätsmessung | 66 |
| 2.3.7. | Peptidjodierung mit Na ¹²⁵ I | 67 |
| 2.3.8. | Peptidtransport..... | 68 |
| 2.3.9. | Bestimmung der Katalaseaktivität..... | 69 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 2.3.10. | Nukleotidbindung | 70 |
| 2.3.11. | Elektrophoretische Methoden | 70 |
| 2.3.11.1. | SDS-Gelelektrophorese | 70 |
| 2.3.11.2. | Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen | 71 |
| 2.3.11.3. | Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen | 71 |
| 2.3.11.4. | <i>Strippen</i> von Western Blot-Membranen | 72 |
| 2.3.11.5. | Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 72 |
| 2.3.12. | Proteinkonzentrationsbestimmung | 73 |
| 2.3.13. | Eisenquantifizierung | 74 |
| 2.4. | Immunologische Methoden | 74 |
| 2.4.1. | Antikörper | 74 |
| 2.4.2. | Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrozellulose-Membranen | 75 |
| 2.5. | Chemikalien | 76 |
| 2.6. | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 78 |
| 3. | Ergebnisse | 80 |
| 3.1. | Charakterisierung des ABC-Transporters MDL1 | 80 |
| 3.2. | Expression von MDL1 in heterologen Organismen | 80 |
| 3.3. | Expression von MDL1 im homologen Organismus | 82 |
| 3.4. | Überexpression von MDL1 in <i>S. cerevisiae</i> | 83 |
| 3.5. | Lokalisation von MDL1 | 86 |
| 3.6. | Membranorientierung von MDL1 | 87 |
| 3.7. | Solubilisierung und Reinigung von MDL1 aus Mitochondrien | 89 |
| 3.8. | ATPase Aktivität verschiedener MDL1-Mutanten | 90 |
| 3.9. | Identifizierung der mitochondrialen Signalsequenz von MDL1 | 92 |
| 3.10. | Lokalisation von MDL1(60-695) | 95 |
| 3.11. | Membranorientierung von MDL1(60-695) | 97 |
| 3.12. | Transportmessungen | 97 |
| 3.13. | Reinigung von MDL1 aus Gesamtmembranen | 100 |
| 3.14. | Homooligomere MDL1 und MDL1(60-695) Komplexbildung | 101 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.15. | Die physiologische Funktion von MDL1 | 104 |
| 3.16. | Funktionelles humanes Homolog von ATM1 | 120 |
| 3.17. | Funktionelles MDL1-Homolog aus <i>Podospora anserina</i> | 121 |
| 4. | <i>Diskussion</i> | 125 |
| 5. | <i>Ausblick</i> | 137 |
| 6. | <i>Literatur</i> | 142 |
| 7. | <i>Abkürzungen</i> | 156 |
| 8. | <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 159 |
| 9. | <i>Tabellenverzeichnis</i> | 161 |
| 10. | <i>Anhang</i> | 162 |
| 10.1. | Liste der verwendeten und generierten Plasmide | 162 |
| 10.2. | Generierte <i>S. cerevisiae</i> Stämme | 167 |
| 10.3. | Sequenzalignierung von MDL1 vs. humane ABCB Transporter..... | 167 |
| | <i>Danksagung</i> | 168 |
| | <i>Lebenslauf</i> | 170 |

1. Einleitung

ABC-Proteine: Vorkommen und Funktion

Vertreter von ABC (*ATP binding cassette*)-Proteinen kommen in allen drei Bereichen des Lebens (Bakteria, Archaea und Eukarya) vor (Higgins, 1992). Bakterien besitzen circa 80 verschiedene ABC-Transporter, die 2% ihres Genoms ausmachen. Das humane Genom kodiert mindestens 48 ABC-Proteine (Dean und Annilo, 2005). Hauptsächlich handelt es sich um Exporter für Entgiftungsprozesse. Aufgrund ihrer Genstruktur (Halb- oder Volltransporter), ihrer Domänenorganisation und Sequenzhomologien innerhalb der Nukleotidbinde- (NBD) und Transmembrandomäne (TMD) lassen sich die humanen ABC-Proteine in die sieben Unterfamilien ABCA bis ABCG unterteilen (Dean *et al.*, 2001). Die DNA von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert 30 ABC-Proteine. Aufgrund phylogenetischer Analysen werden diese Proteine in sechs Unterfamilien eingeteilt: MDR, PDR, MPR/CFTR, ALD, YEF3 und RLI.

| ABC-Protein | Topologie | Lokalisation |
|-------------------------|--|---------------------------------------|
| MDR Familie | | |
| STE6 | (TMD ₆ -NBD) ₂ | Plasmamembran, Golgi-Komplex, Endosom |
| ATM1 | TMD ₆ -NBD | Mitochondrium |
| SSH1/MDL2 | TMD ₆ -NBD | Mitochondrium |
| MDL1 | TMD ₆ -NBD | Mitochondrium |
| PDR Familie | | |
| PDR5/STS1/YDR1/LEM1 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran |
| PDR10 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran |
| PDR15 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran |
| SNQ2 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran |
| PDR12 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran |
| PDR11 | (NBD-TMD ₆) ₂ | Plasmamembran (?) |
| ADP1 | TMD ₂ -NBD-TMD ₇ | ? |
| YNR070w | (NBD-TMD ₆) ₂ | ? |
| YOR011w | (NBD-TMD ₆) ₂ | ? |
| YOL075c | (NBD-TMD ₆) ₂ | ? |
| MDR/CFTR Familie | | |
| YOR1 | (TMD ₆ -NBD) ₂ | Plasmamembran |
| YCF1 | (TMD ₆ -R-NBD) ₂ | Vakuole |
| YLL048c | (TMD ₆ -NBD) ₂ | Vakuole, ER (?) |
| YLL015w | (TMD ₆ -NBD) ₂ | ? |
| YHL035c | (TMD ₆ -NBD) ₂ | ? |
| YKR103w/YKR104w | (TMD ₆ -NBD) ₂ | ? |
| ALDp Familie | | |
| SSH2/PAL1/PXA1/PAT2 | TMD ₆ -NBD | Peroxisom |
| YKL741/PXA2/PAT1 | TMD ₆ -NBD | Peroxisom |

| ABC-Protein | Topologie | Lokalisation |
|-----------------------|------------------|-------------------|
| YEF3 Familie | | |
| YEF3 | NBD ₂ | Ribosom, Cytosol |
| GCN20 | NBD ₂ | Cytosol |
| YNL014w/HEF3 | NBD ₂ | Cytoplasma(?) |
| YPL226w | NBD ₂ | ? |
| YER036c | NBD ₂ | ? |
| RLI Familie | | |
| YDR091c | NBD ₂ | Cytosol, Zellkern |
| Andere Familie | | |
| YDR061w | NBD | ? |
| YFL028c | NBD | ? |

Tabelle 1 ABC-Proteine in *S. cerevisiae*

ABC-Proteine aus *S. cerevisiae* werden in sechs Unterfamilien eingeteilt. Die verschiedenen Proteine sind in allen Kompartimenten der Zelle lokalisiert und unterscheiden sich aufgrund ihrer Topologie. TMD, Transmembrandomäne; NBD, Nukleotidbindedomäne; R, regulatorische Domäne; abgewandelt aus (Bauer *et al.*, 1999).

Die ABC-Proteine der Hefe sind in der Zellmembran, den Membranen des Peroxisomes, der Vakuole, des Endoplasmatisches Retikulums (ER), des Golgi-Komplexes und des Mitochondriums, ebenso wie im Zytosol lokalisiert. Ihre Funktionen reichen von der Pheromonsekretion bis hin zur Detoxifizierung der Zelle (Bauer *et al.*, 1999; Decottignies und Goffeau, 1997).

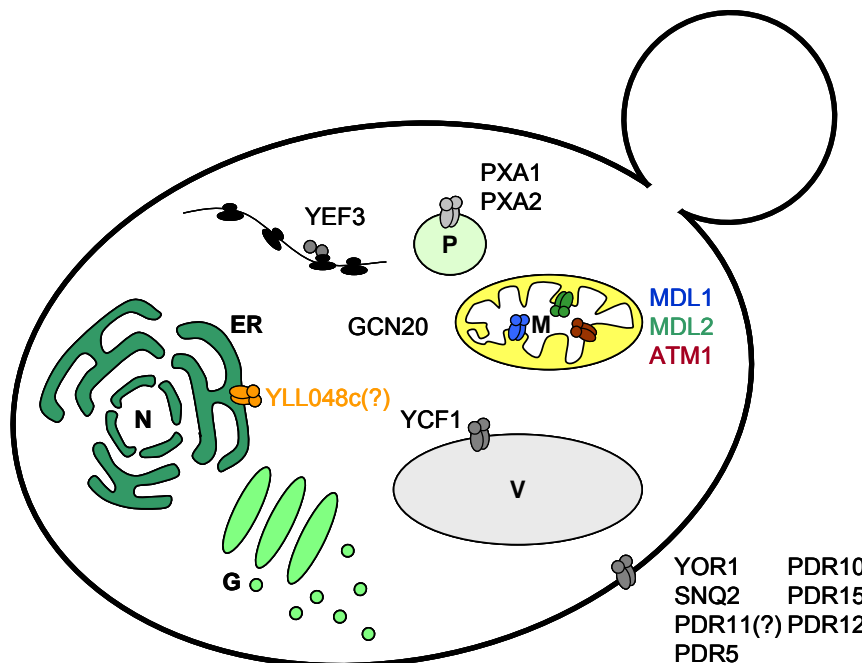


Abbildung 1 Subzelluläre Lokalisation von ABC-Proteinen in Hefe

ABC-Proteine in *S. cerevisiae* werden in allen Bereichen der Zelle gefunden. Im Mitochondrium sind MDL1, MDL2 und ATM1 lokalisiert. ER, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi-Apparat; M, Mitochondrium; N, Nukleus; P, Peroxisom; V, Vakuole.

ABC-Proteine aller Organismen können eine Vielzahl zellulärer Aufgaben wahrnehmen. Sie sind an der Nährstoffaufnahme, dem Lipidtransport, an der Ionen- und Osmolyt-Homöostase, sowie an der Antigenprozessierung beteiligt. Der Substrattransport stellt einen vektoriellen Prozess dar, der den Stoffaustausch und die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellkompartimenten, der Zelle und ihrer extrazellulären Umgebung, sowie den Zellen untereinander vermittelt. Vertreter der ABC-Proteine fungieren als Ionenkanal, Kanalregulator, Rezeptor, Sensor oder auch als Protease (Dean und Allikmets, 1995; Higgins, 1992; Kuchler und Thorner, 1992). ABC-Transporter sind primär aktive Transporter. Moleküle werden zum einen gegen ihren elektrochemischen Gradienten transportiert und zum anderen ist dieser Mechanismus direkt an die ATP-Hydrolyse gekoppelt. Sie nutzen die chemische Energie der ATP-Hydrolyse zum aktiven Transport einer Vielzahl chemischer Substanzen. Darunter befinden sich unter anderem Kohlenhydrate, Peptide, Proteine bis zu 110 kDa, Steroide, Antibiotika, Metallionen, sowie ein breites Spektrum an hydrophoben Substanzen. Die meisten ABC-Transporter weisen eine hohe Substratspezifität auf. Die Histidin-Permease ist zum Beispiel ausschließlich für die Translokation von Histidin über biologische Membranen verantwortlich. Im Gegensatz hierzu sind P-Glykoprotein und das bakterielle Homolog LmrA für den Transport verschiedenster hydrophober organischer Substanzen zuständig.

Mutationen innerhalb der ABC-Transportersequenzen können die Ursache schwerwiegender Krankheiten sein. Sie stehen im Zusammenhang mit verschiedenen (patho)physiologischen Prozessen, wie der Entstehung von Mukoviszidose durch eine Mutation im Gen des Chloridkanalproteins cystische Fibrose (Riordan, 2005), der Degeneration der Retina (Allikmets, 2000), Defekten des Transports von Cholesterol, Gallensäure und pflanzlichen Sterolen (Schmitz *et al.*, 2000; Sudhop und von Bergmann, 2004), der Adrenoleukodystrophie (ALD) (Mosser *et al.*, 1993) und der Ausbildung der Multidrogenresistenz nach Überexpression von P-Glykoprotein in Tumorzellen (Higgins, 1995).

Eukaryotische ABC-Transporter kommen meist als Halbtransporter, bei denen jeweils eine TMD und NBD auf einer Polypeptidkette synthetisiert wird, aber auch als Volltransporter mit jeweils zwei TMDs und NBDs pro Polypeptidkette vor (Hyde *et al.*, 1990). Vertreter der Halbtransporter sind P-Glykoprotein (P-gp, MDR1/TAP Familie, ABCB1), welcher für den Export vieler Chemotherapeutika aus der Zelle verantwortlich ist, TAP1/2 (*transporter associated with antigen processing*) und

MDL1, deren funktionelle Einheiten aus Hetero- bzw. Homodimer bestehen (Beismann-Driemeyer und Tampé, 2004; Young *et al.*, 2001). Zusätzlich kann eine weitere Domäne vorhanden sein. Beispielsweise besitzt der eukaryotische ABC-Transporter CFTR eine regulatorische Domäne zwischen den beiden homologen NBDs (Riordan *et al.*, 1989). Bakterien synthetisieren meist jede Domäne auf einer separaten Polypeptidkette, wie dies für die Histidin-Permease der Fall ist (Higgins, 1992), ebenso können die NBDs (im Falle von Ribose Transporter RbsA), oder aber die beiden TMDs (z.B. bei dem Eisen-Chelat-Transporter FhuB) fusioniert vorliegen. Eine verbesserte Substrataffinität wird durch zusätzliche periplasmatische Binde- oder Membranfusionsproteine erreicht (van der Heide und Poolman, 2002).

Alle bekannten ABC-Transporter besitzen trotz der Diversität der zu transportierenden Substrate eine Vier-Domänenstruktur. Typischerweise bestehen sie aus zwei Transmembrandomänen, die mit Hilfe von α -Helices die Membran durchspannen und dadurch den Translokationskanal bilden (Dean *et al.*, 2001). Ausnahmen des TMD-Aufbaus bilden z.B. SUR (*sulfonylurea receptor*), MRP1-3 und MRP6-7, die eine zusätzliche N-terminale Transmembrandomäne (TMD0) enthalten. Die Anzahl der Transmembranhelices innerhalb der ABC-Transporter ist unterschiedlich. Jede Transmembrandomäne des Pgp-Proteins (P-Glykoprotein, MDR1) enthält sechs Transmembranhelices (Chen *et al.*, 1986; Rosenberg *et al.*, 1997). Der Vitamin B12 Transporter BtuCDE aus *E. coli* besteht hingegen aus zehn α -Helices (Locher *et al.*, 2002) und für das humane TAP1 und TAP2 werden zehn bzw. neun Helices vorausgesagt (Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002). Die TMDs von ABC-Transportern verschiedener Organellen und Organismen weisen, wahrscheinlich aufgrund der Vielzahl zu transportierenden Substrate, nur wenige Sequenzhomologien auf (Holland und Blight, 1999). ABC-Transporter besitzen zwei hydrophile Nukleotidbindedomänen, die für die Energetisierung des Transportprozesses verantwortlich sind und innerhalb der Proteinfamilie eine große Homologie zeigen. Die NBD besteht aus ungefähr 250 Aminosäuren und fünf konservierten Strukturmotiven (Michaelis und Berkower, 1995; Walker *et al.*, 1982).

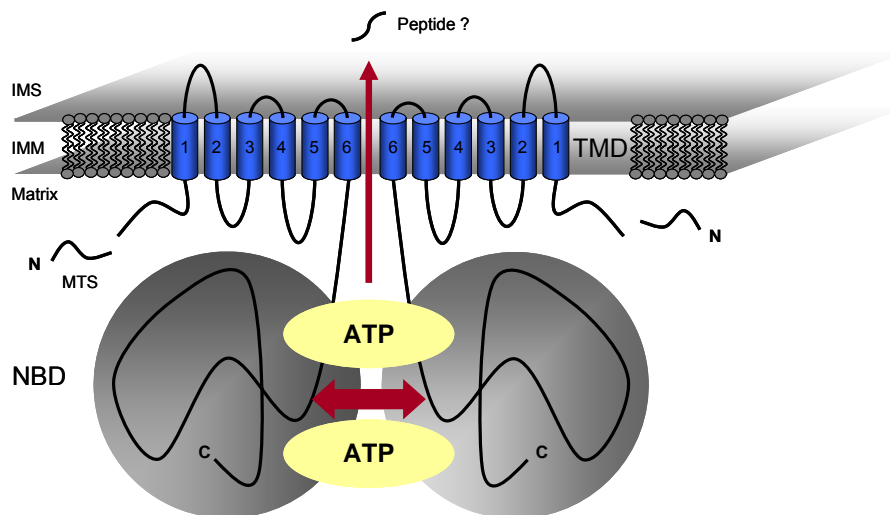


Abbildung 2 **Vorgeschlagene Membrantopologie eines ABC-Transporters**

Typischerweise besteht ein Halbseiten-ABC-Transporter aus sechs bis zehn membrandurchspannenden α -Helices pro Transmembrandomäne. Die beiden TMDs bilden den Translokationskanal durch den das Substrat die Membran passieren kann. Die Spezifität des Transporters wird durch die Substratbindestelle bestimmt. Die beiden hydrophilen NBDs sind für die Energetisierung, die ATP-Hydrolyse, des Transportvorganges verantwortlich. IMM, mitochondriale Innenmembran; IMS, Intermembranraum; MTS, mitochondriale Leitsequenz; NBD, Nukleotidbindedomäne; TMD, Transmembrandomäne.

Die Klassifizierung eines ABC-Transporters beruht einzig auf der jeweiligen Primärsequenz. Sind die hochkonservierten Struktur motive *Walker A* (Konsensussequenz Gxx(G)xxGKS/T, x steht für eine beliebige Aminosäure), *Walker B* (Konsensussequenz $\phi\phi\phi\phi$ D, ϕ steht für eine hydrophobe Aminosäure) (Walker *et al.*, 1982) und das Signaturmotiv (Konsensussequenz LSGGQ, auch C-Schleife genannt) vorhanden, spricht man von einem ABC-Transporter (Gottesman und Ambudkar, 2001). Diese Motive sind in erster Linie für ATP-Bindung und Hydrolyse verantwortlich. *Walker A* und *Walker B* sind jeweils fünf bis neun Aminosäuren lang und durch 90 bis 120 Aminosäuren voneinander getrennt (Dean *et al.*, 2001). Die C-Schleife befindet sich circa 25 Aminosäuren N-terminal des *Walker B*-Motivs. Ihre Anwesenheit bildet das entscheidende Unterscheidungskriterium zu anderen ATPasen. Weitere konservierte Aminosäuren und Schleifen, wie z.B. das als katalytische Base bezeichnete Glutamat C-terminal des *Walker B*-Motivs (Smith *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2002), die Q-Schleife, die unter Beteiligung eines Wassermoleküls eine Wasserstoffbrückenbildung zum γ -Phosphat des ATP vermittelt (Chen *et al.*, 2003a; Hung *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002), sowie die H- und D-Schleifen (Abele und Tampé, 2004; Zaitseva *et al.*, 2005a) befinden sich ebenfalls innerhalb der Nukleotidbindedomäne.

Der Mechanismus des ATP getriebenen Transports ist extrem komplex und wird bis heute kontrovers diskutiert. In den letzten Jahren haben hochauflösende Kristallstrukturen einiger NBDs in gebundenem und nicht-gebundenem Nukleotidzustand Einblick in mögliche Transportmechanismen geliefert (Davidson und Chen, 2004; Schmitt und Tampé, 2002). Mit Hilfe der isolierten MDL1-Nukleotidbindedomänen wird ein Modell für dessen ATP-Hydrolysezyklus vorgeschlagen (Janas *et al.*, 2003). Für die Wildtyp-NBDs wird ein $K_{M,ATP}$ von 0,6 mM, sowie eine ATP-Hydrolyserate von 25 ATP/min gemessen, wobei keine positive Kooperativität in Abhängigkeit der ATP-Konzentration vorliegt. Ein Hill-Koeffizient von 1,7 macht die Bildung eines Dimers während der ATP-Hydrolyse wahrscheinlich. Das Glutamat E599 liegt innerhalb der Familie der ABC-Transporter hoch konserviert vor. Seine Funktion während des Hydrolyseprozesses wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In allen Fällen gilt diese Mutante jedoch als hydrolyse- bzw. transportdefizient. Nach Inkubation unter „Nicht-Hydrolysebedingungen“ (4°C, in Abwesenheit von Mg^{2+}) sind zwei ATP-Moleküle im MDL1(E599Q)-NBD-Dimer gebunden. Wird die NBD-Mutante jedoch bei 30°C in Anwesenheit von Mg^{2+} inkubiert, enthält das isolierte Dimer ein ATP und ein ADP. Auch nach Inkubation über mehrere Stunden weist das Dimer keine zwei gebundenen ADP-Moleküle auf. Hierdurch wird deutlich, dass zumindest ein ATP-Molekül zur Aufrechterhaltung des Dimerkomplexes erforderlich ist. Die Hydrolyse beider Nukleotide führt zur Dissoziation. Eine weitere intermediäre Form der ATP-Hydrolyse kann mit der Wildtyp-NBD in Anwesenheit von MgATP und Beriliumfluorid (BeFx), einem Phosphatanalogon, isoliert werden, in der zwei ADP-Moleküle enthalten sind. Anhand dieser Daten wird der sequentielle Mechanismus des ATP-Hydrolysezykluses zweier MDL1-Nukleotidbindedomänen abgeleitet. Das vorgeschlagene *processive clamp* Modell (Abbildung 3) geht davon aus, dass zunächst beide NBDs jeweils ein ATP-Molekül binden, woraufhin die NBD-Dimerisation stattfindet. Nach Hydrolyse beider ATP-Moleküle wird Phosphat (Pi) freigesetzt, gefolgt von der Dissoziation des Dimers und der ADP-Abgabe.

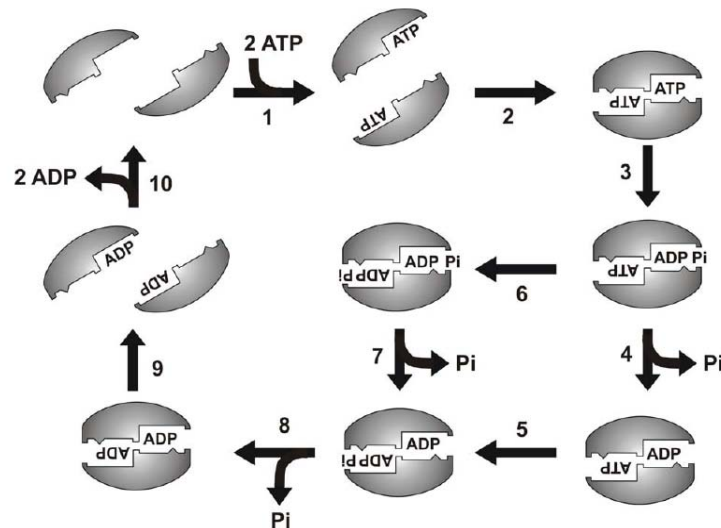


Abbildung 3 Modell des ATP-Hydrolysezyklus der MDL1-NBDs

Die Bindung von jeweils einem ATP-Molekül pro NBD (1) induziert die Bildung eines Dimers (2). Nach der ATP-Hydrolyse einer NBD (3) wird entweder das Phosphat (Pi) freigesetzt (4), gefolgt von der Hydrolyse des zweiten gebundenen ATPs (5), oder es kommt direkt zur Hydrolyse des zweiten ATPs (6) mit anschließender Freisetzung der beiden gebildeten Phosphate (7, 8). Daraufhin erfolgt die Dissoziation des dimeren Komplexes (9) und die Freisetzung der beiden ADPs (10) (Janas *et al.*, 2003).

Die generelle Struktur der NBDs verschiedener ABC-Transporter ist sehr ähnlich (Schmitt und Tampé, 2002). Sie bilden ein L-förmiges Molekül, bestehend aus den Armen I und II. Die katalytische Domäne (Arm I) besitzt eine α/β -Struktur und beinhaltet die Nukleotidbindedomäne, einschließlich der *Walker A* und *B*-Motive. Zusätzlich fungieren D- und H-Schleife als Schalterregionen. Von Arm II wird eine α -helikale Struktur ausgebildet, die die C- und Q-Schleifen beinhaltet. Strukturelle und biochemische Daten zeigen in Anwesenheit von MgATP die Dimerisierung der beiden NBDs in einer *head-to-tail* Orientierung (Chen *et al.*, 2003a; Janas *et al.*, 2003; Loo *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Während diesem Zustand befinden sich zwei ATP-Moleküle jeweils zwischen dem *Walker A* und *B*-Motiv der einen NBD und der C-Schleife der zweiten NBD. Das sich dem *Walker A*-Motiv anschließende Glutamat könnte als katalytische Base während der ATP-Hydrolyse fungieren und somit die Koordination zwischen Wasser und γ -Phosphat gewährleisten (Moody *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2003). Die Anwesenheit von zwei Molekülen ATP hat zur Folge, dass beide Bindetaschen gemeinsam agieren und die Energien aus ATP-Bindung und Formation des geschlossenen NBD-Dimers innerhalb eines Transportzyklus benutzt werden (Yuan *et al.*, 2003). Die Kristallstruktur der HlyB-NBD zeigt, dass das konservierte Histidin der H-Schleife (H662) eine wichtige Rolle bei der ATP-Hydrolyse spielt. Histidin und konserviertes

Glutamat bilden eine katalytische Einheit (Zaitseva *et al.*, 2005a). Mutationen des konservierten Histidins verhindern bei Histidin- und Maltose-Importern die ATPase Aktivität (Davidson und Sharma, 1997; Nikaido und Ames, 1999; Shyamala *et al.*, 1991).

Zur Zeit sind drei Röntgenkristall-Strukturen bakterieller ABC-Transporter bekannt: zwei PBP abhängige Importer, BtuCD aus *Escherichia coli*, welcher für den Transport von Vitamin B12 verantwortlich ist (Locher *et al.*, 2002) und HI1470/1 aus *Haemophilus influenzae*, der wahrscheinlich Metallchelate transportiert (Pinkett *et al.*, 2007). Die dritte Struktur zeigt den Exporter Sav1866 aus *Staphylococcus aureus* (Dawson und Locher, 2006). Die vier Kerndomänen der Importer werden auf separaten Polypeptidketten synthetisiert und bilden einen Komplex aus homodimeren TMDs und NBDs. Sav1866 ist ein Halbtransporter mit nur einer TMD und NBD je Polypeptidkette. Er fungiert aber ebenso als Homodimer. Die TMDs aller drei Proteine durchspannen die Lipidmembranen als α -Helices. Weitere Ähnlichkeiten sind zwischen den ABC-Transportern nicht zu finden. BtuCD und HI1470/1 durchspannen die Membran zehnmal pro Domäne, wohingegen Sav1866 nur sechs Transmembranhelices pro TMD besitzt. Die intrazellulären Schleifen (ICLs) von BtuCD und HI1470/1 sind kurz und die NBDs befinden sich dicht an der Membran. Die ICLs von Sav1866 sind sehr viel länger. Sie reichen als helikale Verlängerungen der Transmembranhelices in das Cytoplasma hinein. Die Strukturen von BtuCD und HI1470/1 sind ähnlich, aber nicht identisch. Beide wurden in Abwesenheit von Nukleotiden kristallisiert. Im Zentrum der TMD-TMD von BtuCD befindet sich eine wässrige Kontaktfläche, welche sich zur extrazellulären Seite des Proteins öffnet. Innerhalb von HI1470/1 ist diese zur intrazellulären Seite des Proteins geöffnet, wodurch der Eindruck einer intrazellulären Ligandenabgabe vermittelt wird. Diese beiden Strukturen sind möglicherweise gute Modelle der Konformationsänderung die von den TMDs während des Transportprozesses erwartet wird.

Mitochondriale ABC-Transporter in der Hefe *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* werden drei mitochondriale ABC-Transporter beschrieben (Lill und Kispal, 2001), deren strukturelle und funktionelle Eigenschaften bis heute kaum verstanden sind: ATM1 (*ABC transporter of mitochondria*), MDL1 und MDL2.

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, die nur durch

Teilung entstehen. Die Morphologie eines Mitochondriums ist vielgestaltig. Es handelt sich vorwiegend um längliche, zylinderförmige Zellorganellen von 0,5 bis 1 µm Durchmesser. Sie werden durch zwei Membranen in vier Subkompartimente unterteilt: die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix. Die Innenmembran umschließt die Matrix, wohingegen die Außenmembran eine Barriere zwischen Zytosol und Intermembranraum bildet. In der Innenmembran befinden sich die Komponenten der Elektronentransportkette sowie die ATP-Synthase. Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die oxidative Phosphorylierung: die Energiegewinnung durch Oxidation energiereicher organischer Stoffe, wie Fette und Kohlenhydrate, zur Bildung der energiereichen Verbindung Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Innerhalb der Matrix finden viele Prozesse des Zellstoffwechsels statt. Neben dem Zitronensäurezyklus, Fettsäurestoffwechsel und der Biosynthese verschiedener Aminosäuren sind die Enzyme des Harnstoffzyklus, des Nukleotidstoffwechsels, der Eisen/Schwefel-Proteinsynthese und Hämbiosynthese vorhanden. Aufgrund dieses vielfältigen Aufgabenspektrums besitzen Mitochondrien zwischen 800 und 1.500 verschiedene Proteine (Sickmann *et al.*, 2003; Sickmann und Alzheimer, 2003; Taylor *et al.*, 2003). Eine große Anzahl der Proteine nimmt an metabolischen Prozessen teil, entweder als Enzym oder Transporter, um Metabolite zwischen Zytosol und Matrix auszutauschen (de Winde und Grivell, 1993; el Moualij *et al.*, 1997).

Mehr als hundert mitochondriale Proteine sind an der Biosynthese der Organellen selbst beteiligt. Sie nehmen Teil an der Membraninsertion und Faltung von Vorläuferproteinen, die nuklear kodiert und im Zytosol translatiert werden (Lill *et al.*, 1996; Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 1997; Schatz und Dobberstein, 1996). Andere Proteine sind für die Synthese, Erhaltung und Transkription der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (mtDNA) verantwortlich. Auch die Assemblierung von makromolekularen Komplexen und die Integration von Kofaktoren in die entsprechenden Apoproteine werden durch mitochondriale Proteine vermittelt. All diese Prozesse finden ausschließlich im Mitochondrium statt.

Der mitochondriale Proteinimport

Die mtDNA aus *S. cerevisiae* kodiert nur wenige mitochondriale Gene (Grivell, 1989). Hierzu gehören die acht Proteine: VAR1, eine mitochondriale Ribosomenuntereinheit, drei Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase (COX1, COX2,

COX3), Cytochrom b und die Untereinheiten 6, 8 und 9 der F_1F_0 ATP-Synthase. Neben den acht Proteinen werden noch fünf RNA (Ribonukleinsäure) Arten des mitochondrialen Proteinbiosynthese Apparates kodiert. Obwohl im Mitochondrium die komplette Transkriptions- und Translationsmaschinerie vorhanden ist, werden mitochondriale Proteine fast ausschließlich durch nukleare Gene kodiert und als Vorläuferproteine mit Hilfe von zytosolischen Ribosomen synthetisiert (Endo *et al.*, 2003; Herrmann und Neupert, 2000; Jensen und Dunn, 2002; Koehler, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004). Anschließend werden sie aktiv in die Mitochondrien transportiert. Dieser essentielle Importprozess wurde vor allem in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und dem Roten Brotschimmel *Neurospora crassa* untersucht (Herrmann und Neupert, 2000; Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 1997). Die Importreaktion kann auf unterschiedliche Weise ablaufen, abhängig von dem jeweiligen Bestimmungsort der Proteine. Unterteilt werden die verschiedenen Prozesse in den *presequence pathway* für den Import matrixständiger Proteine, einem *pathway* der der Verteilung und Assemblierung von Proteinen der Außenmembran zugeordnet wird und dem *carrier pathway* für den Import hydrophober Innenmembranproteine (Pfanner *et al.*, 2004). Proteine der Innenmembran besitzen eine N-terminale mitochondriale Leitsequenz (MTS, *mitochondrial targeting sequence*). Die klassische Leitsequenz besteht aus 20 bis 35 Aminosäuren (Neupert, 1997) und einer Anreicherung von basischen, hydrophoben und hydroxylierten Resten (Schatz und Dobberstein, 1996). Wahrscheinlich nimmt diese Leitsequenz eine definierte Sekundärstruktur ein, die aufgrund der Verteilung von geladenen und apolaren Resten entscheidend für den Proteinimport ist. Der N-terminale Abschnitt der MTS bildet eine positiv geladene amphiphile α -Helix oder ein β -Faltblatt aus, wohingegen die C-terminale Region wahrscheinlich als eine Erkennungssequenz für matrixständige Proteasen fungiert (Gavel und von Heijne, 1990; Neupert, 1997). Bevorzugte Aminosäuren wurden N-terminal vom reifen Aminoterminus gefunden (Hendrick *et al.*, 1989). Insbesondere kommt Arginin häufig an den Positionen -2, -3, -10 und -11 relativ zur Schnittstelle vor.

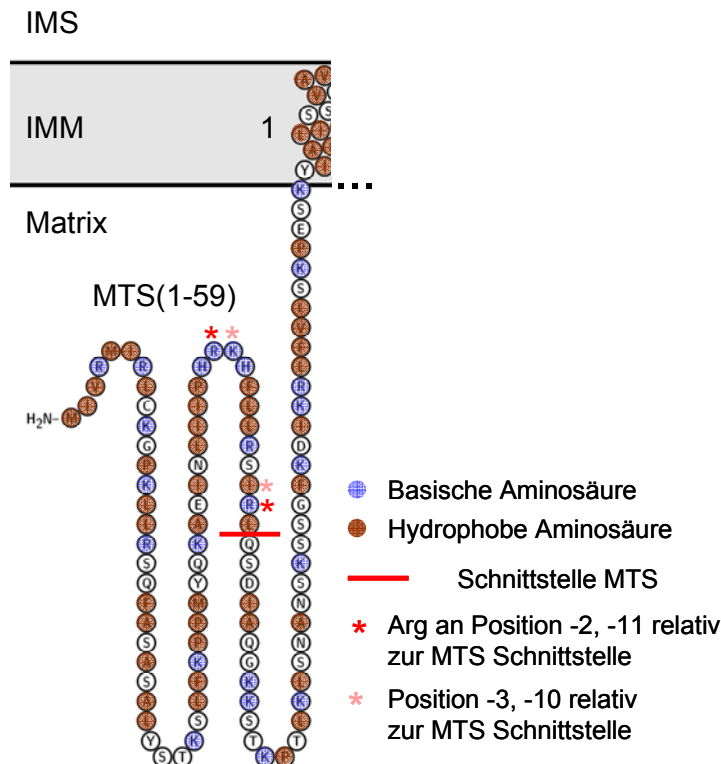


Abbildung 4

Aminosäureverteilung innerhalb der MDL1-MTS

Proteine der mitochondrialen Innenmembran, besitzen meist eine klassische mitochondriale Leitsequenz die Anreicherungen basischer, hydrophober und hydroxylierter Reste beinhaltet. An den Positionen -2, -3, -10 und -11 relativ zur Schnittstelle befindet sich bevorzugt die Aminosäure Arginin (Hendrick *et al.*, 1989; Schatz und Dobberstein, 1996). Im Falle der 59 Aminosäuren langen MDL1-MTS sind basische und hydrophobe Aminosäuren zu finden, ebenso wie Arginin an Position -2 und -11 relativ zur bestimmten MTS Schnittstelle.

Die Leitsequenz interagiert an der mitochondrialen Außenmembran mit Rezeptoren des TOM (*translocase of the outer membrane*) Komplexes, der sich aus mindestens acht unterschiedlichen Membranproteinen zusammensetzt, die nach ihrem errechneten Molekulargewicht benannt werden. Der TOM-Komplex ist für die Translokation der Vorläuferproteine zu dem innenmembranständigen TIM23 (*translocase of the inner mitochondrial membrane*) Komplex verantwortlich. Der PAM (*presequence translocase associated motor*) Komplex ist direkt an TIM23 angeschlossen und komplementiert die Translokation des Vorläuferproteins in die Matrix. Dort wird die Leitsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) entfernt. Anschließend werden Membranproteine der Innenmembran durch ein hydrophobes Signal, das typischerweise der positiv geladenen Leitsequenz folgt, zu ihrem Bestimmungsort geführt (Glick *et al.*, 1992; Stuart, 2002).

ATM1 - ABC transporter of mitochondria

ATM1 (YMR301C) wurde als erster mitochondrialer ABC-Transporter in *S. cerevisiae* identifiziert (Leighton und Schatz, 1995). Das nicht-prozessierte Protein besteht aus 690 Aminosäuren, besitzt eine N-terminale Leitsequenz und ist in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert. *ATM1* kodiert einen Halbtransporter, wobei dessen funktionelle Form wahrscheinlich ein Dimer ist. Der ABC-Transporter

besteht aus einer N-terminalen Transmembrandomäne mit sechs potentiellen Transmembranhelices und einer C-terminal lokalisierten, matrixständigen Nukleotidbindedomäne. Durch die Orientierung der NBDs ist eine Exportfunktion wahrscheinlich. Homologe von ATM1 werden in niederen und höheren Eukaryonten gefunden. Die Sequenzidentität liegt, abhängig von dem jeweiligen Organismus, zwischen 40% und 50%, einschließlich der TMD-Domäne, deren Homologie bei nichtverwandten ABC-Transportern sehr gering ist. Erstaunlicherweise können keine Homologe zu ATM1 in Prokaryonten und Arachaea nachgewiesen werden.

ATM1 defiziente Hefen bilden einen charakteristischen Phänotyp aus. Der Verlust von funktionellem ATM1 führt zu einem zu einer stark eingeschränkten Lebensfähigkeit auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glycerin, und zum anderen zu einem verringerten Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Glukose) (Kispal *et al.*, 1997; Leighton und Schatz, 1995). Ebenso ist ein weitgehender Verlust von Cytochromen und extra-mitochondrialen Hämproteinen zu beobachten. Die erhöhte Glutathionkonzentration stellt in Hefe einen Indikator für oxidativen Stress dar. Gleichzeitig wird eine drastische Anreicherung von „freiem“ Eisen (Eisen das nicht in Häm oder Eisen/Schwefel-*Cluster* gebunden ist) beobachtet (Kispal *et al.*, 1997). Als Modell wird diskutiert, dass die erhöhte Eisenkonzentration oxidativen Stress auslöst und somit sekundär zur Bildung von Glutathion und der Zerstörung der Hämproteine führt (Kispal *et al.*, 1997). Weiterhin konnte in $\Delta atm1$ Hefestämmen keine mitochondriale DNA nachgewiesen werden, was auf rho⁰ Zellen hinweist (Leighton und Schatz, 1995; Senbongi *et al.*, 1999). Aktivitätsmessungen von Enzymen, die an der Leucin-Biosynthese beteiligt sind, zeigen eine quantitative Reduktion der Isopropylmalat-Isomerase (LEU1). LEU1 ist ein zytosolisches Eisen/Schwefel-Protein welches der Aconitase der mitochondrialen Matrix ähnelt (Kohlhaw, 1988). Der ABC-Transporter ATM1 stellt eine Verbindung zwischen dem mitochondrialen und zytosolischen Eisengleichgewicht her, in dem er wahrscheinlich in der Matrix assemblierte Eisen/Schwefel-*Cluster* in den Intermembranraum exportiert (Kispal *et al.*, 1999).

Das humane funktionelle Homolog zu ATM1, ABCB7 (Abbildung 5, siehe 10.10.3), zeigt eine sehr hohe Sequenzhomologie innerhalb der löslichen Nukleotidbindedomäne. ABCB7 unterdrückt teilweise den Phänotyp von $\Delta atm1$ Hefen und kann die Funktion von ATM1 während der Eisen/Schwefel-Proteinassemblierung kompensieren (Csere *et al.*, 1998). Defekte innerhalb des

ABCB7 Gens können einen seltenen Typ der X-chromosomalen Sideroblastose und Anämie (XLSA/A, *X-linked sideroblastic anemia associated with cerebellar ataxia*) hervorrufen (Shimada *et al.*, 1998).

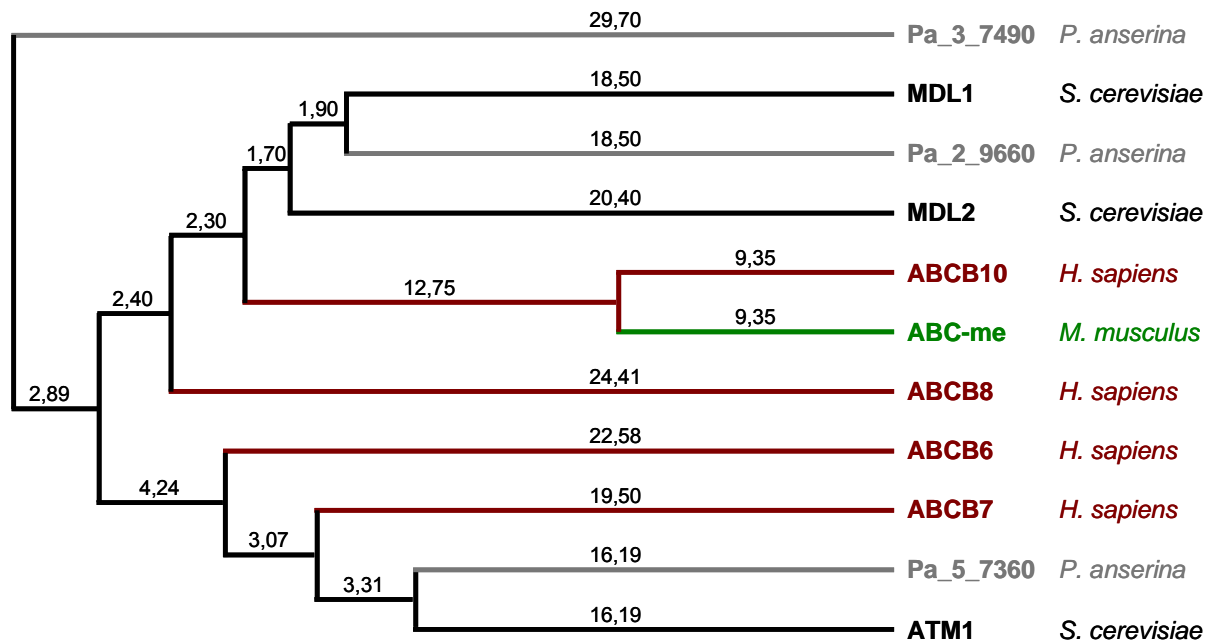


Abbildung 5 Phylogenetischer Baum der mitochondrialen ABC-Transporter von *S. cerevisiae* und deren Homologe in *H. sapiens*, *P. anserina* und ABC-me aus *Mus musculus*

Der Phylogenetische Baum wurde mit Hilfe der Programme *Jalview 2.08.1* und *ClustalW Multiple Sequence Alignment* aufgrund der *full-length* Sequenzen der einzelnen Transporter erstellt. Zahlenwerte geben die durchschnittliche Entfernung unter Berücksichtigung der Sequenzidentitäten in Prozent an. Pa_2_9660 aus *P. anserina* bildet das Homolog zu MDL1 aus *S. cerevisiae*. Humanes ABCB7 und Pa_5_7360 aus *P. anserina* gelten hingegen als Homologe des ABC-Transporters ATM1. Für MDL2 wurde in *P. anserina* das Homolog Pa_3_7490 vorhergesagt. Die entfernte Verwandtschaft zwischen MDL2 und Pa_3_7490 ist auf eine Sequenzidentität von nur 25% zurückzuführen.

Mitochondrialer Eisentransport

Eisen gilt in *S. cerevisiae*, ebenso wie in anderen Organismen, als essentielles Spurenelement. Hohe Eisenkonzentrationen wirken hingegen toxisch, da die Bildung freier Radikale stimuliert und zelluläre Proteine und DNA geschädigt werden können. Um einen ausgewogenen Eisenhaushalt aufrecht zu erhalten ist eine Regulation notwendig. Zelluläres Eisen wird vorwiegend in den Mitochondrien benötigt. Es kommt innerhalb der Zelle in mehreren Zuständen vor, z.B. als Metallzentrum in Hämproteinen (z.B. Cytochrom c), in Eisen/Schwefel-Proteinen (z.B. Succinatdehydrogenase der Atmungskettenkomplexe) oder als „freies“ Eisen, welches vermutlich an niedermolekulare Chelatoren gebunden ist. Eisen/Schwefel-Cluster-Proteine sind im Kern, dem Zytosol und den Mitochondrien von *S. cerevisiae* lokalisiert. Sie sind in verschiedene biochemische Prozesse eingebunden, wie z.B.

die Aconitase innerhalb des Zitronensäurezyklus und die Nitrogenase der Nitrogenfixierung (Gerber und Lill, 2002).

Der Eisenstoffwechsel innerhalb der Zelle kann in vier Schritte unterteilt werden; der Aufnahme, Weiterleitung, Lagerung und dem Recycling, bzw. der Eisenabgabe (De Freitas *et al.*, 2003). Die Eisenaufnahme erfolgt in *S. cerevisiae* über zwei Wege, dem „low“ oder „high affinity pathway“, abhängig von der vorliegenden Eisenkonzentration im Kulturmedium. Die Fe^{3+} -Metallreduktasen der Plasmamembran, FRE1 und FRE2, reduzieren unlösliche Fe^{3+} -Eisenionen und leiten diese anschließend an die entsprechenden Eisentransporter der Plasmamembran weiter. Befinden sich Hefen in einem eisenreichen Medium, wird Fe^{2+} von dem nicht ATP-abhängigen Transmembrantransporter FET4 aufgenommen. Neben Eisen können auch andere divalente Metallionen transportiert werden (Dix *et al.*, 1994). Der „high affinity pathway“ wird in eisenlimitiertem Medium aktiviert. Dieser Weg setzt sich aus der kupferhaltigen Eisenoxidase FET3 und dem Eisentransporter FTR1 zusammen (Askwith und Kaplan, 1998). Fe^{2+} wird oxidiert und anschließend durch FTR1 in das Zytosol transportiert. Das in höheren Eukaryonten vorkommende Eisentransportmolekül Transferrin und das Eisenspeichermolekül Ferritin sind in Hefe nicht vorhanden.

MDL2 – multidrug resistance like protein 2

Wenig ist bis heute über MDL2 (YPL270w) bekannt. MDL2 besteht aus 773 Aminosäuren und befindet sich in der mitochondrialen Innenmembran. MDL1 und MDL2 zeigen zueinander eine Sequenzidentität von 46%. Die Größe des prozessierten MDL2-Proteins beträgt 88 kDa und das native Molekulargewicht des Homodimers liegt bei 300 kDa (Young *et al.*, 2001). Die Funktion von MDL2 konnte bis heute nicht nachgewiesen werden, aber eine Heterodimerisierung zwischen MDL1 und MDL2 wird ausgeschlossen (Young *et al.*, 2001).

MDL1 – multidrug resistance like protein 1

Das *MDL1*-Gen (YLR188w) kodiert ein Membranprotein mit 695 Aminosäuren Länge, das zur Gruppe der MPE (mitochondriale Peptidexporter) ABC-Transporter gehört. Die N-terminale TMD und die C-terminale NBD werden nacheinander kodiert (Dean *et al.*, 1994). Hydrophobizität- und Sequenzhomologien schlagen vor, dass die TMD aus sechs potentiellen Transmembranhelices besteht, wobei N- und C-Terminus

innerhalb der mitochondrialen Matrix liegen. Als minimale funktionelle Einheit wird ein Homodimer angenommen (Young *et al.*, 2001). Die Größe eines Monomers wird mit 71 kDa berechnet. Das mittels SDS (Natriumdodecylsulfat) Gelelektrophorese ermittelte apparente Molekulargewicht beträgt 62 kDa. Die Differenz des Molekulargewichtes erklärt sich durch die Abspaltung der N-terminalen mitochondrialen Leitsequenz nach Einbau des Proteins in die mitochondriale Innenmembran. Während Gelfiltration wird MDL1 in Fraktionen erhalten, die einer Größe von 200 kDa entsprechen (Young *et al.*, 2001). Der oligomere und strukturelle Aufbau von solubilisiertem MDL1 wurde mittels Einzel-Elektronenmikroskopie untersucht (Hofacker *et al.*, 2007). Es wird deutlich, dass MDL1 im solubilierten Zustand sehr wahrscheinlich als Homodimer vorliegt.

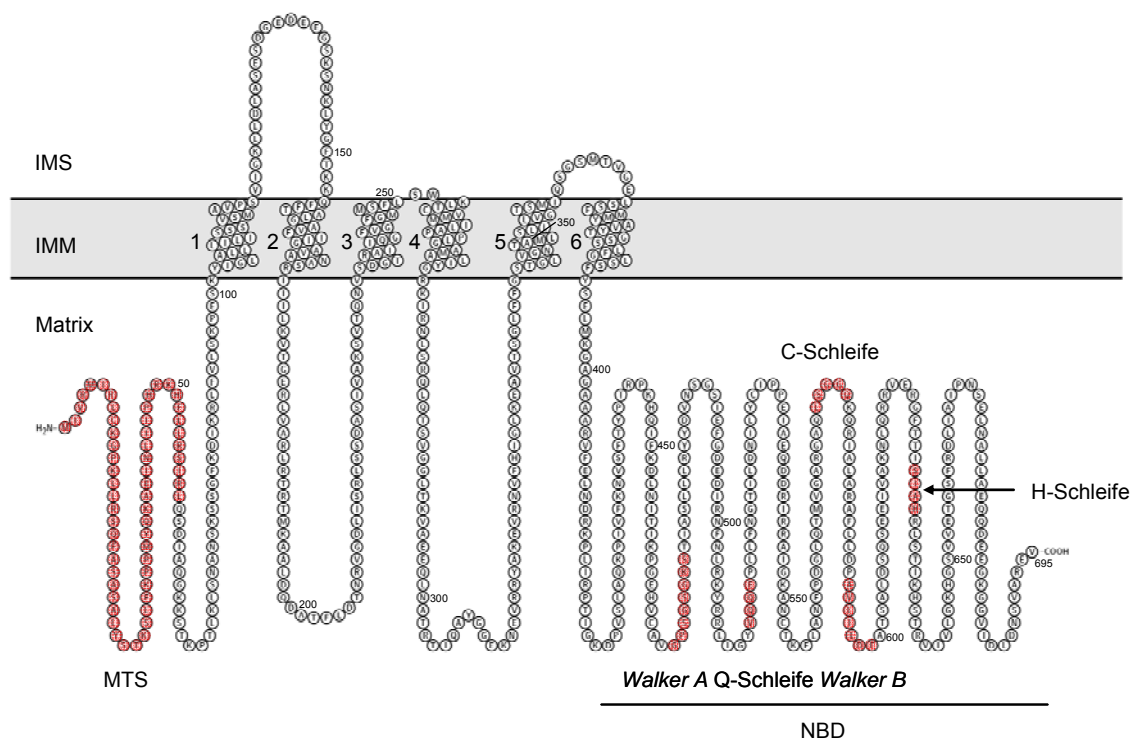


Abbildung 6 Schematische Darstellung von MDL1 (eine Halbseite)

MDL1 besteht aus 695 Aminosäuren. Die Transmembrandomäne ist aus sechs potentiellen Transmembranhelices aufgebaut. Ihr schließt sich C-terminal die Nukleotidbindedomäne an, welche die charakteristischen ABC-Transporter Motive *Walker A* und *B*, *Q*-, *C*- und *H*-Schleife enthält. Die ersten 59 Aminosäuren kodieren die mitochondriale Leitsequenz, die für die Proteindirektion zur mitochondrialen Innenmembran verantwortlich ist. IMM, mitochondriale Innenmembran; IMS, mitochondrialer Intermembranraum; MTS, mitochondriale Leitsequenz; NBD, Nukleotidbindedomäne.

Der intrazelluläre nicht-essentielle ABC-Transporter MDL1 befindet sich in der mitochondrialen Innenmembran von *S. cerevisiae* (Arnold und Langer, 2002). Als Hauptfunktion nimmt MDL1 an der mitochondrialen Qualitätskontrolle teil (Young *et*

al., 2001). Die innere Mitochondrienmembran bildet eine Permeabilitätsbarriere aus. Um biochemische Prozesse der Matrix mit dem Zytosol zu verbinden, müssen unterschiedlichste Stoffe aktiv und kontrolliert über die mitochondriale Innenmembran transportiert werden. Diese Prozesse werden von speziellen Transportproteinen katalysiert. Beispiele für bedeutende Transportreaktionen sind der Austausch von ADP/ATP (Adenosin-5'-diphosphat/Adenosin-5'-triphosphat) und der Transport anorganischen Phosphats in die Matrix. Nicht- oder falschgefaltete Proteine werden durch m-AAA (*matrix-oriented ATPase associated with a variety of cellular activities*) Proteasen abgebaut. Diese sind in der Innenmembran lokalisiert und ihre katalytische Seite ist zur Matrix orientiert (Langer, 2000). An isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass nicht-assemblierte Proteine nur zu einem Teil vollständig abgebaut werden. Die Eliminierung mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskette durch die AAA-Proteasen führt zur Freisetzung eines heterogenen Spektrums von Abbauprodukten (Young *et al.*, 2001). Etwa 70% des exportierten Materials entspricht dabei freien Aminosäuren, wohingegen circa 30% aus Peptiden unterschiedlicher Größe besteht. Die Peptidfraktion wird entsprechend ihres Elutionsverhaltens in einer säulenchromatischen Analyse in zwei Größenbereiche, von sechs bis 19 Aminosäuren (2.100 bis 600 Da) und zwei bis fünf Aminosäuren (600 bis 200 Da), unterteilen (Young *et al.*, 2001). Die Disruption von *MDL1* bewirkt eine Beeinträchtigung im Export der Peptide von sechs bis 19 Aminosäuren Länge, was zur indirekten Identifizierung von MDL1 als Peptidtransporter führte (Young *et al.*, 2001).

Zurzeit können mehrere Peptidexportwege aus Mitochondrien unterschieden werden. Durch m-AAA-Proteasen erzeugte Peptide werden in die Matrix freigesetzt. Diese binden wahrscheinlich an MDL1, woraufhin die Peptide aktiv in den Intermembranraum gelangen (Young *et al.*, 2001). Alternativ gelangen durch andere Proteasen, z.B. i-AAA (*intermembrane space-oriented ATPase associated with a variety of cellular activities*) oder MOP112 (*mitochondrial oligopeptidase 112 kDa*) Protease (Kambacheld *et al.*, 2005), freigesetzte Abbauprodukte direkt in den Intermembranraum (Young *et al.*, 2001).

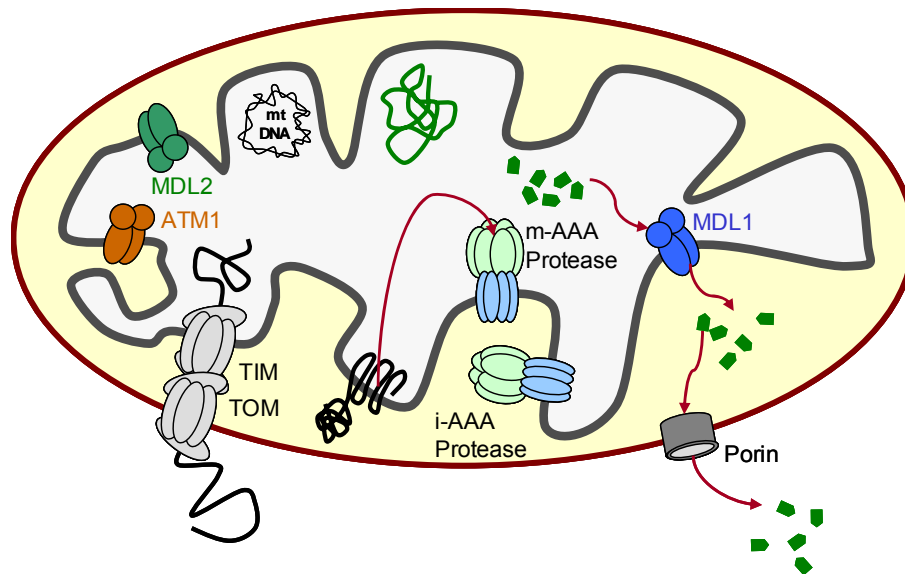


Abbildung 7 **Vorgeschlagene physiologische Funktion von MDL1**

MDL1 könnte für den Export degradierter Produkte verantwortlich sein. Peptide, z.B. der Atmungskette, werden aktiv über MDL1 in den Intermembranraum transportiert. Diese degradierten Produkte haben ein Molekulargewicht zwischen 600 und 2.000 Dalton. Gezeigt wurde dies durch *in organello* Translationsexperimente, bei denen der resultierende Überstand nach Proteolyse mittels Gelfiltration aufgetrennt wurde. Isolierte Mitochondrien eines *mdl1*-Deletionsstammes zeigen einen reduzierten Export radioaktiv markierten Materials innerhalb des genannten Molekulargewichtsbereiches (Young *et al.*, 2001).

Die Anwesenheit der MDL1 homologen Proteine M-ABC1 (ABCB8) (Hogue *et al.*, 1999) und M-ABC2 (ABCB10, ABC-me (*mitochondrial erythroid*) (Shirihai *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000)) in den Mitochondrien von *Homo sapiens* bzw. *Mus musculus* zeigt, dass auch in Säugern mitochondriale Peptidexporter existieren (Abbildung 5). Sie könnten somit eine Rolle innerhalb des adaptiven Immunsystems spielen. Eine Möglichkeit könnte sein, dass Peptide einer bestimmten Größe aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert und anschließend in das Cytoplasma entlassen werden. Von dort könnten sie, durch einen noch nicht bekannten Vermittler, mittels des TAP1/2-Transporter in das Lumen des ER geschleust und auf MHC-Klasse I Moleküle beladen werden. Anschließend kann der stabile Peptid-MHC Komplex über den konstitutiven Sekretionsweg an die Zelloberfläche gelangen. Dort präsentieren die MHC I-Moleküle die gebundenen Peptidfragmente zytotoxischen T-Zellen.

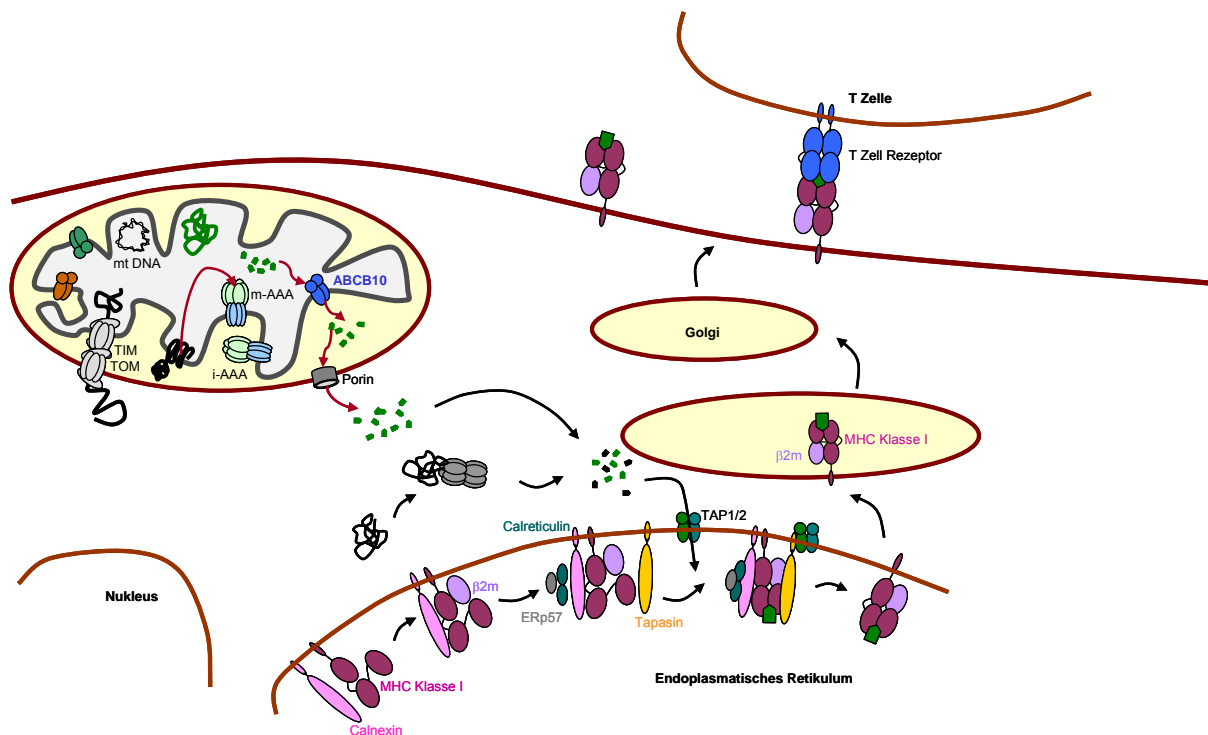


Abbildung 8 Überblick über intrazelluläre Peptidtransporter

Die Peptidtransporter ABCB10 und TAP1/2 befinden sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten, dem Mitochondrium bzw. dem ER. ABCB10, das humane Homolog zu MDL1, ist wahrscheinlich in den mitochondrialen Peptidexport eingebunden. Nicht- oder falschgefaltete Proteine, die durch die m-AAA Protease zu kleine Peptiden abgebaut wurden, werden durch ABCB10 aktiv in den Intermembranraum transportiert. Möglicherweise kreuzen diese Peptide nach ihrer Passage durch die mitochondriale Außenmembran den Antigenprozessierungsweg von TAP1/2 und werden via TAP1/2 aus dem Zytosol in das ER-Lumen transportiert. Dort werden MHC-Klasse I Moleküle beladen und die stabilen MHC-Peptidkomplexe wandern aus dem ER, über das Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche. T-Zellen erkennen dort die präsentierten Peptidfragmente.

Des Weiteren wird für MDL1 die Vermittlung der Resistenz gegen oxidativen Stress, ebenso wie die Suppressorwirkung gegen den Phänotyp von $\Delta atm1$ Zellen beschrieben (Chloupková *et al.*, 2003). Die Überexpression von MDL1 kann den ausgeprägten Wachstumsphänotyp von $\Delta atm1$ Hefen unterdrücken, indem u.a. der Wachstumsdefekt in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Schwermetallen kompensiert wird. Ebenso ist eine verminderte Eisenakkumulation innerhalb der Mitochondrien zu beobachten, wobei die Expression der durch die zelluläre Eisenkonzentration regulierten Gene beeinflusst wird (Chloupková *et al.*, 2003). Die Resistenz gegenüber Mangan ist im Gegensatz dazu erhöht. Es wird angenommen, dass MDL1 eine Funktion beim Wachstum unter oxidativen Stressbedingungen einnimmt. Eine MDL1-Überexpression in Wildtyp-Zellen bewirkt eine verringerte Katalaseaktivität. $\Delta mdl1$ Hefen zeigen hingegen eine erhöhte Katalaseaktivität. Man nimmt an, dass bei erhöhten MDL1-Konzentrationen in der mitochondrialen Innenmembran vermehrt Abbauprodukte der m-AAA Protease exportiert werden

können. Somit könnte sich die Stresstoleranz erhöhen oder, ähnlich der mitochondrialen Stressantwort bei Säugern (Butow und Avadhani, 2004; Zhao *et al.*, 2002), eine Signalfunktion von MDL1 zwischen Mitochondrium und Nukleus vorliegen.

ABC-me (ABCB10) wurde als einziges mitochondriales MDL1-Homolog in *Mus musculus* beschrieben (Shirihai *et al.*, 2000) (Abbildung 5). Das Protein besitzt eine außergewöhnlich lange mitochondriale Leitsequenz von 105 Aminosäuren (Graf *et al.*, 2004). Die ABC-me Expression erfolgt vorwiegend in erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks und wird durch den Transkriptionsfaktor GATA-1 induziert. Eine Überexpression führt zu einer erhöhten Hämoglobinbiosynthese erythroleukemischer Zellen. Aus diesem Grunde wird angenommen, dass ABC-me am Transport von Zwischenprodukten der Häm biosynthese beteiligt ist. Da die Nukleotidbindedomäne von ABC-me in der Matrix vorliegt, sollte es sich um einen Exporter handeln (Shirihai *et al.*, 2000).

Zielsetzung der Arbeit

Der mitochondriale ABC-Transporter MDL1 ist am Export von Peptiden, die vom Abbau nicht-assemblierter innerer Membranproteine stammen, beteiligt (Young *et al.*, 2001). Bis heute ist das spezifische Substrat unbekannt. Da Exportprozesse schwierig zu untersuchen sind, sollte die Lokalisation und Orientierung des ABC-Transporters innerhalb dieser Arbeit verändert werden. MDL1 sollte in Membranen dirigiert werden, die vermehrt in Hefen vorkommen und dort in einer Orientierung vorliegen, in der die Nukleotidbindedomänen Aufnahme-Experimente ermöglichen. In den Membranen des ER fungiert MDL1(60-695), ohne die identifizierte mitochondriale Leitsequenz, als so genannter „Importer“, da seine Nukleotidbindedomänen zytosolisch orientiert vorliegen. Mitochondriales und ER-ständiges MDL1 wurden anhand biochemischer Daten verglichen und näher charakterisiert. Invertierte mitochondriale Membranvesikel oder MDL1(60-695) enthaltende ER-Membranen wurden in Anwesenheit verschiedener potentieller Substrate für Aufnahme-Experimente verwendet.

Zusätzlich zur Exportfunktion wurde MDL1 als Suppressor des $\Delta atm1$ -Phänotyps identifiziert (Chloupková *et al.*, 2003). ATM1 defiziente Hefen zeigen einen schwerwiegenden Wachstumsdefekt, da ATM1 essentiell für die Assemblierung von zytosolischen Eisen/Schwefel-Proteinen ist (Lill und Kispal, 2000). Mit Hilfe eines *in*

in vivo Ansatzes sollte die Funktionalität verschiedener MDL1-Mutanten (defizient in ATP-Bindung (K473A) oder ATP-Hydrolyse (E599Q, H631A)), überprüft werden. Werden $\Delta atm1/ATM1$ Zellen zum Verlust ihres ATM1-Plasmids (*URA3*) getrieben, ist das Wachstum der $\Delta atm1$ Hefen abhängig von der Anwesenheit funktionellen MDL1. Weiterhin können MDL1-Homologe anderer Organismen auf ihr Komplementationsverhalten in *S. cerevisiae* analysiert werden.

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Extraktion totaler RNA

Totale RNA aus *S. cerevisiae* wird nach publizierten Protokollen (Carlson und Botstein, 1982; Xiao, 2006) isoliert. Während der gesamten Extraktion totaler RNA, einschließlich der Herstellung aller benötigten Puffer und Lösungen, sollten Handschuhe getragen und auf ein RNase freies Arbeiten geachtet werden. Ebenso sollten alle benötigten Glasgefäße und Plastikmaterialien RNase-frei sein.

S. cerevisiae Zellen einer 5 mL Übernacht-Kultur werden in 15 mL Reaktionsgefäße überführt und geerntet (4.000 x g, 4 min, RT (Raumtemperatur)). Das Zellsediment wird in 2 mL DEPC-H₂O (0,1% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat, SIGMA-ALDRICH) gelöst in Milli-Q-H₂O, autoklaviert) und durch *Vortexen* resuspendiert. Um das DEPC-H₂O zu entfernen wird die Zellsuspension zentrifugiert (4.000 x g, 4 min, RT) und das Sediment in 350 µL Lysepuffer (10 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 0,5 M NaCl, 1% SDS, 0,2 M TRIS-HCl (TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 7,6) aufgenommen. Die Suspension wird in 2 mL Reaktionsgefäße überführt, mit 0,4 g säuregewaschenen Glasperlen (Ø 0,4 – 0,5 mm) und 1 mL Trizol-Reagenz (invitrogen™) versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT werden 200 µL Chloroform zugegeben und die Reaktionsansätze bei maximaler Geschwindigkeit für circa 2,5 min bei 4°C *gevortext*. Die wässrige Phase wird nach Zentrifugation (18.000 x g, 4 min, RT) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 600 µL Isopropanol zugegeben. Nach Mischen der Suspension wird erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das RNA-Sediment wird mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Die RNA wird in 40 µL RNase-freiem H₂O gelöst und die Konzentration, sowie die Reinheit der RNA, mit Hilfe des Spektrometers (Nanodrop, peqLab Biotechnologie GmbH) bestimmt.

2.1.2. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um mRNA-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf oder zwischen unterschiedlichen Hefestämmen semiquantitativ zu bestimmen, kann die RT-PCR (*Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*) verwendet werden. Die Reaktion wird mit Hilfe des *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System* (invitrogen™) nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

Die cDNA (komplementäre DNA) Synthese erfolgt bei 50°C für 30 min. Es schließt

sich deren Hitzedenaturierung (95°C für 5 min) an, um die Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotidprimern zu ermöglichen. Die eingesetzte DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von dem Primer in 5'-3' Richtung einen neuen DNA-Strang. Denaturierung (95°C, 45 sec), Hybridisierung (50°C, 30 sec) und Verlängerung (72°C, 45 sec) wiederholen sich je nach Anforderungen 20 bis 35-mal, wobei der neu synthetisierte DNA-Strang im nächsten Schritt als Matrize fungiert. Die Vervielfältigung der Zielsequenz ist logarithmisch, so dass am Ende einer PCR-Reaktion DNA in elektrophoretisch analysierbaren Konzentrationen vorliegt. Ein typischer Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 50 µL) enthält neben dem Reaktionspuffer (1-fach), zwischen 0,01 und 1 µg RNA, SuperScript™ III RT/Platinum® *taq* Mix (nach Herstellerangabe) und je 1 µM *forward* und *reverse* Primer. Die erhaltenen RT-PCR Produkte werden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und analysiert (2.1.16).

2.1.3. Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wird der Wildtyp-Hefestamm W303-1A in Komplexmedium bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 1 - 2 kultiviert (2.2.2.4). Die Zellen werden geerntet (500 x g, 5 min, 4°C) und in Lysepuffer (10 mM DTT¹ (1,4-Dithio-D,L-threitol), 10 mM EDTA, 20 U Lyticase/OD₆₀₀-Einheit, 0,9 M D-Sorbitol, 100 mM TRIS-HCl pH 8) für 1 h bei 30°C und 150 rpm inkubiert. Die sedimentierten Spheroplasten (500 x g, 5 min, 4°C) werden in 500 µL TE-Puffer (10 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl pH 8) resuspendiert und durch Zugabe von 50 µL 10% (m/v) SDS und Inkubation für 20 min bei 65°C lysiert. Nach Zugabe von 200 µL 5 M Kaliumacetat pH 5 werden die aufgeschlossenen Spheroplasten für 30 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt (20.000 x g, 5 min, 4°C) und die DNA im Überstand mit 1 mL 100%igem Ethanol präzipitiert. Genomische DNA wird durch Zentrifugation (20.000 x g, 10 sec, 4°C) sedimentiert, anschließend in 300 µL TRIS-Puffer (100 mM TRIS-HCl pH 8) aufgenommen und bei 65°C für 15 min gelöst. RNA Kontaminationen werden durch Zugabe von 5 µL RNase A (10 g/L) und Inkubation bei 37°C für 1 h entfernt. Genomische DNA wird mit 500 µL Isopropanol präzipitiert (20.000 x g, 20 sec, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µL TE-Puffer aufgenommen.

¹ DTT wird dem Puffer frisch zugegeben

2.1.4. Präparation mitochondrialer DNA aus *S. cerevisiae*

Mitochondriale DNA wird aus präparierten *S. cerevisiae* Mitochondrien isoliert (2.2.2.11). Hierzu werden Mitochondrien in einfachem Volumen 60°C warmen Homogenisierungspuffer (50 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5 M Saccharose, 4% (m/v) SDS) aufgenommen und homogenisiert. 100 µg Proteinase K (Fermentas) pro g Feuchtgewicht Mitochondrien werden zugegeben und der Ansatz für zwei Stunden bei 60°C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation (20.000 x g, 5 min, 4°C) wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Lösung (Überstand nach Zentrifugation, 16.300 x g, 20 min, 4°C) wird mit dem einfachem Volumen Phenol (Carl Roth®)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 10 min auf einem Wipptisch inkubiert. Nach Zentrifugation (2.500 x g, 10 min, RT) wird der wässrige Überstand mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 10 min auf einem Wipptisch inkubiert und bei 2.500 x g für 10 min (RT) zentrifugiert. Die DNA wird durch Zugabe von einem Volumen kaltem Isopropanol aus dem wässrigen Überstand gefällt und bei 20.800 x g für 20 min (4°C) zentrifugiert. Anschließend wird sie mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen, das resultierende Sediment für circa 20 min an der Luft getrocknet und abschließend in 30 µL H₂O resuspendiert.

2.1.5. Nachweis mitochondrialer DNA durch PCR-Amplifikation

Durch PCR-Amplifikation mitochondrial kodierter Gene soll nachgewiesen werden, ob mitochondriale DNA isoliert wurde. Hierzu wird ein Genfragment von COX1 mithilfe der beiden Primer pCOX1(f) und pCOX1(r) amplifiziert, COX3 durch die Primer pCOX3(f) und pCOX3 (r) und Cyt b durch den *forward* und *reverse* Primer pCytb. Die PCR-Reaktion wird wie in 2.1.7 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden mit Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Ethidiumbromid-Färbung analysiert (2.1.16).

| Primer | Sequenz |
|----------|-----------------------------------|
| pCOX1(f) | GA GTG CCT ACA AGA GTA GGT |
| pCOX1(r) | CA GTT CTT ACC TTG CGC TGG CTG TT |
| pCOX3(f) | G GTT ATG CCT TCA CCA TGA C |
| pCOX3(r) | CC TGC GAT TAA GGC ATG A |
| pCytb(f) | A GAG ACT ACA CGC ACA CT |
| pCytb(r) | CT TCG CTG CAA GTT GTC |

Tabelle 2 Primer zur Amplifikation mitochondrial kodierter Gene

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer

2.1.6. Plasmidisolierung aus *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 5 mL LB-Medium (Bertani, 1951) in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie angeimpft (2.2.2.2). Die Kultur wird über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend die Zellen präzipitiert (2.000 x g, 1 min, 4°C). Um reine, entsalzte DNA für Sequenzierungsreaktionen und Restriktionsanalysen zu erhalten, wird die Plasmid-DNA Isolation mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid Kits* von Macherey-Nagel nach Herstellerangabe durchgeführt. Hierbei wird das Bakterienzellsediment in alkalischem Milieu durch Zugabe von SDS und in Anwesenheit von RNase A lysiert und anschließend neutralisiert. Hohe Salzkonzentrationen führen zu einem Präzipitat von SDS, denaturierten Proteinen, Zelltrümmern und chromosomaler DNA. Die Plasmid DNA befindet sich in löslicher Form und wird auf einen Anionenaustauscher aufgetragen. Plasmid-DNA bindet an das Säulenmaterial und wird nach einem Waschschrift in Milli-Q-H₂O eluiert.

Die Durchführung der Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* ist der aus *E. coli* vergleichbar. Nach der Zellernte werden die Hefen zusätzlich mit Glasperlen versetzt und für drei bis fünf Minuten *gevortext*. Anschließend wird das *NucleoSpin Plasmid Kit* von Macherey-Nagel nach Herstellerangabe verwendet.

2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden als DNA-Fragmente durch Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Mit Hilfe der PCR können DNA-Matrizen sequenzspezifisch amplifiziert werden. Zur Amplifikation der *MDL1*-Fragmente, zum Restriktionsschnittstellen-Austausch und zur Amplifikation verschiedener *Tags*, wird die *taq* DNA-Polymerase in Kombination

mit der *pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) in einem Verhältnis von circa 10:1 eingesetzt. Die *pfu* DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proofreading*), die die Fehlerrate der Reaktion reduziert. Neben dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer enthält ein typischer Reaktionsansatz von 50 µL Gesamtvolumen 2 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), 0,1 - 10 ng DNA, 50 pmol der benötigten Primer, 1,25 U *taq* DNA-Polymerase und 0,1 U *pfu* DNA-Polymerase. Die PCR-Reaktionsfolge wird 35-mal wiederholt und setzt sich wie folgt zusammen: Schmelzen der DNA bei 93°C für 30 sec, Anlagerung der Oligonukleotide bei 40 - 65°C für 30 - 60 sec (in Abhängigkeit der verwendeten Primer) und Synthese der DNA bei 72°C für 30 - 90 sec. Nach den Reaktionszyklen wird durch eine 15-minütigen Nachinkubation die DNA-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNA-Fragmente wird durch Gelelektrophorese kontrolliert (2.1.16).

2.1.8. Ortsspezifische Mutagenese

Zur Generierung ortsspezifischer Mutationen in *MDL1* wird die *Ligase chain reaction* (LCR) angewandt (Michael, 1994). Erwünschte Punktmutationen werden über mutagene Primer in die jeweilige *MDL1*-Kassette eingeführt. Der Primer (10 µM) wird zuvor in Anwesenheit von 1 mM ATP, pNK-Puffer (1-fach, Fermentas) und 10 U T4 Polynukleotid-Kinase (Fermentas) für 30 min bei 37°C phosphoryliert und die Kinasereaktion anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert. Während der PCR-Reaktion wird der, durch die *pfu* DNA-Polymerase neusynthetisierte, DNA-Strang sofort durch die anwesende thermostabile Ligase (AmpLigase, EPICENTRE®) ligiert. Auf diese Weise entsteht pro PCR-Zyklus einzelsträngige, zirkuläre DNA. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 100 µL) enthält neben dem PCR-Puffer (1-fach), 1 U AmpLigase, circa 200 ng Matrizen-DNA, 200 µM dNTPs, 1 mM NAD (Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, Fermentas), 2,5 U *pfu* DNA-Polymerase und 4 nM phosphorylierter Mutageneseprimer. Die PCR-Reaktionsfolge wird 30-mal wiederholt und setzt sich wie folgt zusammen: Schmelzen der DNA bei 95°C für 1 min (Erstschmelzen bei 95°C für 5 min), Anlagerung der Oligonukleotide bei 40 - 65°C für 1 min, abhängig von dem verwendeten Primer, und Synthese der DNA bei 65°C für 2 min pro 1.000 Bp. Das erhaltene PCR-Produkt wird über das *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) gereinigt (2.1.16) und anschließend mindestens 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (Fermentas) verdaut (2.1.11). Nach 20-minütiger

Hitzeinaktivierung (80°C) werden 5 µL des Ansatzes in RbCl-kompetente *E. coli* transformiert (2.1.14). Erhaltene Kolonien werden kultiviert (2.2.2.2), die Plasmid-DNA präpariert (2.1.6) und sequenziert (2.1.19).

2.1.9. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR kann direkt an frischen *E. coli* oder *S. cerevisiae* Kolonien durchgeführt werden, um eine aufwendige Plasmid-Präparation zu vermeiden.

Zur Identifikation positiver *E. coli* Kolonien werden spezifische Primer verwendet und das erhaltene PCR-Produkt anhand der Größe analysiert (2.1.16). Zellen einer Kolonie werden mit einem sterilen Zahnstocher in ein Reaktionsgefäß überführt und der PCR-Ansatz zugegeben. Ein typischer Ansatz (Gesamtvolumen 50 µL) enthält neben *taq* PCR-Puffer (1-fach), 200 µM dNTPs, 2 mM Magnesiumchlorid, je 2 µM *forward* und *reverse* Primer, 1,25 U *taq* DNA-Polymerase. Das Temperatur-Protokoll unterscheidet sich von dem allgemeinen PCR-Protokoll nur in einer 5 min verlängerten Denaturierungsphase, um die Zellen zu lysieren und so die Plasmid-DNA zugänglich zu machen.

Für die Kolonie-PCR an *S. cerevisiae* werden Zellen einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in ein Reaktionsgefäß gegeben und in 50 µL *taq* PCR-Puffer (1-fach) resuspendiert. Der Ansatz wird 15 min bei 96°C gekocht und anschließend sofort auf Eis überführt. 10 µL der geöffneten Zellen (Matrize) werden mit *taq* PCR-Puffer (1-fach), 200 µM dNTPs, 1,5 mM Magnesiumchlorid und je 500 nM *forward* und *reverse* Primer inkubiert. Das angewandte Temperatur-Protokoll beinhaltet direkt nach der Anfangsdenaturierung eine zusätzliche 5-minütige Inkubation bei 80°C. Während dieser Zeit wird 1 µL *taq* DNA-Polymerase (5 U) zugegeben und anschließend das PCR-Protokoll fortgesetzt.

2.1.10. Ethanolfällung

Um DNA aus PCR-Reaktionen in Restriktionsanalysen (2.1.11) und Ligationen (2.1.12) einsetzen zu können, muss die DNA zuvor gefällt und anschließend in Wasser aufgenommen werden. Dies erfolgt hauptsächlich mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, nach Anleitung des Herstellers).

Im Falle der homologen Rekombination für *S. cerevisiae* wird die DNA des PCR-Produktes durch Ethanolfällung erhalten. Hierzu werden vier 100 µL PCR-Ansätze vereinigt (2.1.7), mit 2,5 Vol. Ethanol 96% und 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) versetzt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis werden die Proben zentrifugiert

(20.000 x g, 15 min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol wird die Plasmid-DNA 10 min bei 37°C getrocknet und in 30 µL H₂O aufgenommen.

2.1.11. Restriktionsanalyse

Restriktionsanalysen durch enzymatischen Verdau werden durchgeführt, um isolierte doppelsträngige DNA zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Analysen werden nach der allgemein üblichen Standardvorschrift (Sambrook, 1989) vorgenommen, wozu Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller (New England Biolabs, Fermentas) verwendet werden.

DNA wird durch Endonukleasen in Anwesenheit des vom Hersteller mitgelieferten und empfohlenen Puffers geschnitten. Die Ansatzgrößen für Restriktionsverdau betragen 20 µL und die Enzym-Konzentration 2-10 U/µg DNA. Die Dauer des Verdau variiert zwischen 1 und 2 h bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Die Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA erfolgt elektrophoretisch im DNA-Agarosegel (2.1.16).

2.1.12. Ligation

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) katalysiert die Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppen von DNA, wodurch eine mögliche Religation des DNA-Vektors verhindert wird. Innerhalb der Reaktion werden 1 - 20 pmol DNA-Vektor mit 1 U CIAP (Fermentas) unter den benötigten Pufferbedingungen für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend über das *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) nach Anleitung des Herstellers gereinigt.

Zur Ligation eines DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor wird die Ligase des Bakteriophagen T4 (Fermentas) benutzt. Die Ligationsreaktionen werden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Endvolumen von 20 µL durchgeführt. Dazu werden 50 -100 ng DNA des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNA-Fragment gemischt und mit 2 U T4-Ligase zwischen 1 und 12 h bei RT bzw. 16°C inkubiert.

2.1.13. Präparation kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung von RbCl-kompetenten *E. coli* Zellen (DH5α) (Hanahan, 1985) werden diese als Vorkultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden 200 mL LB-Medium (Bertani, 1951) 1,5%ig (v/v) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert (2.2.2.2). Die

Kultur wird für 10 min bis zu 1 h auf Eis inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation (10 min, 2.000 x g, 4°C) wird das Sediment vorsichtig in 35 mL eiskaltem, sterilen TBF I-Puffer (10 mM CaCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂² (Carl Roth®), 100 mM RbCl₂² (Carl Roth®), 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Es folgt eine weitere Zentrifugation (10 min, 3.000 x g, 4°C). Das erhaltene Zellsediment wird abschließend in 6 mL eiskaltem TBF II-Puffer (10 mM MOPS (3-(N-Morpholino)propylsulfonsäure), 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂², 15% (v/v) Glycerin, pH 6,8) vorsichtig resuspendiert und in gekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu 100 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.14. Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli* (100 µL) werden diese langsam auf Eis aufgetaut und anschließend vorsichtig mit 5 µL eines Ligationsansatzes (2.1.12) bzw. mit 10 ng – 1 µg einer DNA-Minipräparation aus *E. coli* oder *S. cerevisiae* (2.1.6) für 30 min auf Eis inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen werden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt. Anschließend erfolgt die Zellregeneration für 60 bis 90 min in 900 µL LB-Medium bei 37°C und 180 rpm. 100 µL des Transformationsansatzes werden direkt auf LB-Agarplatten (einschließlich des entsprechenden Antibiotikums) ausplattiert (2% (m/v) Agar-Agar, 0,5% (m/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (m/v) Natriumchlorid, 1,0% (m/v) Trypton/Bactopecton-Gemisch). Werden 5 µL eines Ligationsansatzes transformiert, werden die Zellen zuvor zentrifugiert (1 min, 1.000 x g, 4°C), das Sediment in 100 µL Überstand resuspendiert und anschließend ausplattiert. Die LB-Agarplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Erhaltene Kolonien werden anschließend mittels DNA-Minipräparation (2.1.6) und anschließendem Restriktionsverdau (2.1.11) oder einer Kolonie-PCR (2.1.9) analysiert.

2.1.15. Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* müssen zuvor kompetente Hefen hergestellt werden. Ein entsprechender Hefestamm (meist aus Gefrierkultur) wird als

² Entsprechendes Volumen einer sterilfiltrierten 1 M Stammlösung wird dem autoklavierten Puffer zugegeben

Vorkultur in Komplexmedium bzw. dem entsprechenden Selektivmedium ein bis zwei Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert (2.2.2.4). Die Kultur wird anschließend zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C) und das Sediment mit 8 mL sterilem Milli-Q-H₂O und anschließend mit 8 mL LiOAc-Puffer (1 mM EDTA, 100 mM LiOAc (Carl Roth®), 10 mM TRIS-HCl) gewaschen. Die Hefen werden in 300 µL LiOAc-Puffer aufgenommen.

Zur Transformation werden die LiOAc behandelten Zellen mit denaturierter *carrier* DNA (*salmon testis*, invitrogen™, Denaturierung für 5 min bei 99°C, anschließend sofort auf Eis abkühlen) und der entsprechenden Plasmid-DNA inkubiert.

Transformationsansatz für *S. cerevisiae*

| | |
|---------------------------------|-------|
| Carrier DNA (2 g/L) | 10 µL |
| kompetente <i>S. cerevisiae</i> | 1 µL |
| Plasmid-DNA (0,1 – 10 µg) | 1 µL |

Tabelle 3 Pipetierschema der *S. cerevisiae* Transformation

Dem Transformationsansatz werden 350 µL 40%ige PEG 4.000 (Polyethyleglycol, SIGMA-ALDRICH) Lösung (1 mM EDTA, 100 mM LiOAc (Carl Roth®), 40% PEG 4.000 (SIGMA-ALDRICH), 10 mM TRIS-HCl) zugegeben und der komplette Ansatz für 1 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Um eine höhere Transformationseffizienz zu erhalten, schließt sich eine Hitzeschockreaktion von 10 min bei 42°C an. Die Zellen werden bei 1.000 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Die transformierten Zellen werden in 1 mL YEPD-Medium (2.2.2.4) resuspendiert und für 1 h bei 30°C unter Schütteln regeneriert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (1.000 x g, 1 min, 4°C), das Sediment in 100 µL sterilem Milli-Q-H₂O resuspendiert, auf entsprechenden Selektiv-Agarplatten (inkl. 2% (m/v) Agar-Agar, siehe 2.2.2.4) ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Um die Zellausbeute zu erhöhen werden einzelne Transformanten auf eine weitere Selektivplatte überführt und für einen Tag bei 30°C inkubiert.

2.1.16. Analytische und präparative Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgt in Abhängigkeit ihrer Größe mit Hilfe von Agarosegelen im elektrischen Feld. Zur

gelelektrophoretischen Analyse von DNA werden horizontale Agarosegele mit einem Bettvolumen von 30 - 100 mL und einem Taschenvolumen von 20 - 150 μ L eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wird eine 0,8 - 3%ige Agarose-Lösung in TAE-Puffer (TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer, 20 mM EDTA, 10 mM TRIS/Essigsäure pH 8) zum Gießen der Gele verwendet. Die Proben werden mit 1/6 Volumen 6-fach Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Als Längenstandard wurden 5 μ L des benötigten DNA-Markers (*GeneRulerTM 1kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder Plus*, Fermentas) eingesetzt. Die Elektrophorese wird in TAE-Puffer bei 80 - 150 mA durchgeführt. Die aufgetrennte DNA wird innerhalb des Gels 30 min in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 μ g/mL, Carl Roth[®]) angefärbt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids können DNA-Banden am UV-Durchlichttisch (312 nm, BIOView) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

Zu präparativen Zwecken wird das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel bei geringer Intensität am UV-Durchlichttisch analysiert und die entsprechenden DNA-Fragmente isoliert. Die Banden werden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

2.1.17. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt photometrisch (Nanodrop, peqLab Biotechnologie GmbH) durch Extinktionsmessung gegen H₂O bei 260 und 280 nm. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ μ L doppelsträngiger bzw. 33 μ g/ μ L einzelsträngige DNA. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.18. Klonierungsstrategien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG als Lyophilisat bezogen und mit sterilem H₂O auf 100 μ M verdünnt. Alle Stammlösungen werden bei -20°C gelagert.

2.1.18.1. Klonierungs- und Expressionsvektoren für *E. coli*

| | |
|--------------------------------------|---|
| pCR [®] 4-TOPO [®] | Klonierungsvektor, invitrogen TM |
| pET401 | Klonierungsvektor, (van der Sluis <i>et al.</i> , 2002) |
| pET302 | Klonierungsvektor, (van der Does <i>et al.</i> , 1998) |

| | |
|------------------------------|--------------------------------|
| ABCB6 (<i>H. sapiens</i>) | IRAU969A029D, NM_005689, RZPD |
| ABCB7 (<i>H. sapiens</i>) | IRAU969G0233D, NM_004299, RZPD |
| ABCB8 (<i>M. musculus</i>) | IRAV968G0429D, NM_029020, RZPD |
| ABCB10 (<i>H. sapiens</i>) | IRAT970C0986D, NM_012089, RZPD |

2.1.18.2. Klonierungs- und Expressionsvektoren für *S. cerevisiae*

| | |
|---|--|
| pFA6- <i>His3</i> MX6-pGAL1 | Amplifikation <i>GAL1</i> -Prom. und <i>HIS3</i> -Selektionskassette, Dr. P. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main |
| pRS424 | (Christianson <i>et al.</i> , 1992) |
| pMW142 | (Chloupková <i>et al.</i> , 2003) |
| pYES2.1/V5- <i>His</i> -TOPO [®] | invitrogen [™] |
| pYM9 | Amplifikation <i>His₇-Tag</i> inkl. KanMX-Selektionskassette, Dr. P. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main |

2.1.18.3. Konstruktion verschiedener *MDL1*-Plasmide

Durch Benutzung spezieller Restriktionsschnittstellen wird *MDL1* systematisch in drei Kassetten unterteilt, wodurch die Herstellung weiterer Konstrukte erleichtert ist. Hierzu wird eine neue stille *ClaI* Schnittstelle bei Aminosäure S221 generiert und die endogene Restriktionsschnittstelle *Bam*HI bei Aminosäure K422 verwendet (Hofacker *et al.*, 2007). Die einzelnen Kassetten werden mithilfe von PCR an genomischer DNA amplifiziert (2.1.7). Kassette I kodiert den N-terminalen Teil der Transmembrandomänen von MDL1 (Aminosäure M1 - A220) bis zur eingefügten *ClaI* Schnittstelle. Kassette II beinhaltet die zentrale Region von MDL1 (Aminosäure S221 - K422) ausgehend von der *ClaI* bis zur intrinsischen *Bam*HI Schnittstelle. Kassette III kodiert die NBD von Aminosäure D423 bis zum N-Terminus (V695) einschließlich eines zusätzlichen *His₈-Tags*. Ebenso wird eine Version der Kassette III ohne einen C-terminalen *Tag* kloniert (Kassette IIIa). Kassette I wird in verschiedenen Weisen modifiziert, indem die ersten 68 Aminosäuren, die die mitochondriale Leitsequenz enthalten, deletiert sind (Kassette Ia) und ohne die ersten 59 Aminosäuren, wodurch später das Konstrukt MDL1(60-695) erhalten wird. Die verschiedenen Kassetten I/Ia, II und III/IIIa werden sequentiell in pET401 (van der Sluis *et al.*, 2002) ligiert (2.1.12).

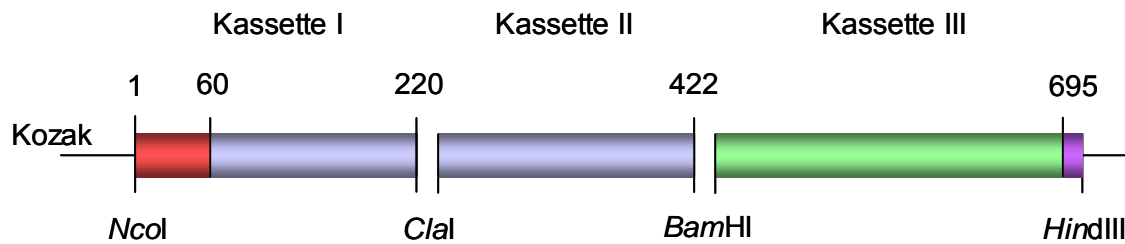


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von MDL1

Das *MDL1*-Gen wird systematisch durch eine intrinsische und eine eingeführte Restriktionsschnittstelle in drei Kassetten aufgeteilt. Kassette I beinhaltet die KOZAK und die mitochondriale Leitsequenz (rot), die Transmembrandomäne (blau) befindet sich (Trennung durch die intrinsische Restriktionsschnittstelle *ClaI*) auf Kassette I und II. Kassette II entspricht der Nukleotidbindedomäne (grün), welche mit verschiedenen *Tags* (lila) generiert werden kann.

2.1.18.4. *MDL1*-Expressionsplasmide für *E. coli* und *L. lactis*

Das *MDL1*-Gen wird ebenso in den Organismen *E. coli* und *L. lactis* (*Lactococcus lactis*) exprimiert. Hierzu wird der Expressionsvektor in verschiedene *E. coli* Stämme, z.B. BL21(DE3) (Novagen[®]), C41 (Miroux und Walker, 1996), C43 (Miroux und Walker, 1996), SF100 (Baneyx und Georgiou, 1990) und TOP10 (invitrogen[™]), transformiert. Die einzelnen Stämme werden in LB-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen (18, 25, 30, 37°C) kultiviert (2.2.2.2). Abhängig von dem jeweiligen System wird die Expression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid, 0,025, 0,1, 0,2, 0,5 mM) oder L(+)-Arabinose (0,004, 0,04, 0,4%, Carl Roth[®]) bei verschiedenen OD₆₀₀ (0,2, 0,6, 1,0) und über unterschiedliche Zeiträume (1, 2, 3, 6 h, über Nacht) induziert. Ebenso wird die MDL1-Expression unter Bedingungen analysiert, bei welchen zusätzliche Chaperone koexprimiert werden, z.B. in Anwesenheit von 1 M D-Sorbitol, 2% Ethanol oder bei einer Temperatur von 42°C. Zusätzlich wird die Koexpression seltener tRNAs (pRARE, Novagen[®]) analysiert. Um den Membraneinbau zu unterstützen wird das *MDL1*-Gen im Plasmid pK184 (Jobling und Holmes, 1990) mit Komponenten der SecY, SecE, SecG und YidC *E. coli* Translokase (van der Laan *et al.*, 2001) koexprimiert.

Zur Proteinexpression in *L. lactis* wird der Stamm NZ9000 (de Ruyter *et al.*, 1996) mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (Hofacker *et al.*, 2007) (Ausgangsplasmid pNZ8084 (de Ruyter *et al.*, 1996)). Aus beiden Expressionssystemen werden anschließend die Membranen isoliert (van der Does *et al.*, 2003). Die Proteine werden durch SDS-PAGE (10%, Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und die MDL1-Expressionseffizienz durch quantitative Immundetektion mit dem α MDL1-Antikörper untersucht (2.2.3.11). Die

gereinigte MDL1-Nukleotidbindedomäne (Janas *et al.*, 2003) dient hierbei als Referenz der Quantifizierung.

2.1.18.5. Klonierung von MDL1

Kassette I des MDL1-Gens (2.1.18.3) wird von dem früher beschriebenen MDL1-Plasmid p426-MDL1-strepII (Janas, 2002) amplifiziert, indem der *forward* Primer p1(f) mit neuer *KpnI*, *SpeI*, Kozak-Sequenz und *NcoI* Restriktionsschnittstelle und der *reverse* Primer p1(r) benutzt werden. Für Kassette II und III wird die beschriebene Original-DNA pBad-HisB-MDL1(-mt)KI.4 (Janas, 2002) verwendet. Kassette II wird mit Hilfe des *forward* Primers p2(f) mit der neuen *Clal* Schnittstelle und des *reverse* Primers p2(r) hergestellt. Die C-terminale Kassette III wird durch den *forward* Primer p3(f) und den *reverse* Primer p3(r) mit einer zusätzlichen *XbaI* und *HindIII*, bzw. für die His-getaggte Version der Kassette III mit dem Primer p3,His₈(r) generiert. Die erhaltenen PCR-Produkte der einzelnen Kassetten werden via TOPO TA Cloning[®] in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor (invitrogenTM) kloniert (die entsprechenden generierten Konstrukte sind im Anhang aufgeführt). Die einzelnen Kassetten werden anschließend der Reihe nach mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsschnittstellen in dem Vektor pET401 (van der Sluis *et al.*, 2002) zu den beiden Plasmiden pET401-MDL1 und pET401-MDL1-His₈ kombiniert (2.1.11, 2.1.12), die MDL1 in vollständiger Länge enthalten (benötigte Zwischenkonstrukte sind im Anhang beschrieben).

| Primer | Sequenz | Bemerkung ^a |
|-------------------------|---|--|
| p1(f) | <u>GGT ACC ACT AGT GCC GCC ACC ATG GTT</u> GTA AGA ATG ATA CGT CTT TGT AAA GG | <i>KpnI</i> , <i>SpeI</i> , Kozak, <i>NcoI</i> |
| p1(r) | GGC CAC <u>TAT CGA TGC</u> ATC AGA TG | <i>Clal</i> |
| p2(f) | CA TCT GAT GCA <u>TCG ATA</u> GTG GCC | <i>Clal</i> |
| p2(r) | GTG TTT GGG CCG AGT GGG AT | <i>BamHI</i> ^b |
| p3(f) | G CCA TTG ATT CGT CCG ACT A | <i>BamHI</i> ^b |
| p3(r) | <u>TCT AGA AAG CTT</u> TTA TAC TTC CCG GGC AAC ACT ATT GTC C | <i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> |
| p3,His ₈ (r) | <u>TCT AGA AAG CTT</u> TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG TAC TTC CCG GGC AAC ACT ATT GTC C | <i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> , His ₈ |

Tabelle 4 Primer zur Klonierung von MDL1

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; ^aBemerkungen zu dem eingesetzten Primer bzw. eingeführte Restriktionsschnittstelle durch Primer, ^b*BamHI* Schnittstelle befindet sich *up-* oder *down-stream* des Primers

2.1.18.6. **MDL1 in p426-GPD**

Um *MDL1* in *S. cerevisiae* homolog exprimieren zu können, wird *MDL1* ohne und mit *Tag* aus den Konstrukten pET401-*MDL1* und pET401-*MDL1*-His₈ über die Schnittstellen *SpeI* und *HindIII* in den Vektor p426-*GPD* (Glyceralaldehyd-3-Phosphat) (Mumberg *et al.*, 1995) kloniert, wodurch die beiden Konstrukte p*GPD*-*MDL1* und p*GPD*-*MDL1*-His₈ erhalten werden. *GPD* ist ein konstitutiver Hefe-Promotor. Die Proteinexpression ist generell angeschaltet und kann nicht, z.B. durch Austausch der Kohlenstoffquelle, reguliert werden.

2.1.18.7. **MDL1 kontrolliert durch einen Glycerin induzierbaren Promotor**

Durch Verdau von pYES-*MDL1*-Xa-His₈ und pYES-*Paac2-aac2* (van der Giezen *et al.*, 2002) mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BglI* (schneidet innerhalb der Ampicillin-Selektionskassette, siehe 2.1.11) und anschließende Ligation (2.1.12) wird *MDL1* unter die Kontrolle eines Glycerin induzierbaren Promotors gestellt. Das resultierende Konstrukt pYES3-*MDL1*-His₈ besitzt neben einer Ampicillin-Resistenz eine *TRP1*-Selektionskassette.

2.1.18.8. **MDL1 in pYES2.1/V5-His-TOPO®**

Ebenso kann das vollständige *MDL1*-Gen unter die Kontrolle des Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotors gestellt werden. Hierzu wird das Plasmid pYES2.1/V5-His-TOPO® (invitrogen™) verwendet. Das Plasmid pET401-*MDL1*-His₈ wird mit Hilfe der beiden Primer p1.1(f) und p3.1(r), der an einen Teil des vorhandenen His₈-Tags bindet, amplifiziert (2.1.7). Das generierte vollständige *MDL1*-PCR-Produkt wird via *TOPO TA Expression cloning Kit* (invitrogen™) in den Expressionsvektor (resultierendes Plasmid pYES-*MDL1*-His₈) kloniert.

Für eine verbesserte Proteinreinigung wird das Konstrukt pYES-*MDL1*-Xa-His₈ generiert, in welchem der C-terminale His₈-Tag durch vier Glyzine und eine Faktor Xa Schnittstelle von *MDL1* separiert ist. Hierzu wird wiederum pET401-*MDL1*-His₈ als Matrize eingesetzt, ebenso der *forward* Primer p1.1(f). Der *reverse* Primer p3.2(r), der einen His₈-Tag, eine Faktor Xa Schnittstelle und vier Glyzine enthält, wird verwendet (2.1.7).

| Primer | Sequenz | Bemerkung ^a |
|---------|---|---|
| p1.1(f) | <u>GCC GCC ACC ATG GTT GTA AG</u> | Kozak, <i>NcoI</i> |
| p3.1(r) | TTA <u>GTG ATG GTG ATG GTG ATG G</u> | - |
| p3.2(r) | <u>TCT AGA AAG CTT TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG</u> <u>ATG CCG CCC TTC GAT GCC GCC GCC GCC TAC TTC CCG</u> GGC AAC ACT ATT GTC C | <i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> , <i>His₈</i> , <i>Xa</i> , <i>Gly₄</i> |

Tabelle 5 Primer für *MDL1* in pYES2.1/V5-His-TOPO[®]

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; ^aBemerkungen zu dem eingesetzten Primer bzw. eingeführte Restriktionsschnittstelle durch Primer

2.1.18.9. Punktmutationen im *MDL1-Gen*

Remutation L150F

Aufgrund von Unstimmigkeiten der Aminosäure 150 zweier publizierter *MDL1*-Gensequenzen wird im Konstrukt pYES-*MDL1*-*Xa*-His₈ eine Punktmutation durchgeführt. Die vorhandene Aminosäure L150 wird zu dem originalen F150 rückmutiert. Hierzu muss zuerst Kassette I und II mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SpeI* und *Bam*HI aus dem Plasmid pYES-*MDL1*-*Xa*-His₈ zurück in den Klonierungsvektor pET401 (van der Sluis *et al.*, 2002) eingefügt werden (pET401-*MDL1*(I-II)) (2.1.11). Anschließend wird die LCR-Reaktion (2.1.8) in Anwesenheit des Mutagenese-Primers pL150F vorgenommen, um den Aminosäureaustausch L150F vorzunehmen. Daraus resultiert das Konstrukt pET401-*MDL1*(I-II, L150F). Durch wiederholte Restriktion durch die zuvor verwendeten Restriktionsenzyme können die beiden Kassetten, einschließlich der eingeführten Mutation, zurück in den Expressionsvektor pYES-*MDL1*-*Xa*-His₈ kloniert werden (2.1.12). Hieraus ergibt sich das Plasmid pYES-*MDL1*(L150F)-*Xa*-His₈.

| Primer | Sequenz | Bemerkung |
|--------|--|-----------|
| pL150F | AAG TTA TAT GGT <u>TTT</u> ACG AAG AAG CAA | (mut) |

Tabelle 6 Primer der Remutation L150F

(mut) Mutagenese-Primer

Generierung der E599Q und H631A-Mutanten

Um die E599Q und die H631A-Mutanten in *MDL1* zu klonieren wird eine PCR-Reaktion an dem Plasmid pYES-*MDL1*-*Xa*-His₈ in Anwesenheit des *forward* Primers p3(f) und des *reverse* Primers p3.3(r) bei dem sich an das Stopkodon C-terminal eine neu generierte *EcoRI* Restriktionsschnittstelle anschließt, durchgeführt (2.1.7). Das

erhaltene PCR-Produkt wird mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten (2.1.11), um die generierte Kasette III mit dem Klonierungsvektor pET401 zu ligieren (2.1.12). Das erhaltene Plasmid pET401-*MDL1*(III.1)-His₈ wird zur LCR-Reaktion mit dem Mutagenese-Primer pE599Q bzw. pH631A eingesetzt (2.1.8). Nach wiederholter Restriktion mit den zuvor verwendeten Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III (2.1.11) wird die entsprechende mutierte Kasette III zurück in den Expressionsvektor pYES-*MDL1*-Xa-His₈ gesetzt (2.1.12), wodurch die beiden Konstrukte pYES-*MDL1*(E599Q)-Xa-His₈, bzw. pYES-*MDL1*(H631A)-Xa-His₈ entstehen.

| Primer | Sequenz | Bemerkung ^a |
|---------|--|---|
| p3(f) | G CCA TTG ATT CGT CCG ACT A | <i>Bam</i> HI ^b |
| p3.3(r) | <u>TCT AGA AAG CTT GAA TTC TTA GTG ATG GTG ATG GTG</u> <u>ATG GTG ATG CCG CCC TTC GAT GCC GCC GCC</u> | <i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, His ₈ , Xa, Gly ₃ |
| pE599Q | CTT ATT TTA GAT <u>CAA</u> GCA ACC AGT GCC | (mut) |
| pH631A | CT ATA TCA ATT GCA <u>GCG</u> AGG CTT TCG ACG | (mut) |

Tabelle 7 Primer zur Generierung von *MDL1*(E599Q) und *MDL1*(H631A)

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; (mut) Mutagenese-Primer; ^aBemerkungen zu dem eingesetzten Primer bzw. eingeführte Restriktionsschnittstelle durch Primer; ^b*Bam*HI Schnittstelle befindet sich *up-* oder *down-stream* des Primers

2.1.18.10. Deletion der mitochondrialen Signalsequenz von *MDL1*

Neben der kompletten Kasette I von *MDL1* werden ebenfalls zwei verkürzte Version (I60-220 und I69-220) generiert, die von Aminosäure Q60 bzw. S69 bis A220 reichen.

Kasette I69-220 wird von dem früher beschriebenen *MDL1*-Plasmid pBAD HisB-*MDL1*(-mt) Kl.4 (Janas, 2002) amplifiziert, indem der *forward* Primer p1.2(f) mit einem Startkodon, der *Nco*I und einer zusätzlichen *Eco*RI Schnittstelle, und der *reverse* Primer p1(r) verwendet werden (2.1.7). Das erhaltenen PCR-Produkt wird in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor (invitrogenTM) kloniert, wodurch das Plasmid pCR-*MDL1*(I,Δ68) entsteht. Anschließend wird die Kasette mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nco*I und *Cla*I in den Vektor pET401 eingebaut (resultierendes Plasmid pET401-*MDL1*(I,Δ68), 2.1.11, 2.1.12). Die drei *MDL1*-Kassetten (*MDL1*(I,Δ68), *MDL1*(II), *MDL1*(III) bzw. *MDL1*(III)-His₈) werden mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsschnittstellen zu den verkürzten *MDL1*-Konstrukten

pET401-*MDL1*(Δ 68) und pET401-*MDL1*(Δ 68)-His₈, bzw. p*GPD-MDL1*(Δ 68) und p*GPD-MDL1*(Δ 68)-His₈ kombiniert (2.1.11, 2.1.12).

Ein N-terminaler His₁₀-*Tag* wird durch die zu Hilfenahme des pET302 Vektors erreicht. Auf dem Vektor pET302 ist N-terminal der *MCS* (*multiple cloning site*) ein His₁₀-*Tag* kodiert, der zusammen mit dem Gen amplifiziert wird. Das deletierte *MDL1* wird mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XbaI* aus dem Konstrukt pET401-*MDL1*(Δ 68) in die *MCS* des Vektors pET302 (van der Does *et al.*, 1998) ligiert (2.1.11, 2.1.12). Es entsteht das Konstrukt pET302-His₁₀-*MDL1*(Δ 68). Zur Überexpression der Deletionsvariante von *MDL1* in *S. cerevisiae* werden die entsprechenden Konstrukt in den pYES2.1/V5-His-TOPO[®] Expressionsvektor kloniert. Ein PCR-Produkt wird von dem Plasmid pET302-His₁₀-*MDL1*(Δ 68) amplifiziert, indem die Primer p1.3(f) (ohne *Tag*), bzw. p1.4(f) (kodiert einen N-terminalen His-*Tag*), und p3.4(r) benutzt werden (2.1.7). Die erhaltenen PCR-Produkte werden in den pYES2.1/V5-His-TOPO[®]-Vektor (invitrogen[™]) kloniert (2.1.12) wodurch die Plasmide pYES-*MDL1*(Δ 68) und pYES-His₁₀-*MDL1*(Δ 68) entstehen.

| Primer | Sequenz | Bemerkung ^a |
|---------|--|--|
| p1.2(f) | <u>CC ATG GCG AAT TCG</u> TCC ACC AAG CCC ACT TTA AAG TTG TCC | <i>NcoI</i> (inkl. Start), <i>EcoRI</i> |
| p1.3(f) | GCC GCC ACC ATG TCC ACC AAG CCC ACT TTA AAG TTG TCC AAT GC | Start, <i>MDL1</i> ab S69 |
| p1.4(f) | GCC GCC ACC ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT TCC ACC AAG CCC ACT TTA AAG TTG TCC AAT GC | Start, His ₁₀ , <i>MDL1</i> ab S69 |
| p1.5(f) | GCC GCC ACC ATG CAA TCA GAC ATT GCG CAA GGA AAG AAG TCC | Start, <i>MDL1</i> ab Q60 |
| p1.6(f) | GCC GCC ACC ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAA TCA GAC ATT GCG CAA GGA AAG AAG TCC | Start, His ₁₀ , <i>MDL1</i> ab Q60 |
| p1(r) | GGC CAC <u>TAT CGA TGC</u> ATC AGA TG | <i>ClaI</i> |
| p3.4(r) | <u>TTA</u> TAC TTC CCG GGC AAC ACT ATT GTC C | Stopp |

Tabelle 8 Primer der *MDL1*-Deletionskonstrukte

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; ^aBemerkungen zu dem eingesetzten Primer bzw. eingeführte Restriktionsschnittstelle durch Primer

Ebenso werden die entsprechenden Konstrukte generiert die *MDL1* schon ab Aminosäure Q60 kodieren. Hierzu wird ebenfalls das Plasmid pET302-His₁₀-*MDL1*(Δ 68) benutzt. Mit Hilfe der Primer p1.5(f), p1.6 (f) und p3.4(r) werden die

entsprechenden Deletionskonstrukte ohne und mit His-Tag amplifiziert (2.1.7). Die PCR-Fragmente werden via *TOPO TA Expression cloning Kit* (invitrogen™) zu den Konstrukten pYES-MDL1(Δ 59) und pYES-His₁₀-MDL1(Δ 59) generiert.

2.1.18.11. Mutationen in pMW142

Um das Komplementationsverhalten von MDL1 in Bezug auf ATM1 *in vivo* zu untersuchen, werden verschiedene MDL1-Mutanten generiert. Hierzu wird das MDL1-Plasmid (Chloupková *et al.*, 2003) (pMW142), das freundlicherweise von Dr. M. Chloupková und Prof. Dr. D. Koeller, *Oregon Health and Science University*, Portland, USA zur Verfügung gestellt wurde, als Matrize eingesetzt. Für alle Mutanten wird das Zwischenkonstrukt pET401-MDL1(III.2) verwendet, welches die NBD des MDL1-Plasmids beinhaltet. Das MDL1-Plasmid und der Vektor pET401 werden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I verdaut (2.1.11) und die entsprechenden DNA-Fragmente ligiert (2.1.12). Die Mutante pMW-MDL1(K473A) wird mit Hilfe des Mutagenese-Primers pK473A generiert (2.1.8) und anschließend durch wiederholten *Bam*HI/*Xba*I Verdau des Konstruktes pET401-MDL1(III.2,K473A) mit dem entsprechenden DNA-Fragment des MDL1-Plasmids ligiert (2.1.11, 2.1.12). In gleicher Weise wird mit den Konstrukten pMW-MDL1(E599Q) und pMW-MDL1(H631A) verfahren. Für diese Konstrukte werden die Mutagenese-Primer pE599Q und pH631A verwendet.

Innerhalb des MDL1-Plasmids (Chloupková *et al.*, 2003) wird das Gen durch den intrinsischen Promotor kontrolliert. Das durch die Primer pRS424(f) und (r) amplifizierte MDL1-Gen, einschließlich des Galaktose induzierbaren Promotors (Matrize pYES-MDL1(L150F)-Xa-His₈), wird durch *Pst*I/*Xho*I Restriktionsverdau und Ligation in den pRS424 Vektor (Christianson *et al.*, 1992) (Selektion durch *TRP*1) integriert (2.1.11, 2.1.12). In gleicher Weise, wie pRS424-GAL1-MDL1-His₈, wird pRS424-GAL1-MDL1(H631A)-His₈ mithilfe der Matrize pYES-MDL1(H631A)-Xa-His₈ generiert.

Um die Auswirkung eines C-terminalen His-Tags auf das ATM1-Komplementationsverhalten analysieren zu können, werden zwei Konstrukte generiert, die sich durch ein zusätzliches Stopkodon vor dem His-Tag unterscheiden. Der His₈-Tag wird durch Austausch der Kasette III des MDL1-Plasmids (Chloupková *et al.*, 2003) mit dem entsprechende Genfragment des Konstruktes pYES-MDL1(L150F)-Xa-His₈ integriert (*Bam*HI/*Xba*I, resultierendes Konstrukt pMW-

MDL1-Xa-His₈). Anschließend wird ein Stopkodon zwischen *Tag* und Gen eingeführt, wodurch die Expression des *Tags* ausgeschlossen wird. Hierzu wird die Kassette III (*Bam*HI/*Xba*I) des Konstruktes *pMW-MDL1-Xa-His₈* in den Klonierungsvektor *pET401* integriert und das Stopkodon mithilfe des Mutagenese-Primers *pStop* eingeführt (2.1.8). Dieses Genfragment der Kassette III wird über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in den *pMW142* Vektor (Chloupková *et al.*, 2003) integriert.

Um *pMW-MDL1(60-695)* zu erhalten werden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt (2.1.7). Das erste PCR-Produkt startet mit dem Startkodon gefolgt von *MDL1* ab Aminosäure Q60 und wird mit den beiden Primern *p1.7(f)* und *p2(r)* hergestellt. Das zweite PCR-Produkt generiert die Plasmid-Sequenz aufwärts von *MDL1* bis zur intrinsischen *Kpn*I Restriktionsschnittstelle des Vektors *pMW142* (Chloupková *et al.*, 2003). Das DNA-Fragment wird durch das Primerpaar *p4(f)* und *p4(r)* amplifiziert. Die amplifizierten PCR-Produkte werden in das *MDL1*-Plasmid kloniert, wobei die Schnittstellen *Kpn*I/*Spe*I und *Spe*I/*Bam*HI benutzt werden.

pMW-MDL1(Cys-frei) wird mit den Mutagenese-Primern *pC257S*, *pC464S*, *pC531S* und *pC552S* generiert. In einem ersten Schritt wird das *MDL1* (Chloupková *et al.*, 2003) Genfragment M1 - K422 durch die Restriktionsenzyme *Kpn*I und *Bam*HI in den Klonierungsvektor *pET401* inseriert (2.1.11, 2.1.12) und die Mutagenesereaktion für Aminosäure C257 durchgeführt (2.1.8). Für die Mutagenese der Cysteine an Position 464, 531 und 552 wird das Plasmid *pET401-MDL1(III)* eingesetzt. Um das resultierende Cystein-freie Genfragment (*pET401-MDL1(III,C464/531/552S)*) in den *pMW142* Vektor integrieren zu können werden die Primer *p3.5(f)* und *p3.4(r)* eingesetzt. Durch die neu generierte *Sma*I Schnittstelle kann die Kassette III des *pMW142* Vektor gegen die Cystein-freie Kassette ausgetauscht werden. Der Austausch der Kassette I gegen das Cystein-freie Genfragment erfolgt durch *Kpn*I/*Bam*HI Verdau (2.1.11) und anschließende Ligation (resultierendes Konstrukt *pMW-MDL1(C257/464/531/552S)*, siehe 2.1.12). Es sei erwähnt, dass Cys9 innerhalb der mitochondrialen Leitsequenz nicht zu einem Serin ausgetauscht wird, da dieser Teil des Gens im reifen Protein nicht vorhanden ist.

| Primer | Sequenz | Schnittstelle ^a |
|-----------|--|----------------------------|
| pK473A | CCA TCA GGA AGC GGC <u>GCA</u> TCA ACA ATT GCG TCT TTG | (mut) |
| pE599Q | CTT ATT TTA GAT <u>CAA</u> GCA ACC AGT GCC | (mut) |
| pH631A | CT ATA TCA ATT GCA <u>GCG</u> AGG CTT TCG ACG | (mut) |
| pRS424(f) | GGT GGT <u>CTC GAG</u> GGT TTA ACA GAT ATA TAA ATG CAA AAA C | <i>XhoI</i> |
| pRS424(r) | A CCA CCC <u>TGC AGA</u> CCA AAG CTT TTA GTG ATG GTG AT G GTG | <i>PstI</i> |
| pStop | GCC GCC GCC <u>TTA</u> TAC TTC CCG GGC AAC | (mut) |
| p1.7(f) | GGC <u>ACT AGT</u> ATG CAA TCA GAC ATT GCG | <i>SpeI</i> |
| p2(r) | GTG TTT GGG CCG AGT GGG AT | <i>BamHI</i> ^b |
| p4(f) | G TGA ATT CGA GCT <u>CGG TAC</u> CCC TGA TT | <i>KpnI</i> |
| p4(r) | GCC <u>ACT AGT</u> TGG AGC CCT TCC | <i>SpeI</i> |
| pC257S | AAA TTG ACT <u>TCC</u> GTA ATG ATG | (mut) |
| pC464S | GGT GAA CAC GTT <u>TCC</u> GCT GTC GGT CCA TCA GG | (mut) |
| pC531S | G GAC AAT ATC CTC TAC <u>TCC</u> ATT CCG CCT GAA ATT GC | (mut) |
| pC552S | CGT GCT ATT GGA AAA GCT AAT <u>TCC</u> ACA AAA TTT TTG GCC | (mut) |
| p3.5(f) | GGA AAG <u>GAT CCT</u> GTG TCA | <i>BamHI</i> |
| p3.4(r) | TAC TTC <u>CCG GGC</u> AAC ACT A | <i>SmaI</i> |

Tabelle 9 Primer der *MDL1*-Konstrukte in pMW142

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; (mut) Mutagenese-Primer; ^aRestriktionsschnittstelle durch Primer eingeführt; ^b*BamHI* Schnittstelle befindet sich *up-* oder *down-stream* des Primers

2.1.18.12. Klonierung mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern

Zur Identifizierung des funktionellen Homologs von MDL1 aus Säugern, werden die vier bekannten mitochondrialen ABC-Transporter ABCB6, ABCB7, ABCB8 und ABCB10 (Abbildung 5, siehe 10.10.3) in das Konstrukt pRS424-*GAL1-MDL1-His₈* kloniert. Neben der vorhandenen *TRP1*-Selektionskassette enthält das Plasmid den Galaktose induzierbare *GAL1*-Promotor. Die cDNA Klone der ABC-Transporter wurden über das deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, www.rzpd.de) bezogen.

Um ABCB6, ABCB7, ABCB10 aus *H. sapiens* und ABCB8 aus *M. musculus* in den Vektor pRS424-*GAL1* integrieren zu können, werden dem Vektor die beiden Restriktionsschnittstellen *CpoI* (N-terminal) und *Ascl* (C-terminal) angefügt. Hierzu wird pRS424-*GAL1-MDL1-His₈* als Matrize und die beiden Primer phABCB(f) und (r) verwendet (2.1.7). ABCB6 wird mit Hilfe von pABCB6(f) und (r) aus dem entsprechenden cDNA Klon amplifiziert und mit Hilfe der beiden neu generierten

Restriktionsschnittstellen *CpoI* und *Ascl* in den Vektor pRS424 (Christianson *et al.*, 1992) ligiert (2.1.11, 2.1.12). Erhalten wird das Konstrukt pRS424-ABCB6. Ebenso wird mit ABCB7 verfahren. Hierbei kommen die beiden Primer pABCB7(f) und (r) zum Einsatz. Für ABCB8 wird das Homolog der Maus verwendet. Ebenso wie bei den zuvor beschriebenen Konstrukten wird das Gen durch die beiden Primer pABCB8(f) und (r) amplifiziert und in pRS424-GAL1 integriert. *MDL1* dient als Kontrolle und wird auf gleiche Weise durch die beiden Primer pMDL1(f) und (r) amplifiziert und das Konstrukt pRS424-*MDL1* generiert. Für ABCB10 wird eine neu generierte N-terminale *SaI* und die intrinsische *NotI* Restriktionsschnittstelle verwendet. Dem Plasmid pRS424-GAL1-*MDL1*-His₈ werden die beiden Schnittstellen durch PCR mit Hilfe der Primer phABCB-1(f) und phABCB(r) angefügt (2.1.7). Durch Verdau mit den Enzymen *SaI* und *NotI* wird ABCB10 aus dem cDNA Klon herausgeschnitten (2.1.11) und in den generierten pRS424-GAL1 Vektor integriert (2.1.12).

| Primer | Sequenz | Schnittstelle ^a |
|-------------|--|----------------------------|
| phABCB(f) | TT TAA <u>ACG GTC CGT</u> GGC GGC AAG GGC GA | <i>CpoI</i> |
| phABCB-1(f) | T TTA AAG <u>TCG ACT</u> GGC GGC AAG GGC GA | <i>SaI</i> |
| phABCB(r) | T TAA ATT <u>TGG CGC GCC</u> CCC GGG GGA TCC ACT A | <i>Ascl</i> |
| pABCB6(f) | T TTC <u>GGA CCG</u> ATG GTG ACT GTG GGC AAC T | <i>CpoI</i> |
| pABCB6(r) | TT TAA <u>AGG CGC GCC</u> TCA CCG TTC CAT GGT CTG AG | <i>Ascl</i> |
| pABCB7(f) | AAT TTC <u>GGA CCG</u> ATG GCG CTG CTC GCG AT | <i>CpoI</i> |
| pABCB7(r) | A <u>AGG CGC GCC</u> TTA GCA CGA ACA GTT TC | <i>Ascl</i> |
| pABCB8(f) | G <u>GCC GGA CCG</u> ATG TTG GTG CAC TTA TTT CG | <i>CpoI</i> |
| pABCB8(r) | TT TAA <u>AGG CGC GCC</u> TCA GGC TTT GGA CTG | <i>Ascl</i> |
| pMDL1(f) | <u>GCC GGA CCG</u> ATG GTT GTA AGA ATG ATA CGT C | <i>CpoI</i> |
| pMDL1(r) | AA <u>AGG CGC GCC</u> TTA TAC TTC CCG GGC AAC AC | <i>Ascl</i> |

Tabelle 10 Primer zur Klonierung mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern

(f) *forward* Primer; (r) *reverse* Primer; ^aRestriktionsschnittstelle durch Primer eingeführt

2.1.18.13. Klonierung des MDL1-Homologs aus *Podospora anserina*

Podospora anserina zeigt Homologe zu MDL1, MDL2 und ATM1 aus *S. cerevisiae* (Abbildung 5). Die verschiedenen Gene werden durch PCR aus den Ausgangsmatrizen (Dr. A. Hamann, Prof. Dr. Osiewacz, Institut für Molekulare Biowissenschaften, J.W. Goethe Universität Frankfurt) amplifiziert. Durch die beiden Primer pPa_MDL1(f) und (r), bzw. pPa_MDL2(f) und (r) werden dem MDL1-, bzw.

MDL2-Homolog jeweils eine N-terminale *CpoI* und eine C-terminale *Ascl* Restriktionsschnittstelle angefügt. Nach anschließendem Verdau (2.1.11) können die Gene in den pRS424-*MDL1* Vektor (Verlust von *MDL1* durch Verdau mit *CpoI* und *Ascl*) integriert werden (2.1.12). Das ATM1-Homolog wird durch das Primerpaar pPa_ATM1(f) und (r) amplifiziert (2.1.7), wodurch eine N-terminale *BglII* und eine C-terminale *Ascl* Restriktionsschnittstelle angefügt werden. Ebenso wird eine *BglII* Schnittstelle in den pRS424-*MDL1* Vektor durch die Primer pPa_V(r) und phABCB(f) eingeführt. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *Ascl* werden Gen und Vektor ligiert (2.1.11, 2.1.12).

| Primer | Sequenz | Schnittstelle ^a |
|-------------|--|----------------------------|
| pPa_MDL1(f) | T TTC <u>GGA CCG</u> ATG GTT TCG GGG GCG GTC GCA G | <i>CpoI</i> |
| pPa_MDL1(r) | TT TGG <u>CGC GCC</u> TTA CCG CTT CTT CTC CTC AAC CTC CTT AAC CT | <i>Ascl</i> |
| pPa_MDL2(f) | T TTC <u>GGA CCG</u> ATG TCG AAG CCG AGC GCC AAT | <i>CpoI</i> |
| pPa_MDL2(r) | TT TGG <u>CGC GCC</u> CTA AAG CTC ACT CAA CTC CCT CAC CCT CCT CTC | <i>Ascl</i> |
| pPa_ATM1(f) | TTT <u>AGA TCT</u> ATG GCT CCC CAG GCG CGA ATC A | <i>BglII</i> |
| pPa_ATM1(r) | TT TGG <u>CGC GCC</u> CTA CTC TTT CTT CTC AGC GTT GAT CTC C | <i>Ascl</i> |
| pPa_V(r) | TTT <u>AGA TCT</u> TGG CGG CAA GGG CGA GCT TA | <i>BglII</i> |

Tabelle 11 Primer der MDL1-, MDL2- und ATM1-Homologen aus *P. anserina*

(f) forward Primer; (r) reverse Primer; ^aRestriktionsschnittstelle durch Primer eingeführt

2.1.18.14. Chromosomale Integration in *S. cerevisiae*

Verschiedene Membranproteine zeigen eine Hyperexpression wenn sie durch den *PDR5*-Promotor kontrolliert und chromosomal in den Hefestamm YALF-A1 integriert werden. Dieser Hefestamm besitzt eine Deletion der Gene *pdr1-pdr3* (Carvajal *et al.*, 1997). Um das *MDL1*-Gen chromosomal unter die Kontrolle des starken *PDR5*-Promotor zu stellen, wird das Gen aus dem Plasmid pET401-*MDL1*-His₈ mit Hilfe der Primer pPDR5.1(f) und (r) amplifiziert (2.1.7) und via *TOPO TA Cloning*[®] in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor (invitrogenTM) kloniert. pCR-*MDL1*-His₈ beinhaltet N- und C-terminal die neu generierten Schnittstellen *PacI* und *Ascl*, und *MDL1* mit einem C-terminalen His₈-Tag. Nach Verdau (2.1.11) wird das Gen in den Vektor pFA6a-His3MX6 (Wach *et al.*, 1994) ligiert (2.1.12). pFA-*MDL1*-His₈ wird im weiteren Verlauf als Matrize für das Primerpaar pPDR5.2(f) und (r) eingesetzt. Nach Ethanol-fällung des erhaltenen PCR-Fragmentes (2.1.10), welches neben dem *MDL1*-Gen eine *HIS3*

Kassette enthält, wird dieses in den Hefestamm YALF-A1 (Wolfger *et al.*, 1997) transformiert (2.1.15). Transformanten, nach homologer Rekombination, werden SCD-HIS (2.2.2.4) Agarplatten selektioniert und anschließend mit Hilfe der Kolonie-PCR analysiert (2.1.9).

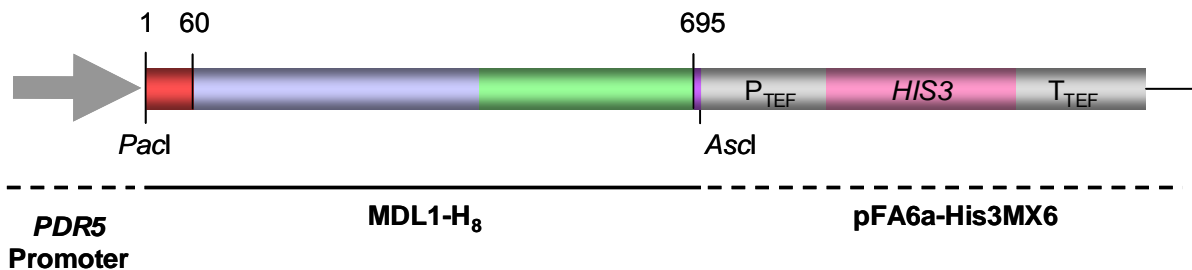


Abbildung 10 *MDL1* unter der Kontrolle des *PDR5*-Promotors

Für verschiedene *PDR5*-Promotor kontrollierte Membranproteine konnte eine Überexpression gezeigt werden (Carvajal *et al.*, 1997). *MDL1* inkl. eines C-terminalen His₈-Tags und einer *HIS3* Kassette werden durch homologe Rekombination in den Hefestamm YALF-A1 transformiert.

Um den Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotor in das Genom von *S. cerevisiae* zu integrieren, wird die Promotorregion, einschließlich einer Histidin-Selektionskassette, mithilfe der Primer pGAL1(f) und (r) aus dem Plasmid pFA6-*His3MX6*-pGAL1 (Dr. P. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wird zur homologen Rekombination in den Stamm CEN.PK2 eingesetzt, auf SCD-HIS Agarplatten selektioniert und anschließend mit Hilfe der Kolonie-PCR analysiert (2.1.9).

Neben dem Galaktose induzierbaren Promotor, soll ebenso ein Hefestamm generiert werden, welcher *MDL1* einschließlich eines C-terminalen His₇-Tags exprimiert. Der Tag-Bereich, einschließlich einer KanMX-Selektionskassette, wird mithilfe der Primer pHis₇(f) und (r) aus dem Plasmid pYM9 (Dr. P. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main) amplifiziert (2.1.7) und zwecks homologer Rekombination in den Hefestamm CEN.PK2 transformiert (2.1.15). Transformanten werden auf SCD+KanMX Agarplatten selektioniert und anschließend mit Hilfe der Kolonie-PCR analysiert (2.1.9).

Erhaltenen *GAL1::MDL1* Kolonien werden auf SCD-HIS-Platten selektioniert. Neben dem *GAL1*-Promotor wird eine Histidin-Selektionskassette amplifiziert, mit Hilfe derer eine erfolgreiche homologe Rekombination nachgewiesen werden kann. *MDL1::His₇* Kolonien beinhalten neben dem His₇-Tag eine KanMX Kassette und können damit auf SCD+KanMX-Platten selektioniert werden. Die erfolgreiche Integration des

entsprechenden Nukleotidfragments wird durch Kolonie-PCR überprüft (2.1.9). Anschließend werden ausgewählte Klone zur Sporulation angezogen (2.2.2.6) und zur Tetradendisektion verwendet (2.2.2.7). Die beiden haploide Kolonien, die in Abwesenheit von Histidin, bzw. in Anwesenheit von KanMX, aus einer Tetrade hervorgehen (generierte Hefestämme *GAL1::MDL1* und *MDL1::His₇*), werden durch quantitative Immundetektion auf ihre MDL1-Expressionsrate überprüft (2.2.3.11).

| Primer | Sequenz | Bemerkung ^a |
|-----------------------|---|---|
| pPDR5.1(f) | <u>TT AAT TAA</u> GCC GCC ACC ATG GTT GTA AG | <i>PacI</i> |
| pPDR5.2(f) | GAC CCT TTT AAG TTT TCG TAT CCG CTC GTT CGA AAG ACT TGC CGC CAC CAT GGT TGT AAG | für homologe Rekombination |
| pPDR5.3(f) | TCT TCT ACG CCG TGG TAC GA | für cPCR |
| pPDR5.1(r) | <u>GG CGC GCC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG G | <i>AscI</i> |
| pPDR5.2(r) | TCT TGG TAA GTT TCT TTT CTT AAC CAA ATT CAA AAT TCT AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC | für homologe Rekombination |
| pPDR5.3(r) | TTA CAC CTT CCA CAC CGC TA | für cPCR |
| pPDR5.4(r) | GAT AAC GGA AGG TAC AGC CA | für cPCR |
| pGAL1(f) | CTT TGG ACC TTT ACA AAG ACG TAT CAT TCT TAC AAT CAT <u>TAG ACA TTT TGA GAT CCG GG</u> | N-term. <i>GAL1</i> - Promotor |
| pGAL1(r) | GAA TCA CAA ATG CTT TGT ATA TAT GTT ACG TAT TCA GTA <u>TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG</u> | C-term. <i>GAL1</i> - Promotor |
| pGAL1::MDL1(f) | GAA ACG CAG ATG TGC CTC G | für cPCR, <i>GAL1</i> Region |
| pGAL1::MDL1.1 (f) | GGA TGT ATG GGC TAA ATG TAC G | für cPCR, N-term von <i>GAL1</i> -Promotor |
| pGAL1::MDL1(r) | AAG GAG GGC AAG ACC AAT | für cPCR, <i>MDL1</i> Region |
| pHis ₇ (f) | GGG AGT AGA TTT GGA CAA TAG TGT TGC CCG GGA AGT <u>AGC GGC GCA CCA TCA CCA TCA CCA TCA C</u> | N-term. <i>His₇-Tag</i> |
| pHis ₇ (r) | TGT TTG TGT AAA TTA CAT TGG GCA TCA TTT AAA TTA TAG <u>AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG</u> | C-term. <i>His₇-Tag</i> |
| pMDL1::His(f) | GGT TGG TGC TAG AGG CGC GC | für cPCR, <i>MDL1</i> |
| pMDL1::His(r) | GGA TGT ATG GGC TAA ATG TAC G | für cPCR, C-term von <i>His₇-Tag</i> |

Tabelle 12 Primer zur homologen Rekombination in *S. cerevisiae*

(f) forward Primer; (r) reverse Primer; (cPCR) Kolonie-PCR; ^aRestriktionsschnittstelle durch Primer eingeführt

2.1.19. DNA-Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden von der Firma *Scientific Research and Development GmbH* nach der Kettenabbruch-Methode mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide sequenziert (Sanger *et al.*, 1977).

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Verwendete *E. coli* Stämme

Es wurde mit folgenden *E. coli* Stämmen gearbeitet:

| | |
|--------------|---|
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3), Novagen [®] |
| C41(DE3) | Stamm wurde aus BL21(DE3) [F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)] erhalten, einschließlich mind. einer uncharakterisierten Mutationen, (Miroux und Walker, 1996) |
| C43(DE3) | Stamm wurde aus BL21(DE3) [F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)] erhalten, einschließlich mind. einer uncharakterisierten Mutationen, (Miroux und Walker, 1996) |
| DH5 α | F ⁻ 80 <i>lacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i> , invitrogen [™] |
| SF100 | Stammcharakteristika: <i>ompT, degP⁺</i> , (Baneyx und Georgiou, 1990) |
| TOP10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> , invitrogen [™] |

2.2.2. Kultivierung von *E. coli*

Zur Expression von MDL1 in *E. coli* werden die entsprechenden Stämme mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Transformanten werden in einer Vorkultur (LB-Medium, 0,5% (m/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (m/v) Natriumchlorid, 1,0% (m/v) Trypton/Bactopepton-Gemisch) (Bertani, 1951) in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums (Ampicillin 10 μ g/mL, Kanamycin 30 μ g/mL) über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Vorkultur wird anschließend 1:50 (v/v) mit LB-Medium in Anwesenheit von Antibiotikum verdünnt und die erhaltene Hauptkultur bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM. Nach weiteren 3 h Inkubation bei 30°C und 180 rpm werden die Zellen geerntet (4.000 x g, 15 min, 4°C), das Sediment in flüssigen Stickstoff schockgefroren und die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.3. Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Es wurde mit folgenden *S. cerevisiae* Stämmen gearbeitet:

| | |
|---------|--|
| BY4743 | MATa/MAT α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; met15 Δ 0/MET15; LYS2/lys2 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0, EUROSCARF (Brachmann <i>et al.</i> , 1998) |
| CEN.PK2 | MATa/MAT α ; ura3-52/ura3-52; trp1-289/trp1-289; leu2-3,112/leu2-3,112; his3 Δ 1/his3 Δ 1, EUROSCARF (van Dijken <i>et al.</i> , 2000) |
| W303 | MATa; ade2; can1-10; his3-11,1; leu2-3,11; trp1-; ura3-1, (Chloupková <i>et al.</i> , 2003) |
| DKY223 | MATa; ade2; can1-10; his3-11,1; leu2-3,11; trp1-; ura3-1, YMR301C::HIS3/ATM1, (Chloupková <i>et al.</i> , 2003) |
| TOP10F' | [lacIq Tn10 (TetR)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i> , invitrogen TM |
| W303-1A | MATa; ura3-52; leu2-3, 122; his3-11; trp1-1; ade2-1; can1-100, (Thomas und Rothstein, 1989) |
| YALF-A1 | MATa; ura3-52; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1; pdr1-3, (Wolfger <i>et al.</i> , 1997) |
| Y24137 | BY4743; Mat a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YLR188w::kanMX4/YLR188w, EUROSCARF (Brachmann <i>et al.</i> , 1998) |

2.2.4. Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae werden in Komplexmedium (YEPD, Hefeextrakt-Pepton-Glukose-Medium, 1% (m/v) Hefe-Extrakt, 2% (m/v) Trypton/Bactopepton, 0,004% (m/v) Adenin, 2% (m/v) Glukose) bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

Transformierte Zellen werden hingegen in SC-Medium (0,67% (m/v) Hefe-Stickstoff-Basen ohne Aminosäuren, 1-fach Aminosäuremix (0,082 mM Adenin, 0,220 mM L-Arginin, 0,247 mM L-Histidin, 0,439 mM L-Isoleucin, 0,220 mM L-Leucin, 0,257 mM L-Methionin, 0,291 mM L-Phenylalanin, 0,484 mM L-Threonin, 0,188 mM L-Tryptophan, 0,079 mM L-Tyrosin, 0,342 mM L-Uracil, 0,492 mM L-Valin (alle Aminosäuren Carl Roth[®]); zur Selektion wird die entsprechende Substanz dem Aminosäuremix nicht zugegeben) und 2% (m/v) Glukose (Sherman, 1991)) angezogen. Die Zellen werden auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,4 in SC-Medium mit

2% (m/v) Galaktose verdünnt und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen werden nach 8 bis 12 h durch Zentrifugation geerntet und direkt für die Präparation von Mitochondrien (2.2.11) oder Gesamtmembranen (2.2.10) eingesetzt.

Transformierte Zellen, bei denen sich das plasmidständige MDL1 unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors befindet, werden während der kompletten Kulturphase in SC-Medium ohne die entsprechenden Aminosäuren, aber in Anwesenheit von 3% Ethanol, 2% Glukose oder 3% Glycerin inkubiert. Ebenso wird Lactat-Medium (0,3% (m/v) Hefe-Extrakt, 2,8 mM Glukose, 4,5 mM CaCl₂, 8,6 mM NaCl, 6,3 mM MgCl₂, 7,3 mM KH₂PO₄ (Carl Roth®), 18,7 mM NH₄Cl, 2% (v/v) Milchsäure (Carl Roth®), 0,2 M NaOH, pH 5,5) und YEP-Medium inkl. 3% Glycerin verwendet, wobei in diesen Fällen auf eine Selektion durch Abwesenheit entsprechender Aminosäuren verzichtet werden muss.

2.2.5. Konservierung von Bakterien und Hefen

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämmen werden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wird Glycerin einer Endkonzentration von circa 20% (v/v) der entsprechenden stationären *E. coli* Übernacht-Kulturen zugegeben und die Kultur unter sterilen Bedingungen aliquotiert. Die Gefrierkulturen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

S. cerevisiae Stämme werden für zwei Tage in dem entsprechenden Flüssigmedium kultiviert und entsprechend der Gefrierkulturherstellung für *E. coli* Zellen konserviert.

2.2.6. Sporulation diploider Hefestämme

Zur Sporulation diploider Hefestämme werden diese zunächst auf YEPD- oder den entsprechenden Selektivplatten angezogen (2.2.4). Anschließend werden sie auf eine nährstoffarme Sporulationsplatte (Kaliumacetat-Platten, 1% (m/v) Kaliumacetat, 2% (m/v) Agar-Agar) überimpft, um sie zum Durchlauf der Meiose und zur Sporulation anzuregen. Die Sporulationsplatte werde 3 bis 6 Tage bei 30°C inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop (Leitz) charakteristische Vierergruppen von Sporen, so genannte Tetraden, sichtbar sind. Alle vier Sporen einer Tetrade sind Abkömmlinge derselben diploiden Zelle.

2.2.7. Tetradendisektion

Um die vier Sporen einer Tetrade aufzutrennen, wird zunächst etwas Zellmaterial unter sterilen Bedingungen von der Sporulationsplatte in 50 µL Zymolyase (1 mg/mL,

J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main) resuspendiert. Während der 5-minütigen Inkubation bei RT werden die Zellwände teilweise lysiert. Dies ermöglicht die Trennung der vier durch eine gemeinsame Zellwand umschlossenen Sporen einer Tetrade. Die Reaktion wird durch Zugabe von 800 μL H_2O beendet.

Circa 50 μL der Suspension werden auf den Rand einer YEPD-Platte (2.2.4) ausgestrichen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Eigenbau) werden die vier Sporen einer Tetrade getrennt voneinander an definierten Positionen der Agarplatte abgelegt. Die Platte wird für zwei Tage bei 30°C inkubiert und die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgehen, weiter analysiert.

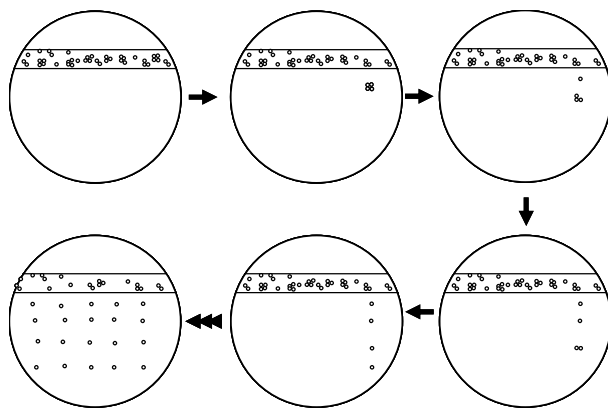


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Tetradisektion

Vorbehandeltes Zellmaterial, gemeinsame Zellwand einer Tetrade durch Zymolyase angedaut, wird in einem Streifen auf eine YEPD Platte aufgetragen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators werden die vier Sporen einer Tetrade voneinander getrennt und an definierter Position der Agarplatte abgelegt. Anschließend wird mit einer weiteren Tetrade in gleicher Weise verfahren. Die Platte werde für zwei Tage bei 30°C inkubiert und die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, weiter analysiert.

2.2.8. Immunogold-Markierung von *S. cerevisiae*

Immunogold-Markierungsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. W. Haase, MPI für Biophysik, Frankfurt/Main durchgeführt.

Hierzu werden Hefen mit 4% Paraformaldehyd (Carl Roth®) in 0,1 M Natrium-Cacodylsäure-Puffer (Carl Roth®) (pH 7,2) in Anwesenheit von 0,8 M D-Sorbitol, 1 mM MgCl_2 und 1 mM CaCl_2 mit oder ohne 1% Glutardialdehyd (Carl Roth®) für 3 h fixiert. Anschließend wird das Fixationsreagenz stufenweise (Inkubation 3 x 10 min) durch Cacodylsäure-Puffer mit fallenden Sorbitol-Konzentration (0,5 M, 0,25 M, 0 M) ersetzt. Die Zellen werden mit 1% Natrium-Metaperjodat (Carl Roth®), gefolgt von H_2O , behandelt und über Nacht in 0,05 M NH_4Cl inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift mit H_2O werden die Zellen in Agar-Agar eingeschlossen, der dann in schmale Streifen geschnitten wird. Die Agar-Streifen werden in stufenweise steigenden Ethanol-Konzentrationen dehydriert. Die Proben

werden schrittweise mit *LR White Resin* (London Resin Company Ltd., England) inkubiert und bei 55°C für 30 h polymerisiert. Anschließend wird der Block in dünne Schnitte zerteilt und diese auf ein *Formvar[®] Resin* beschichteten Nickel-Grid aufgebracht. Zur Immunogold-Markierungsreaktion werden die *Grids* mit den Schnitten nach unten auf Flüssigkeitstropfen-Tropfen in folgender Reihenfolge aufgebracht: gesättigte Natrium-Metaperjodat, H₂O, 2% Glycerin in PBS, PBS, 1% BSA in PBS, 0,1% Tween-20, PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween-20. Die Schnitte wurden mit dem MDL1-spezifischen Antikörper inkubiert (2.4.1) und nach Entfernung des ungebundenen Antikörpers mit einem zweiten *goat- α -rabbit* Antikörper gekoppelt an Goldpartikel (\varnothing 10 nm) inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten werden die Schnitte kurz mit 1% Glutardialdehyd in PBS inkubiert, anschließend in H₂O gewaschen und vor Auswertung unter dem Elektronenmikroskop (EM 208S, FEI) mit Uranylacetat (Merck) und Bleicitrat (Serva) behandelt.

2.2.9. 5-Fluoroorotsäure *shuffling* Methode

Mit Hilfe der 5-Fluoroorotsäure *shuffling* Methode (5-FOA, *fluoro orotic acid*) (Boeke *et al.*, 1987) kann ein essentielles, plasmidständiges Gen entfernt und durch ein zweites plasmidständiges Gen komplementiert werden, oder gegen eine mutierte Genvariante ausgetauscht werden. Hierzu wird die chromosomale Kopie des essentiellen Gens deletiert und die Überlebensfähigkeit des Hefestammes durch Anwesenheit des autonom replizierenden Plasmids gewährleistet. Dieses trägt sowohl eine intakte Kopie des essentiellen Gens als auch den *URA3* Selektionsmarker. Dieser so genannte *shuffle* Stamm wird mit einem zweiten autonom replizierenden Plasmid transformiert, das ein komplementierendes Gen oder eine mutierte Genvariante und einen zweiten Selektionsmarker trägt. Durch negative Selektion mittels 5-FOA wird das *URA3* tragende Plasmid verdrängt, indem der zweifach transformierte Hefestamm auf Selektionsmedium mit 1 g/L 5-FOA (Fermentas) überstempelt wird. Kolonien, die nach der 5-FOA Selektion Uracil bedürftig sind und gleichzeitig in Abwesenheit des zweiten Selektionsmarker überlebensfähig, enthalten nur noch Plasmide, die das zur Komplementation fähige Gen, bzw. die mutierte Genkopie. Das Prinzip der negativen Selektion basiert auf der Toxizität von 5-Fluoroorotsäure für Uracil prototrophen Stämme. *URA3* kodiert für Orotidin-5-Monophosphat Decarboxylase, die in der Uracil Biosynthese benötigt wird, aber unter Anwesenheit von 5-FOA, dieses in das Zellgift 5-Fluorouracil umwandelt.

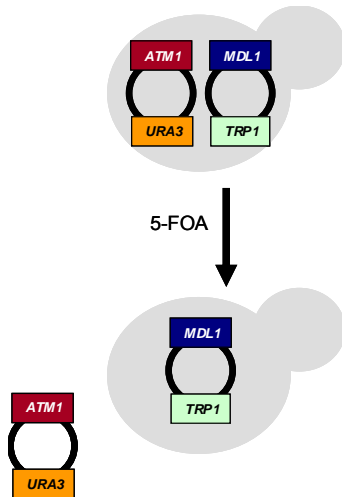


Abbildung 12 Schematische Darstellung der *in vivo* Komplementation

$\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Zellen, die plasmidständige Kopien von MDL1 (*TRP1*-Selektionskassette) und ATM1 (*URA3*-Selektionskassette) enthalten, zeigen ein normales Wachstumsverhalten. Nach Gendeletion mittels 5-FOA sind die Zellen weiterhin lebensfähig. In diesem Fall kann MDL1 teilweise die Funktion von ATM1 übernehmen und den Phänotyp von $\Delta atm1$ Zellen komplementieren.

In dem vorliegenden Fall werden circa 200 DKY230 Hefen (Chloupková *et al.*, 2003) pro SCD-Platten ohne L-Uracil und L-Tryptophan kultiviert und zur Replikation auf 5-FOA-Platten ohne die Aminosäure L-Tryptophan verwendet. Resistente Kolonien werden nach 5 - 7 Tagen nach Inkubation bei 30°C erhalten. Für die 5-FOA *in vivo* Komplementation werden unterschiedliche *MDL1*-Mutanten benutzt.

Der Ansatz für 5-FOA-Agarplatten (2% (m/v) Agar, 20% (v/v) Aminosäuremix für *S. cerevisiae*, 0,54% (m/v) Hefe-Stickstoff-Basen ohne Aminosäuren) wird 15 min autoklaviert. Anschließend wird sofort die benötigte Menge separat autoklavierter Glukose (Endkonzentration 2% (m/v)) zugegeben und die Lösung mindestens 30 min bei 50 – 55°C im Wasserbad inkubiert. 5-FOA wird in einer Endkonzentration von 1 g/L zugegeben. Ist 5-FOA während einer weiteren Inkubationsphase bei 50 – 55°C, 2 – 3 Stunden, vollständig in Lösung gegangen, werden die Platten gegossen.

2.2.10. Membranpräparation

Für die Membranpräparation (50 – 250 mL Kultur, weniger als 1 g Nassgewicht Zellen) können sowohl frische Hefen, als auch bei –80°C gelagerte Zellen benutzt werden. Eingefrorene Hefen werden in kaltem Wasser und auf Eis vollständig aufgetaut. Die Zellen werden zu 60% (m/v) in gekühltem Aufschluss-Puffer (5 mM 6-Aminocaprinsäure, 5 mM EDTA, 50 mM KPi, 1 mM PMSF, 250 mM Saccharose, pH 7,3) resuspendiert. 1 mL der Zellsuspension wird in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 750 µL Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt auf einem *Vortexer* mit entsprechender Vorrichtung für Eppendorf-Reaktionsgefäße für 10 – 20 min bei maximaler Geschwindigkeit im Kühlraum. Der

Aufschluss wird in 10-minütigen Intervallen unter dem Mikroskop (Leitz) kontrolliert und bei 90%iger Effizienz gestoppt. Der Überstand wird abgetrennt und die Glasperlen zweimal mit jeweils 1 mL Aufschluss-Puffer gewaschen. Der Überstand des Zellaufschlusses, wie auch das erhaltene Material aus den beiden Waschschritten, wird kombiniert und bei 5.000 x g für 45 min (4°C) zentrifugiert. Hierdurch können unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer entfernt werden und die Membranen werden bei maximaler Geschwindigkeit (90 min, 4°C) sedimentiert. Die resuspendierten und aliquotierten Membranen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Membranpräparation aus 2 L Hefekultur (5 -50 g Nassgewicht Zellen) werden die Zellen in gekühltem Aufschluss-Puffer resuspendiert (60% (m/v)) und in 10 – 20 mL Fraktionen je 50 mL Falcon-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Zu jedem Ansatz werden 5 – 15 mL Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt für 10 - 20 min bei maximaler Geschwindigkeit mit einem selbstgebauten Rührer, der die Zellsuspension mitsamt den Glasperlen effizient durchmischt. Die Glasperlen werden nach Zellaufschluss mit 10 – 20 mL Aufschluss-Puffer gewaschen. Es folgt der 5.000 x g (45 min, 4°C) Zentrifugationsschritt und die Ernte der Membranen bei 150.000 x g für 90 min, 4°C.

2.2.11. Mitochondrien- und Mikrosomenpräparation

Die Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wird mit leichten Änderungen wie beschrieben durchgeführt (Meisinger *et al.*, 2000). Hierzu werden Hefen durch Zentrifugation (2.500 x g, 15 min, 4°C) geerntet und in Milli-Q-H₂O gewaschen. 1 g Nassgewicht Zellen wird in 2 mL DTT-Puffer (10 mM DTT, 100 mM TRIS-SO₄ pH 9,5) resuspendiert und für 20 min bei 30°C und 90 U/min inkubiert. Durch die Vorinkubation in Anwesenheit von DTT werden Disulfidbrücken aufgebrochen und der anschließende Lyticaseverdau erleichtert. Nach Zentrifugation (2.500 x g, 8 min, 4°C) wird das Sediment zur Abtrennung von DTT in 1,2 M D-Sorbitol gewaschen und in 7 mL Lyticase-Puffer (20 mM KPi pH 7,4, 1,2 M D-Sorbitol) pro g Ausgangsnassgewicht Hefe aufgenommen. Zur Herstellung der Spheroplasten werden diese mit 4 mg Lyticase pro g Ausgangsnassgewicht Hefe für 45 min bei 30°C und 90 U/min inkubiert. Die Spheroplasten-Bildung wird durch eine zeitabhängige OD₆₀₀-Abnahme in einer 1:100 Verdünnung beobachtet. Die Spheroplasten werden durch Zentrifugation (1.500 x g, 10 min, 4°C) geerntet und

vorsichtig in Lyticase-Puffer in Abwesenheit von Lyticase gewaschen. Anschließend werden sie in 7 mL Homogenisierungspuffer (0,2% BSA, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM TRIS-HCl pH 7,4, 600 mM D-Sorbitol) /g Ausgangsnassgewicht aufgenommen und mit einem dicht abschließenden *Douncer* (20 Schübe) bei 4°C homogenisiert. Während der Zentrifugation (1.100 x g, 10 min, 4°C) werden nichtlysierte Spheroplasten und Zelltrümmer entfernt und nach einem weiteren Reinigungsschritt (2.000 x g, 10 min, 4°C), die Mitochondrien durch Zentrifugation (17.300 x g, 15 min, 4°C) angereichert. Die Mitochondrien werden vorsichtig in 5 mL SEM-Puffer (1 mM EDTA, 20 mM MOPS pH 7,2, 250 mM Saccharose) in Anwesenheit von 1 mM PMSF gewaschen und mit SEM-Puffer eine Gesamtproteinkonzentration von circa 10 mg/mL eingestellt. Anschließend werden die Mitochondrien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

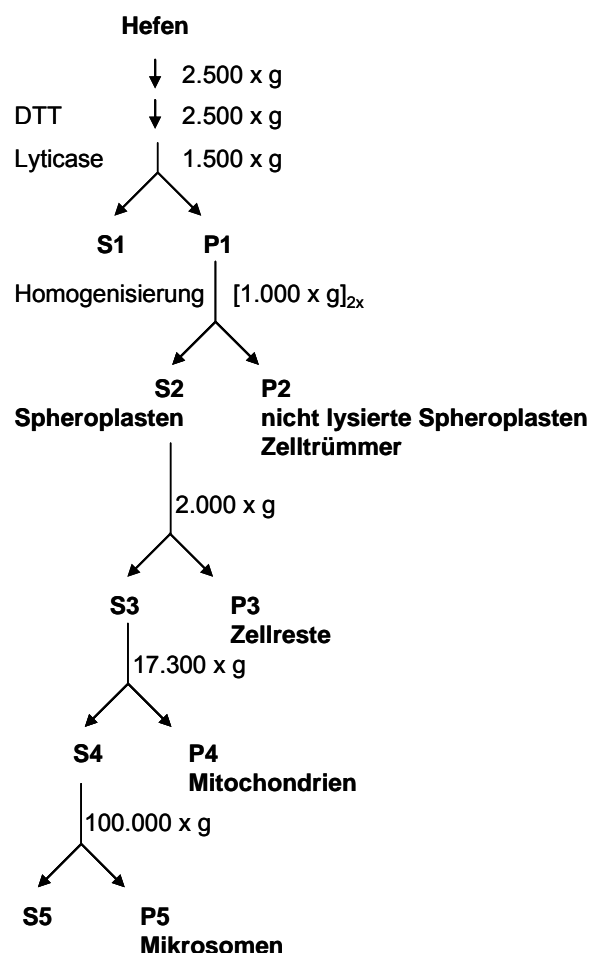


Abbildung 13 Schematische Darstellung der Mitochondrienpräparation

Die Mitochondrienpräparation erfolgt wie beschrieben (Meisinger *et al.*, 2000). Die Zellernte erfolgt bei 2.500 x g. Nach Inkubationsschritten in DTT-Puffer (10 mM DTT, 100 mM TRIS-SO₄ pH 9,5) und in Anwesenheit von Lyticase wird mit den Zellen nach Zentrifugationen bei 2.500 x g und 1.500 x g weitergearbeitet. Nach Homogenisierung und Zentrifugation bei 1.000 x g befinden sich die Spheroplasten im Überstand. Nichtlysierte Spheroplasten und Zelltrümmer liegen im Sediment vor. Weitere Zellreste werden durch Zentrifugation bei 2.000 x g entfernt. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 17.300 x g werden Mitochondrien im Sediment angereichert. Mikrosomen befinden sich im Überstand und können bei 100.000 x g sedimentiert werden.

Dieses Protokoll erlaubt keine Herstellung einer reinen Mitochondrienfraktion. Es sind noch weitere Organellen, besonders Membranen des Endoplasmatischen Reticulums enthalten. Um die Mitochondrien von Mikrosomen zu reinigen, wird ein 4-Stufen

Zuckergradient (3,75 mL 60%, 10 mL 32%, 3,75 mL 23%, 3,75 mL 15% Saccharose (m/v) jeweils in 20 mM HEPES (*N*-(2-Hydroxyethylpiperazin)-*N'*-2-ethanolsulfat) pH 7,2) verwendet. Nach Zentrifugation in einem Ausschwing-Rotor (53.000 x g, O/N, 4°C) befinden sich die Mitochondrien an der 60%/32% Grenzfläche. Sie werden 1:10 in 20 mM HEPES pH 7,2 verdünnt, erneut zentrifugiert (53.000 x g, 30 min, 4°C) und anschließend in SEM-Puffer aufgenommen.

Die Mikrosomen-Anreicherung erfolgt unter Verwendung der Mitochondrienpräparation ohne den zusätzlichen Zuckergradienten. Hierbei werden die Membranen aus dem Überstand der 17.300 x g Zentrifugation (Mitochondrien im Sediment enthalten) durch Ultrazentrifugation (100.000 x g, 45 min, 4°C) geerntet.

2.2.12. Mitoplastenpräparation

Die Mitoplastenpräparation durch osmotisches Quellen wird wie beschrieben durchgeführt (Fritz *et al.*, 2001). Hierzu werden Mitochondrien mithilfe von EM-Puffer (1 mM EDTA, 20 mM MOPS pH 7,2) auf eine Konzentration von 1 mg/mL eingestellt. Die Suspension wird 10-mal vorsichtig auf Eis hoch- und runter pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Mitoplasten durch Zentrifugation (100.000 x g, 1 h, 4°C) geerntet und in 20 mM HEPES pH 7,4 resuspendiert. Die Mitoplasten können durch einen stufenweisen Zuckergradient (15%, 30%, 45% und 60% Saccharose in 20 mM HEPES pH 7,4) von den äußeren Membran abgetrennt werden (Zentrifugation 135.000 x g, 16 h, 4°C). Bei circa 15% Saccharose innerhalb des Gradienten befinden sich die äußeren Membranen, wohingegen Mitoplasten bei einer Saccharosekonzentration von 35 bis 45% geerntet werden. Die abgenommenen Fraktionen werden vereinigt, 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,4 verdünnt und erneut zentrifugiert (135.000 x g, 30 min, 4°C). Die Mitoplasten werden in 20 mM HEPES pH 7,4 aufgenommen und deren Gesamtproteinkonzentration durch BCA-Test (PIERCE) bestimmt (2.3.12).

2.2.13. Präparation von invertierten inneren mitochondrialen Vesikeln

Invertierte innere mitochondriale Vesikel werden durch die Verwendung von Ultraschall hergestellt (Ii und Mihara, 2001; Jascur, 1991). Mitochondrien werden mit Hilfe von 20 mM HEPES pH 7,4 und 1 mM PMSF auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/mL eingestellt. Anschließend werden sie 10 min auf Eis inkubiert und dann durch Ultraschall (*output control* 5-6, Intervall

15 sec, Gesamtzeit 10 min, Glasgefäß) auf Eis umgestülpt. Nicht zerstörte Mitochondrien werden durch Zentrifugation (30.000 x g, 20 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand erneut zentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4°C). Im erhaltenen Sediment befinden sich die invertierten mitochondrialen Vesikel, die in 10 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl oder in SEM-Puffer resuspendiert werden. Die Gesamtproteinkonzentration der Vesikel wird durch einen BCA-Test bestimmt (2.3.12).

Um eine Anreicherung invertierter innerer mitochondrialer Vesikel zu erhalten, können diese über einen linearen Zuckergradient (0,85 M – 1,6 M Saccharose in 10 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl) gereinigt werden (Zentrifugation 100.000 x g, 16 h, 4°C). In der unteren Hälfte des Gradienten befinden sich Membranvesikel der äußeren Mitochondrienmembran, wohingegen Vesikel der inneren mitochondrialen Membran bei Saccharose-Konzentrationen bis maximal 1,2 M zu finden sind. Die aufgefangenen Fraktionen werden 1:10 mit 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂ verdünnt und erneut zentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4°C). Die Sedimente werden in 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂ resuspendiert und einer Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration durch den BCA-Test unterzogen (2.3.12).

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Reinigung von MDL1 aus Mitochondrien

Präparierte Mitochondrien (5 g/L) aus *S. cerevisiae* werden in Puffer A (20 mM TRIS-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 15% (v/v) Glycerin, EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Endkonzentration nach Herstellerangabe), 1% (m/v) Digitonin) für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln solubilisiert. Solubilisiertes Material wird nach Ultrazentrifugation (100.000 x g, 30 min, 4°C) auf eine, mit Ni²⁺ beladene und in Puffer B (20 mM TRIS-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 15% (v/v) Glycerin, 2 mM Imidazol, 0,1% Digitonin) äquilibrierte 1 mL Ni²⁺-Hi-Trap Chelating IDA column (GE Healthcare) (Iminodiessigsäure, iminodiacetic acid) aufgetragen. Nach Waschschritten mit Puffer B in Anwesenheit von 80 mM und 160 mM Imidazol werden spezifisch gebundene Proteine mit 400 mM Imidazol in Puffer B eluiert. Proteinfractionen von 0,5 mL werden aufgefangen und für weitere Experimente auf Eis gelagert.

Das gereinigte MDL1 wird mittels Immundetektion nachgewiesen (2.3.11). Ebenso

wird das trypsinverdauten Protein mit Hilfe von MALDI-TOF (MALDI matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) *peptide mass fingerprint (PMF)* analysiert, wobei Mascot (Datenbank NCBI Nr 20040521) als Referenz benutzt wird.

Für die N-terminale Aminosäuresequenzierung (Edman Degradation) wird das Protein auf ein 10% SDS-PAGE aufgetragen (2.3.11.1) und auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Carl Roth®) transferiert (2.3.11.3). Die Membran wird mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, luftdicht eingeschweißt und extern sequenziert (*Biotechnology Laboratory University of British Columbia, Kanada*).

2.3.2. Reinigung von MDL1 aus Membranen

Zur Aufreinigung von MDL1 aus Membranen werden komplette *S. cerevisiae* Membranen (10 g/L, siehe 2.2.10) verwendet. Es wird wie in 2.3.1 beschrieben vorgegangen.

2.3.3. Gelfiltration von MDL1

Um den Oligomerisierungszustand von in unterschiedlichen Organellen exprimiertem MDL1 zu untersuchen, wird das jeweilige gereinigte Protein zusätzlich durch Gelfiltration mit einer Superdex™ 200 PC 3.2 (GE Healthcare) analysiert. Die Säule wird in SEC-Puffer (20 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% (m/v) Digitonin) äquilibriert und anschließend mit 60 µg Protein (Flussrate 50 µL/min) beladen. 30 µL Fraktionen werden gesammelt und durch SDS-PAGE und Immundetektion mit dem MDL1-spezifischen Antikörper ausgewertet (2.3.11). Ferritin (443 kDa), β-Amylase (200 kDa) und BSA (Rinderserumalbumin, 70 kDa) in SEC-Puffer ohne Detergenzzugabe werden zur Kalibration der Gelfiltrationssäule verwendet.

2.3.4. Limitierter Trypsin- und Faktor Xa Verdau

Um die Membranorientierung von MDL1 in isolierten Organellen zu analysieren, werden 15 µg der entsprechenden Organellen in Anwesenheit von steigenden Trypsin-Konzentrationen (0 – 0,1 g/L, SIGMA-ALDRICH) inkubiert (15 min, Eis). Die Proteolyse wird durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA, Endkonzentration 7,5% (v/v), Carl Roth®) gestoppt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wird das Sediment mit eiskaltem Aceton gewaschen und in Ladepuffer resuspendiert (van der Does *et al.*, 1996).

Die Membranorientierung kann auch durch einen Faktor Xa Verdau nachgewiesen

werden. Hierzu werden Mitoplasten (2.2.12) oder invertierte innere mitochondriale Vesikel (30 µg, siehe 2.2.13) mit 0,01 g/L Faktor Xa (*New England BioLabs Inc.*) in Puffer X (20 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8,0) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Ladepuffer und Inkubation für 10 min bei 65°C gestoppt.

Die Zugänglichkeiten für Trypsin und Faktor Xa wird durch Immundetektion mit dem α MDL1 und dem α His-Antikörper nachgewiesen (2.3.11).

2.3.5. *Tris*NTA(ATTO565) Bindung an His-Tag

Invertierte innere Membranvesikel (16 µM, siehe 2.2.13) in Puffer I (20 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0), bzw. Puffer IA (20 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 200 mM L-Histidin, pH 8,0), werden in Anwesenheit von *tris*NTA(ATTO565) (500 nM) 15 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Der Ansatz wird im dreifachen Volumen Puffer I zweimal gewaschen (20.000 x g, 10 min, 4°C) und das resultierende Sediment im zweifachen Volumen Puffer II (20 mM TRIS-HCl, 1% SDS, pH 8,0) aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT unter Lichtausschluss werden 250 µL Probe in Fluoreszenz-Mikrotiterplatten transferiert und vermessen (Anregung 485 nm, Emission 520 nm). Zur Negativkontrolle werden invertierte innere Membranvesikel des Δ *mdl1* Hefestammes Y24137 verwendet (2.2.3). Eine *tris*NTA(ATTO565) Standardkurve (0 bis 10 mM) wird in Puffer II aufgenommen.

2.3.6. ATPase Aktivitätsmessung

Die ATP-Hydrolyse von gereinigtem MDL1 wird wie beschrieben durchgeführt (Gorbulev *et al.*, 2001). Hierzu werden 1 µM gereinigtes MDL1 (2.3.1, 2.3.2) mit 20 mM DTT versetzt. Die Hydrolysereaktion wird durch Zugabe von ATP enthaltendem Puffer (20 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0,1% (m/v) Digitonin, 10 mM ATP versetzt (370.000:1) mit [γ -³²P]ATP (spezifische Aktivität 110 TBq/mmol), pH 8,0), in einem 1:1 Verhältnis zur Proteinmischung, bei 30°C gestartet. Nach 10 min Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 1 mL 10 mM Ammoniummolybdat (Merck) in 1 M HCl (Reagenz A) gestoppt. Anschließend werden 15 µL 20 mM H₃PO₄ (Carl Roth[®]) und 2 mL einer Isobutanol (Carl Roth[®])/Cyclohexan (Carl Roth[®])/Aceton/Reagenz A (5:5:1:0,1) Mischung zugegeben und 30 sec gründlich gemischt. Nach erfolgter Phasentrennung auf Eis werden zu 1 mL der organischen Phase Szintillationsflüssigkeit (*Microsint scintillation liquid*, Carl

Roth®) zugegeben. Die Freisetzung von anorganischem Phosphat wird durch β -counting (Beckman LS 6500 *Liquid Scintillation Counter*) vermessen. $K_{M,ATP}$ Werte werden durch Verwendung der Michaelis-Menten Gleichung ermittelt.

Die Verwendung von Vanadat führt zur Bildung eines Phosphorsäure-Molybdat-Vanadat-Komplexes. Durch die Anwesenheit von Vanadat wird die Löslichkeit des Phosphat-Molybdat-Komplexes innerhalb der organischen Phase verringert. Eine quantitative Aussage über die MDL1-spezifische ATPase Aktivität in Anwesenheit von Vanadat kann mit Hilfe der Aktivkohle-Adsorptions-Methode (Tomblin und Fishel, 2002) getroffen werden. Hierzu werden 0,5 μ M gereinigtes MDL1 (2.3.1, 2.3.2) mit steigenden ortho-Vanadat-Konzentrationen (0 – 3 mM, SIGMA-ALDRICH) inkubiert. Durch Zugabe von ATP-Puffer wird die Reaktion gestartet und für 15 min bei 30°C inkubiert. Um die Hydrolyse zu beenden werden 750 μ L eiskalte 10%ige Aktivkohle-Lösung (Carl Roth®), versetzt mit 10 mM EDTA, zugegeben. Um eine maximale Bindung von freiem ATP an Aktivkohle zu unterstützen, werden die Reaktionen für mindestens 3 h auf Eis inkubiert. Der Überstand nach anschließender Zentrifugation (20.000 x g, 15 min) wird durch β -counting in Anwesenheit von 2 mL Szintillationsflüssigkeit (*Microsint scintillation liquid*, Carl Roth®) ermittelt. Die erhaltenen Daten werden mit Hilfe einer konzentrationsabhängigen Gleichung ausgewertet und die halbmaximale inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) berechnet.

$$Aktivität [\%] = \frac{100\%}{\left(1 + \frac{Ortho - Vanadat [\mu M]}{IC_{50} [\mu M]}\right)}$$

Gleichung 1 Berechnung der halbmaximale inhibitorischen Konzentration (IC_{50})

2.3.7. Peptidjodierung mit $Na^{125}I$

Zur Identifizierung von MDL1-spezifisch transportierten Peptiden werden sowohl synthetische Peptidbibliotheken, als auch definierte Peptide verwendet. Peptidbibliotheken und Peptide wurden mithilfe von Festphasenchemie unter Benutzung von Fmoc (N-(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl-Aminosäuren) hergestellt (Uebel *et al.*, 1995). Zur Jodierung der Tyrosinreste wird die Chloramin T-Methode (Hunter und Greenwood, 1964) leicht verändert angewandt. Es werden 8,7 μ L der jeweiligen Peptidlösung (500 μ M) in 41,3 μ L PBS pH 7,0 (0,8 mM Na_2HPO_4 (Carl Roth®), 0,1 mM KH_2PO_4 (Carl Roth®), 13,7 mM NaCl, 0,3 mM KCl) mit 10 μ L

Chloramin T (1 mg/mL, Riedel-de Haen) und 10 μL Na^{125}I (100 μCi , HARTMANN ANALYTIC GmbH) für 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 120 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,17 mg/mL, Carl Roth[®]) gestoppt. Freies Jod wird mit Hilfe einer Anionenaustauscher-Chromatographie aus Dowex 1x8 Material abgetrennt. Dazu werden 10 mg getrocknetes Dowex 1x8 Material (SIGMA-ALDRICH) in 1 mL PBS (pH 7,0 sublementiert mit 0,2% BSA und 0,1% NaN_3) äquilibriert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen (500 x g, 30 sec, RT). 220 μL der Dowex-Suspension werden zu dem Jodierungsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe eines Zentrifugensäulchens (Biorad) wird das jodierte Peptid (2,3 μM) durch Zentrifugation (500 x g, 30 sec, RT) (Ii und Mihara, 2001) vom Säulenmaterial getrennt und für maximal sieben Tage bei 4°C gelagert.

2.3.8. Peptidtransport

Peptidtransport (Chen *et al.*, 2003b) wird mit folgenden Modifikationen analysiert. Invertierte innere Mitochondrienmembranen (2.2.13) oder Mikrosomen (2.2.11) (75 μg Gesamtprotein) werden mit 3 mM ATP oder 5 U Apyrase (SIGMA-ALDRICH) in 50 μL AP-Puffer (PBS, 0,1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , pH 7,0) für 1 min bei 30°C vorinkubiert. Der Transport wird durch Zugabe von 1 μM ^{125}J -markierten Peptiden oder Peptidbibliotheken (2.3.7), bzw. 36 μM Aminolävulinat (*ARC American radiolabeled chemicals, Inc.*), gestartet. Nach 6 min Inkubation bei 30°C wird durch Zugabe von 500 μL eiskaltem AP-Puffer in Anwesenheit von 10 mM EDTA die Transportreaktion gestoppt. Nach Zentrifugation und zwei Waschschritten (135.000 x g, 30 min, 4°C) wird die Radioaktivität in den Membranen mittels γ -counting (Cobra II, Packard) quantifiziert. Die gewaschenen Aminolävulinat Ansätze werden in 2 mL Szintillationsflüssigkeit (*Microsint scintillation liquid, Carl Roth[®]*) überführt und die Radioaktivität mittels β -counting (Beckman LS6500 *Liquid Scintillation Counter*) quantifiziert.

Um die 30-minütigen Waschschriffe zu verkürzen, wird der Peptidtransport mit Hilfe eines vakuumbetriebenen Vielfach-Filtrationsgerätes (Millipore) durchgeführt. Die Ansätze werden nach erfolgter Transportreaktion über einen Celluloseacetatfilter (Schleicher & Schuell, OE65 0,15 μm) filtriert und die zurückgehaltenen Membranen jeweils zweimal mit 1,5 mL eiskaltem Stopppuffer gewaschen. Die zurückbleibende Radioaktivität innerhalb der Filter wird mittels γ -counting (Cobra II, Packard) quantifiziert.

| Peptid | NH ₂ -Sequenz-COOH | |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| NSTEL | RRYNASTEL | (Uebel <i>et al.</i> , 1995) |
| R9LQK | RRYQKSTEL (9-mer) | (Uebel <i>et al.</i> , 1997b) |
| H-X ₅ -OH | Peptidbibliothek (5-mer) | |
| H-X ₆ -OH | Peptidbibliothek (6-mer) | |
| H-X ₇ -OH | Peptidbibliothek (7-mer) | |
| H-X ₈ -OH | Peptidbibliothek (8-mer) | |
| H-X ₁₁ -OH | Peptidbibliothek (11-mer) | |
| H-X ₁₇ -OH | Peptidbibliothek (17-mer) | |
| H-X ₂₃ -OH | Peptidbibliothek (23-mer) | (Uebel <i>et al.</i> , 1997b) |
| f-MVQRWLY | Tam-6 (7-mer) | |
| f-MVQRWLYST | Tam-7 (9-mer) | |
| f-MVQRWLYSTNAK | Tam-8 (12-mer) | |
| Aminolävulinat | ARC American radiolabeled chemicals, Inc. | |

Tabelle 13

Peptide für Transportstudien

2.3.9. Bestimmung der Katalaseaktivität

W303 Zellen, transformiert mit verschiedenen Plasmiden zur MDL1-Überexpression, werden in SCD-Medium in Abwesenheit der zur Selektion benötigten Aminosäuren bis zu einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert (2.2.4). Die erhaltenen Zellsedimente werden in Katalasepuffer (200 mM TRIS, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 150 mM (NH₄)₂SO₄ (Carl Roth®), *Complete Mini Protease Inhibitor Tablets*, pH 7,0) aufgenommen und mittels Glasperlen (maximale Geschwindigkeit, 5 x 1 min, RT, zwischen den einzelnen Schritten auf Eis abkühlen) ein grober Zellextrakt hergestellt (Woontner und Jaehning, 1990). Der Zellextrakt wird mittels Zentrifugation (6.000 rpm, 3 min, 4°C) von nicht aufgeschlossenen Zellen abgetrennt. Der Zerfall von H₂O₂ kann direkt mittels zeitabhängiger Absorptionsabnahme bei 240 nm verfolgt werden (Aebi, 1984). Es werden 947 µL H₂O mit Katalasepuffer und Zellextrakt versetzt (Gesamtvolumen 997 µL). Nach Einstellung des Nullwertes erfolgt die Zugabe von 3 µL H₂O₂ (15%, Carl Roth®). Alle Messungen wurden bei 23°C durchgeführt.

2.3.10. Nukleotidbindung

Die Nukleotidbindung wird mittels 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ *photocrosslinking* durchgeführt. Gereinigtes MDL1 (0,5 μM , siehe 2.3.1, 2.3.2), bzw. IMVs (2.2.13) werden mit 8-azido $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (ICN Radiochemicals) für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend werden die Proben mittels SDS-PAGE (10%) analysiert (2.3.11.1). Die Gele werden getrocknet und auf einem Phosphorschirm (Kodak S0230) belichtet.

2.3.11. Elektrophoretische Methoden

2.3.11.1. SDS-Gelelektrophorese

Mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) erfolgt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. SDS-PAGE-Gele werden in einer *Mini-Protean 3 Casting*-Kammer (Biorad) mit einer Gelgröße von 10,1 x 8,2 mm und einer Geldicke von 0,75 mm gegossen. Die pH-Werte der Trenngel- (0,4% SDS, 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8) und Sammelgel-Puffer (0,4% SDS, 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8) unterschieden sich. Die Gele werden nach folgender Rezeptur hergestellt:

| | Sammelgel 5% | Trenngel 10% |
|--|-------------------|------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 29:1) | 650 μL | 3,10 mL |
| APS (Ammoniumperoxodisulfat, 10%) | 30 μL | 40 μL |
| Milli-Q-H ₂ O | 2,70 mL | 3,95 mL |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) | 10 μL | 20 μL |
| Sammelgel-Puffer | 1,10 mL | - |
| Trenngel-Puffer | - | 3,95 mL |

Tabelle 14 Zusammensetzung des SDS-PAGE (10%)

APS (Carl Roth®) und TEMED (SIGMA-ALDRICH) werden zum Start der radikalischen Polymerisation zuletzt hinzu gegeben. Das Trenngel wird zügig in die vorbereitete Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und das polymerisierte Trenngel mit 5%igem Sammelgel überschichtet. Je nach Anzahl der zu analysierenden Proben

werden Kämme mit 10 bzw. 15 Taschen eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit 5-fach SDS-Probenpuffer (1,8 M β -Mercaptoethanol (Carl Roth[®]), 25% (m/v) Bromphenolblau (Merck), 20% (v/v) Glycerin, 7,5% (m/v) SDS, 250 mM TRIS-HCl pH 8) versetzt und 10 min bei 65°C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 100 V pro Mini-Gel für 1 – 1,5 h in 1-fach Elektrophorese-Puffer (190 mM Glycerin, 0,1% (m/v) SDS, 25 mM TRIS-HCl pH 8,3). Als Standard wird ein entsprechender Protein-Marker (*Prestained Protein Molecular Weight Marker* oder *Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas) verwendet.

2.3.11.2. Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Nach elektrophoretischer Trennung werden die aufgetrennten Proteinbanden in SDS-PAGE-Minigele mit Essigsäure fixiert und anschließend durch circa 15-minütige Inkubation in Coomassie-Färbelösung (0,25% (m/v) Coomassie R brilliant Blau, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) angefärbt. Überschüssige Färbelösung wird durch Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) entfernt, bis der gewünschte Kontrast eintritt.

Mit Hilfe der Silberfärbung werden kleinste Mengen im SDS-PAGE aufgetrennter Proteine sichtbar gemacht. Hierzu wird ein aufgetrenntes Gel für mindestens 1 h fixiert (10% Essigsäure, 40% Ethanol), anschließend 2 x 10 min mit Milli-Q-H₂O gewaschen und für 1 min in 0,02%iger Natrium-Thiosulfat Pentahydrat Lösung (Carl Roth[®]) inkubiert. Die Färbung erfolgt nach weiteren H₂O-Waschschritten (2 x 1 min) mit 0,1%iger Silbernitratlösung (Carl Roth[®]) für 20 min. Überschüssige Silbernitratlösung wird mit H₂O (2 x 1 min) gewaschen und das SDS-Gel entwickelt (2% Natriumcarbonat (Merck), 0,04% Formaldehyd (Carl Roth[®])). Die andauernde Färbung kann mit 5%iger Essigsäure beendet werden.

2.3.11.3. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden nach der *Semidry*-Methode (Kyhse-Andersen, 1984; Towbin *et al.*, 1979) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wird das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (8,5 x 7,5 cm, Schleicher & Schüll) gelegt, die zwischen zwei Whatmanpapieren gleicher Größe in eine *Semidry-Blot*-Apparatur (Biorad) eingelegt wird. Gel, Nitrozellulose-Membran und Whatmanpapiere werden mit Transferpuffer (190 mM Glycerin, 20% Methanol, 0,03% SDS, 25 mM TRIS, pH 8,3) durchtränkt. Der Transfer der Proteine erfolgt für

1 h bei 100 mA pro Gel zwischen den beiden Graphit-Elektroden. Um die Transfereffizienz zu bestimmen, wird die Membran nach abgeschlossenem Transfer für 1 min in Ponceau S-Färbelösung (3% Eisessig, 0,5% Ponceau Red S (SIGMA-ALDRICH)) inkubiert und die Hintergrundfärbung anschließend mit Milli-Q-H₂O entfernt. Eine vollständige Entfärbung der Membran wird durch TBS-Puffer (250 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 7,5) erreicht.

2.3.11.4. Strippen von Western Blot-Membranen

Diese Methode ermöglicht Nitrozellulosemembran-gebundenen Antikörper zu entfernen und damit eine spezifische Detektion mit einem weiteren Antikörper zu ermöglichen. Hierzu wird die Nitrozellulosemembran 5 min in TBS-T (250 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,2% Tween-20) und anschließend 15 min bei RT in *Stripping*-Puffer (250 mM Glycin pH 2,5) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wird die Membran geblockt und eine weitere Western Blot-Analyse kann erfolgen (2.4.2).

2.3.11.5. Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gesamtmembranen (15 mg/mL) werden für 1 h (Überkopfrad, 4°C) in Digitonin BN-Puffer (20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 1% (m/v) Digitonin) solubilisiert. Nichtsolubilisiertes Material wird durch Zentrifugation (100.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand mit 10-fach Ladepuffer (100 mM BIS-TRIS pH 7,0, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 5% (m/v) *Coomassie brilliant blue G-250*) versetzt. Als Markerproteine werden Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und Albumin (66 kDa) eingesetzt.

Zur Blau Nativ PAGE (BNE, BN-PAGE) wird ein Gradientengel von 16,5% bis 6% Acrylamid benutzt (Schägger, 2001; Schägger und von Jagow, 1991).

| | Sammelgel | Trenngel 16,5% | Trenngel 6% |
|---------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| Gel-Puffer (3-fach) | 2,5 mL | 3 mL | 3 mL |
| Acrylamid (49,5% T, 3% C) | 0,6 mL | 3,05 mL | 1,07 mL |
| Glyzerin | - | 1,8 mL | - |
| APS (10% (m/v)) | 30 μ L | 30 μ L | 38 μ L |
| TEMED | 3 μ L | 3 μ L | 3,8 μ L |
| H ₂ O | ad 7,5 mL | ad 9 mL | ad 9 mL |

Tabelle 15 Gelzusammensetzung des Blau Nativ PAGE

% T Gesamtkonzentration Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomere, % C prozentuales Verhältnis *crosslinker* zu Gesamtmonomer

Kathodenpuffer (15 mM BIS-TRIS pH 7,0, 50 mM Trizin (Carl Roth®), 0,02% (m/v) *Coomassie brilliant blue G-250*), der später mit farblosem Kathodenpuffer ersetzt wird, und Anodenpuffer (50 mM BIS-TRIS pH 7,0) werden für die Elektrophorese verwendet. Das Einlaufen der Proben in das Trenngel erfolgt bei 100 V und die anschließende Auftrennung der Proteine bei 500 V. Beide Schritte werden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Der Austausch des Kathodenpuffers erfolgt nachdem die Lauffront zu zwei Drittel das Gel passiert hatte. Kurz bevor die Lauffront in den Anodenpuffer einläuft, wird das Blau Nativ Gel zwei Stunden bei 100 mA auf einen Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll) geblottet und zur Immundetektion mit dem MDL1-spezifischen Antikörper eingesetzt (2.4.2). Die verwendeten Markerproteine werden durch Coomassie-Färbung der Nitrozellulosemembran und Entfärbung mithilfe von 50% (v/v) Methanol sichtbar gemacht. Eine komplette Entfärbung der Membran wird durch den Einsatz von 100% Methanol erreicht.

2.3.12. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen von Mitochondrien- (2.2.11) und Membranpräparationen (2.2.10) wird mit dem BCA-Test (Smith *et al.*, 1985) (Bicinchoninsäure-Test, *BCA Protein Assay Kit*, PIERCE) nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem kalorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure/Cu²⁺ Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu²⁺-Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht. Als Referenzprotein wird BSA im Konzentrationsbereich von 0 - 50 μ g/mL eingesetzt.

Die Proteinkonzentration von gereinigtem MDL1 (2.3.1, 2.3.2) wird mittels Bradford-

Test (Bradford, 1976) (*CoomassiePlusTM Bradford Assay Kit*, PIERCE), Durchführung nach Angabe des Herstellers, ermittelt. Die Bradford-Proteinbestimmung beruht auf der Bindung von Coomassie-Brilliantblau an das Protein. Es kommt zu der Stabilisierung der nichtionischen Form, die kalorimetrisch nachweisbar ist. BSA wird als Referenzprotein im Konzentrationsbereich von 0 - 250 µg/mL eingesetzt.

2.3.13. Eisenquantifizierung

Die Quantifizierung von komplexiertem Eisen (mit Ausnahme von Häm) erfolgt wie beschrieben (Fish, 1988).

500 µL frisch hergestelltes Reagenz A (0,6 N HCl, 2,25% (m/v) KMnO₄ (Carl Roth[®])) wird mit 1 mL der zu untersuchenden Probe für zwei Stunden bei 60°C inkubiert. Anschließend werden 100 µL Reagenz B (6,5 mM Ferrozin (SIGMA-ALDRICH), 13,1 mM Neocuproin (SIGMA-ALDRICH), 2 M L(+)-Ascorbinsäure (Carl Roth[®]), 5 M Ammoniumacetat (Carl Roth[®])) zugegeben und nach Mischen für mindestens 30 min bei RT stehen gelassen. Die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm wird mit Hilfe der Standardkurve (0,5 - 6 µg Eisen (Merck) in 0,01 N HCl) in µg Eisen umgerechnet.

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Antikörper

Die Detektion von MDL1 erfolgt mit dem spezifisch generierten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen, der an die letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus (KGGVIDLDNSVAREV) bindet. In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgeführt. Die polyklonalen Seren werden zur Immundetektion eingesetzt.

| Name | Typ | Erkennungssequenz/ Bemerkung | 1: |
|-----------------------|-----------|---|-------|
| R7/10(α MDL1) | Kaninchen | KGGVIDLDNAVAREV ³ Research Genetic Inc., Huntsville | 500 |
| α TIM23 | Kaninchen | Prof. Pfanner, Freiburg | 1.000 |
| α Porin | Kaninchen | Prof. Langer, Köln | 1.000 |
| α His | Maus | Novagen [®] | 2.000 |

Tabelle 16 Eingesetzte Verdünnungen der Primär-Antikörper

| Name | Typ | Beschreibung | 1: |
|---|-----------|--|--------|
| <i>Goat-α-mouse</i> -HRP | Maus | IgG (<i>Fc specific</i>), SIGMA-ALDRICH | 18.000 |
| <i>Goat-α-rabbit</i> -HRP | Kaninchen | IgG (<i>whole molecule</i>), SIGMA-ALDRICH | 20.000 |

Tabelle 17 Eingesetzte Verdünnungen der Sekundär-Antikörper

2.4.2. Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrozellulose-Membranen

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (7% Magermilchpulver (Carl Roth[®]), 250 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,2% Tween-20) inkubiert. Anschließend folgt die Antiserumanlagerung (Verdünnung siehe Tabelle 16) für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) der Membran in TBS-T (250 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,2% Tween-20) folgt eine weitere einstündige Inkubation bei RT mit einem IgG-Konjugat gegen Maus oder Kaninchen. Die Membran wird erneut gewaschen (3x5 min, TBS-T) und für 1 min in ECL I-Lösung (*enhanced chemiluminescent*, 0,4 mM p-Coumarinsäure (*trans-4-Hydroxycinnamic acid*, SIGMA-ALDRICH), 2,5 mM Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione-3-aminophthalhydrazide, Carl Roth[®]), 100 mM TRIS pH 8) inkubiert. Die ECL II-Lösung (0,02% H₂O₂, Carl Roth[®]), 100 mM TRIS pH 8) wird zugegeben und die unter enzymatischer Umsetzung des Substrates auftretende

³ Die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren von *MDL1*

Chemilumineszenz mit Hilfe des Lumi Imagers F1™ (Roche) detektiert und digitalisiert.

2.5. Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller |
|---|------------------------|
| Adenin | SIGMA-ALDRICH |
| Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 30 % (Rotiphorese Gel 30) | Carl Roth® |
| Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) | SIGMA-ALDRICH |
| [γ - ³² P]-Adenosin-5'-Triphosphat (spezifische Aktivität 110 TBq/mmol) | HARTMANN ANALYTIC GmbH |
| Agar-Agar | Carl Roth® |
| Agarose | SIGMA-ALDRICH |
| Ampicillin, Na-Salz | Carl Roth® |
| ϵ -Amino-n-Capron Säure | Carl Roth® |
| Ammoniumchlorid | Merck |
| Aceton | Carl Roth® |
| BIS-TRIS | Carl Roth® |
| Chloroform | Merck |
| <i>complete protease inhibitor cocktail</i> (EDTA frei) | Roche |
| <i>Coomassie brilliant blue G-250</i> | SIGMA-ALDRICH |
| Digitonin | CALBIOCHEM® |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Fermentas |
| DNA-Auftragspuffer | Fermentas |
| DNA-Polymerase, <i>taq</i> und <i>pfu</i> | Fermentas |
| Essigsäure 99 % | Riedel-de Haen |
| Ethanol, abs. | Riedel-de Haen |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth® |
| α -D-(+)-Galaktose | Carl Roth® |
| α -D-(+)-Glukose Monohydrat | Carl Roth® |
| Glyzerin | Carl Roth® |
| Hefe-Extrakt | Carl Roth® |

| Chemikalien | Hersteller |
|---|--------------------------|
| Hefe-Stickstoff-Basen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | DIFCO |
| L-Histidin | Carl Roth [®] |
| <i>N</i> -(2-Hydroxyethylpiperazin)- <i>N'</i> -2-ethanolsulfat (HEPES) | SIGMA-ALDRICH |
| Imidazol | Fluka |
| Isoamylalkohol | Carl Roth [®] |
| Isopropanol | Carl Roth [®] |
| Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) | Fermentas |
| Kaliumacetat | Carl Roth [®] |
| Kaliumchlorid | Carl Roth [®] |
| Kaliumphosphat | Carl Roth [®] |
| Kalziumchlorid | Merck |
| Kanamycin | SIGMA-ALDRICH |
| Lyticase | SIGMA-ALDRICH |
| Magnesiumchlorid | Riedel-de Haen |
| Methanol | Riedel-de Haen |
| 3-(<i>N</i> -Morpholino)propylsulfonsäure (MOPS) | Carl Roth [®] |
| Natriumacetat | Carl Roth [®] |
| Natriumchlorid | Carl Roth [®] |
| Natrium dodecyl sulfat (SDS) | Carl Roth [®] |
| Nickelsulfat | Fluka |
| dNTPs | Fermentas |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Carl Roth [®] |
| Rinderserumalbumin (BSA) | SIGMA-ALDRICH |
| RNase A | Fermentas |
| Saccharose | Südzucker, SIGMA-ALDRICH |
| Salzsäure | Carl Roth [®] |
| D-Sorbitol | Carl Roth [®] |
| TRIS | Carl Roth [®] |
| Trypton/Bactopepton-Gemisch | Carl Roth [®] |
| Tween-20 | Carl Roth [®] |

Tabelle 18

Chemikalien

2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Geräte und Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------|
| Aekta Explorer | GE Healthcare |
| Beckman Ti 45, Ti 60, Ti 80, SW 28 | BECKMAN COULTER |
| Beckman TLA-55, TLA-100 | BECKMAN COULTER |
| Cary 50 Bio UV Vis Spectrophotometer | VARIAN |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße | greiner bio-one |
| Filter, steril | Millipore |
| Filterpapier | Whatman® |
| Infors | Unitron Infors |
| Ino Lab pH-Meter | WTW |
| Konzentratoren (Amicon) | Millipore |
| Küvetten, Plastik | Fisher Scientific |
| Küvetten, Quarzglas | Hellma |
| Megafuge Sepatech 1.0 R BS4402/A | Heraeus |
| Mettler PM 460 Waage | Mettler |
| Mikroliter Spritze | Hamilton |
| Mikrowelle T.D.S. | Samsung |
| Milli-Q-Plus Wasser System | Millipore |
| <i>Multiwellplatten</i> | greiner bio-one |
| PCR Gefäße | Sarstedt |
| Pipettenspitzen | greiner bio-one |
| Pipetten | Abimed |
| Polarstar Galaxy (ELISA reader) | BMG |
| Reaktionsgefäße, steril, 15 und 50 mL | greiner bio-one |
| SDS-PAGE System | BioRad |
| SMART <i>Chromtography System</i> | GE Healthcare |
| Sorvall RC 5B Plus GSA, GS3, SS34 | Sorvall |
| Spannungsgeber Elite 300 plus | Polymehr systems |
| Spritzen, Plastik, versch. Volumina | Braun |
| Thermomixer | Eppendorf |

Geräte und Verbrauchsmaterialien**Hersteller**

Vortexer

Bender & Hobein AG

Zentrifuge 5417R F-45-30-11

Eppendorf

Tabelle 19**Geräte und Verbrauchsmaterialien**

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des ABC-Transporters MDL1

In dem Organismus *S. cerevisiae* wird der mitochondriale ABC-Transporter MDL1 nur in geringen Mengen homolog exprimiert (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) und seine Expressionsrate wird durch äußere Einflüsse und Stressbedingungen nicht beeinflusst. Durch *microarray* Analysen wird gezeigt, dass eine Zelle circa 1.000 Moleküle MDL1 enthält, wogegen für ATP1 (YBL099W), die F₁F₀ ATPase alpha Untereinheit, circa 41.500 Moleküle/Zelle nachgewiesen werden (www.yeastgfp.uscf.edu). Der Expressionsvergleich von intrinsischem MDL1 und gereinigter MDL1-NBD als Referenz (Janas *et al.*, 2003) zeigt, dass MDL1 circa 0,1% aller mitochondrialen Proteine ausmacht. Da es sich hier um eine geringe MDL1-Expressionsrate handelt, mit der eine biochemische Charakterisierung des gereinigten Proteins nahezu ausgeschlossen ist, sollte ein System zur Überexpression von MDL1 etabliert werden.

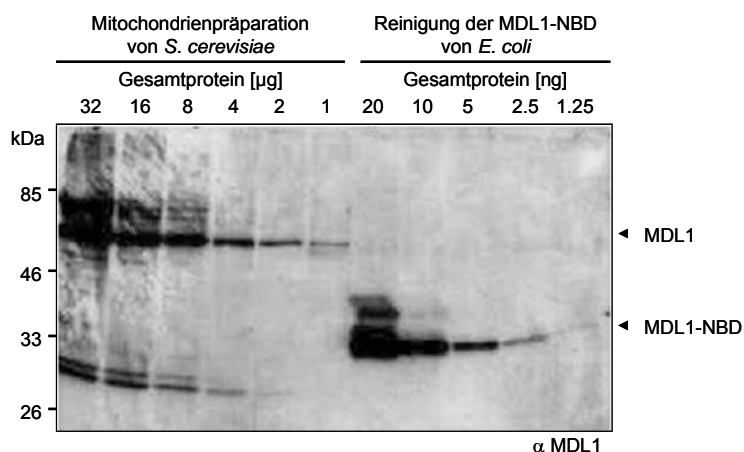


Abbildung 14 MDL1-Konz. in Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Mitochondrien der Bäckerhefe wurden isoliert und entsprechende Gesamtproteinkonzentrationen mit der gereinigten Nukleotidbinde-domäne von MDL1 aus *E. coli* verglichen. Hierzu wurde die quantitative Immundetektion mit dem spezifischen α MDL1-Antikörper benutzt.

Um die Klonierung des *MDL1*-Gens zu erleichtern, wird das Gen systematisch in drei Kassetten unterteilt. Diese werden durch eine neu eingefügte *Clal* und eine vorhandene *Bam*HI Restriktionsschnittstelle voneinander getrennt. Aufgrund dieser Klonierungsstrategie können spätere Kassettenaustausche zur Generierung verschiedener Konstrukte erleichtert werden.

3.2. Expression von MDL1 in heterologen Organismen

Die Nukleotidbindedomäne von MDL1 wurde im heterologen Organismus *E. coli* überexprimiert und anschließend charakterisiert (Janas *et al.*, 2003). Ebenso sollte

auch MDL1 ohne eine angenommene mitochondriale Leitsequenz in dem gram-negativen Organismus *E. coli* überexprimiert werden. Das Expressionslevel wurde durch Variation verschiedener Parameter analysiert: Plasmide mit geringer und hoher Kopienzahl, induzierbare Promotoren (T7, lac⁴, trc⁵, ara⁶), unterschiedlicher Wachstumstemperatur (18°C, 25°C, 30°C, 37°C, 42°C), Induktionsbedingungen (Induktor, -konzentration, Induktionszeitpunkt, -dauer) und *E. coli* Stämme (TOP10, BL21, C41, C43, DH5 α , SF100). Die Expressionslevel wurden durch quantitative Immundetektion nachgewiesen. Um die Expression zu erhöhen wurde ebenso der Einfluss von Chaperonen, die Koexpression seltener tRNAs und verschiedener Komponenten der *E. coli* Translokase (SecY, SecE, SecG und YidC) auf die Expressioneffizienz überprüft. Die Variationen der verschiedenen Expressionsparameter bewirken keine Verbesserung der MDL1-Expressionsrate. Nur 0,005% aller Membranproteine können als MDL1 identifiziert werden (Hofacker *et al.*, 2007) (Tabelle 20).

Der gram-positive Organismus *Lactococcus lactis* ist ein geeigneter Wirt für die Überexpression einiger mitochondrialer Proteine (Kunji *et al.*, 2003). Die plasmidgesteuerte MDL1-Expression mit Hilfe eines starken, induzierbaren Nisin-Promotors führt zu einer zweifach höheren Expressionsrate (0,01% aller Membranproteine) im Vergleich zu *E. coli* (Hofacker *et al.*, 2007) (Tabelle 20).

Zusammengefasst führt die heterologe MDL1-Expression in *E. coli* und *L. lactis* zu einer deutlich verringerten Expressionsrate im Vergleich zur intrinsischen MDL1-Konzentration in *S. cerevisiae*.

| | Plasmidgesteuerte Expression | | | |
|--|----------------------------------|----------------|------------------|----------------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> Wildtyp* | <i>E. coli</i> | <i>L. lactis</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| Menge an MDL1 pro Gesamtmembranproteinkonz. (m/m) | 0,1% | 0,005% | 0,01% | 1% |

Tabelle 20 MDL1-Expressionsrate innerhalb verschiedener Organismen

* mitochondriale Membranen

⁴ Laktose-Promotor

⁵ Kombination aus Laktose- und Tryptophan (trp) -Promotor

⁶ Arabinose-Promotor

Da durch die heterologe Proteinexpression in dem gram-negativen Organismus *E. coli* und in *L. lactis* keine ausreichenden Proteinausbeuten erhalten wird, wurde die homologe Überexpression in dem Organismus *S. cerevisiae* etabliert.

3.3. Expression von MDL1 im homologen Organismus

Die endogene Expression von MDL1 in *S. cerevisiae* macht circa 0,1% aller gesamt mitochondrialen Proteine aus (Tabelle 20). Mit Hilfe unterschiedlicher Ansätze sollte die Expressionsrate erhöht werden, um das Protein später aus Hefe reinigen zu können. Zuerst wird MDL1 durch homologe Rekombination mit einem C-terminalen His₇-Tag fusioniert und der Hefestamm *MDL1::His₇* generiert. Chromosomal kodiertes Histidin-getaggetes MDL1 wird in gleichem Maße wie Wildtyp-MDL1 exprimiert.

Um die Expressionseffizienz zu erhöhen, wird MDL1 zuerst plasmidgesteuert überexprimiert. Hierzu wird der intrinsische Promotor durch den expressionsstarken konstitutiven *GPD*-Promotor (2.1.18.6) ersetzt, bzw. unter die Kontrolle des starken glyzerinabhängigen *AAC2* (*ADP/ATP carrier 2*, systematischer Name PET9, YBL030C) Promotors (van der Giezen *et al.*, 2002) (2.1.18.7) gestellt. Interessanterweise wird durch beide Vorgehensweisen die MDL1-Expression, im Vergleich zu intrinsisch vorhandenem MDL1, verringert. Ähnliche Ergebnisse werden erhalten, wenn MDL1 chromosomal unter die Kontrolle des *PDR5*-Promotors gestellt wird. Dieser Promotor wird durch das PDR Netzwerkes des Hefestammes YALF-A1 beeinflusst (Wolfger *et al.*, 1997) und wird erfolgreich für eine verbesserte Expression mehrerer Membranproteinen in Hefe verwendet (Decottignies *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1992; Wada *et al.*, 2002; Wolfger *et al.*, 1997). In dem vorliegenden Fall kann nur in einzelnen Klonen des neu generierten *PDR5::MDL1* Stammes eine leicht erhöhte MDL1-Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von MDL1 durch einen starken konstitutiven Promotor nicht erhöht werden kann. Kürzlich wurde dieser Sachverhalt auch für die heterologe Expression von ATM2 aus *Arabidopsis* in *E. coli* und Hefe beobachtet (Chen *et al.*, 2007).

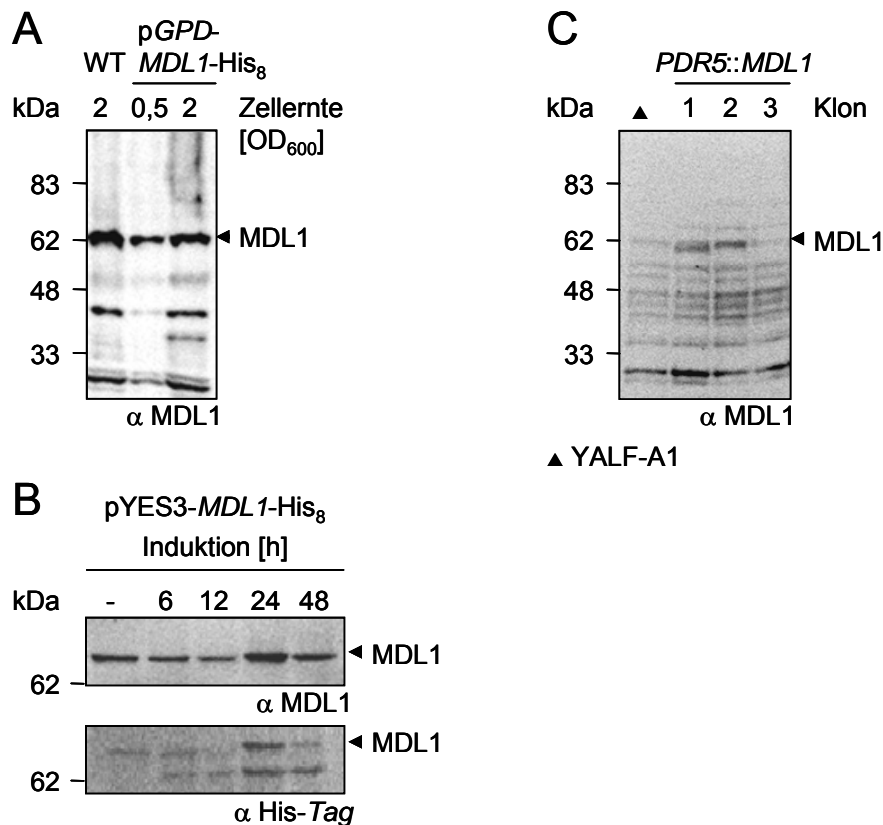


Abbildung 15 MDL1-Expression in Abhängigkeit des verwendeten Promotors

Präparierte Mitochondrien (15 µg) unterschiedlicher MDL1 exprimierender Zellen wurden mittels Immundetektion (10% SDS-PAGE) des spezifischen α MDL1-Antikörper auf ihre MDL1-Expressionsrate analysiert. **(A)** Die MDL1-Expression wird durch den konstitutiven *GPD*-Promotor kontrolliert. Präparierte Mitochondrien MDL1 exprimierender Hefen einer OD₆₀₀ von 0,5 und 2 zeigen im Vergleich zu WT-Zellen keine Überexpression. **(B)** Die Expression von plasmidständigem MDL1 (pYES3-*MDL1-His₈*) kontrolliert durch den starken glyzerinabhängigen *AAC2*-Promotor zeigt nach 24 Stunden Induktion keine deutliche Überexpression. **(C)** Bei den Klonen 1 und 2 des generierten *PDR5::MDL1* Stammes kann eine leichte Expressionserhöhung im Vergleich zum Wildtyp-YALF-A1 Stamm (▲) nachgewiesen werden. Für Klon 3 ist die Proteinkonzentration des ABC-Transporters nicht erhöht. Die MDL1-Expression kann durch die Kontrolle starker konstitutiver Promotoren nicht signifikant erhöht werden.

3.4. Überexpression von MDL1 in *S. cerevisiae*

Eine vermehrte MDL1-Expression wird nur nach Induktion mit Hilfe des Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotors erreicht. Hierzu wurden $\Delta mdl1$ Hefen (Stamm Y24137) mit dem Plasmid pYES-*MDL1-His₈* transformiert. Innerhalb dieses *multicopy* Plasmids wird die Proteinexpression durch den *GAL1*-Promotor reguliert. Durch die Verwendung von Galaktose bzw. Glukose wird die Expression an- bzw. ausgeschaltet. Dieses System erlaubt eine 10 bis 100-fache Proteinüberexpression. MDL1 macht in diesem Fall 1% aller gesamten mitochondrialen Membranen aus (Tabelle 20). Zellproben zu definierten Zeiten zeigen, dass die Galaktose induzierte MDL1-Expression zeitabhängig ist. Sie erreicht etwa acht Stunden nach Austausch

der Kohlenhydratquelle ihr Optimum (Abbildung 16B) und nimmt anschließend wieder ab. Die beobachtete Proteindegradation ist nicht auf eine verminderte Transkription der *MDL1*-RNA über den beschriebenen Induktionszeitraum zurückzuführen (Abbildung 16A).

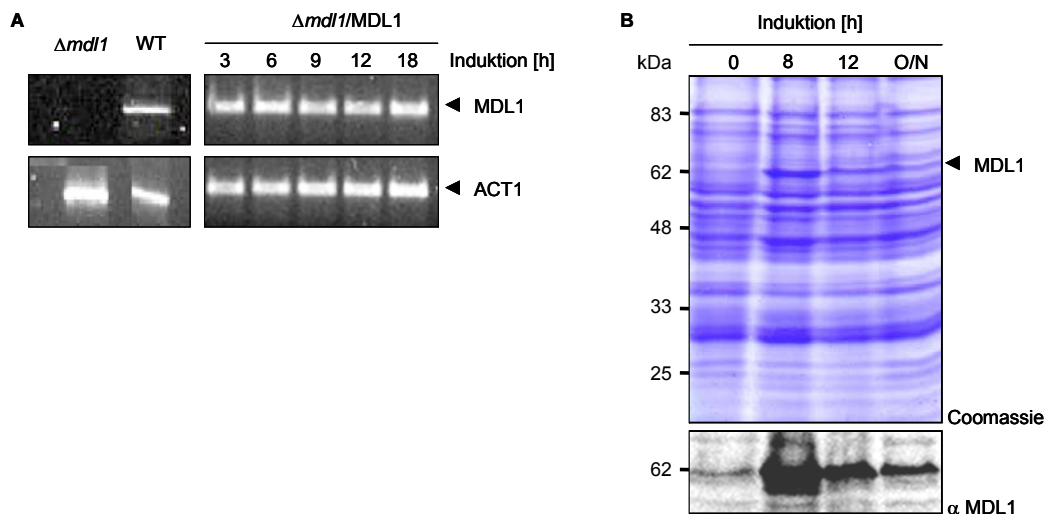


Abbildung 16 Transkription und Translation von *MDL1* in *S. cerevisiae*

Die Transkription (**A**) der *MDL1*-RNA wurde mittels zeitabhängiger RT-PCR überprüft. Über einen Zeitraum von 18 Stunden konnte keine verminderte *MDL1*-Transkriptionsrate beobachtet werden. Das Aktin Amplifikat (ACT1, YFL039C) wurde zur Kontrolle eingesetzt. Für die Transkriptionsrate nach 0 Stunden Induktion wurde die *MDL1*-RNA des Wildtyp-Hefestammes verwendet. Der Galaktose induzierbare Promotor *GAL1* führt nach 8 Stunden zu einer 100-fachen Überexpression des Proteins (**B**). Hierzu wurden Mitochondrien (15 µg) nach unterschiedlichen Galaktose-Induktionszeiten präpariert und auf ihre zeitabhängige *MDL1*-Expression mittels SDS-PAGE (10%, Coomassie-Färbung) und Immundetektion mit dem spezifischen α *MDL1*-Antikörper untersucht.

Identische Expressionsresultate werden auf chromosomaler Ebene nach Austausch des intrinsischen gegen den *GAL1*-Promotor erhalten. In diesem Fall kann der generierte Hefestamm *GAL1::MDL1* ohne Selektionsdruck in Komplexmedium kultiviert und in Anwesenheit von Galaktose induziert werden. Die Promotorregion inklusive einer N-terminalen Histidin-Selektionskassette wurde amplifiziert und zur homologen Rekombination in den Hefestamm CEN.PK2 transformiert. Nach Sporulation wurden die vier Sporen einer diploiden Zelle analysiert. Haploide Kolonien, die die eingeführte Promotorregion einschließlich der Selektionskassette beinhalten, wurden auf ihre zeitabhängige *MDL1*-Expressionsrate überprüft. Nach vierstündiger Galaktoseinduktion ist eine deutliche *MDL1*-Expression zu erkennen, die nach acht Stunden ihr Maximum erreicht, entsprechend der Induktion von plasmidständigem *MDL1*. C-terminale Abbauprodukte des Proteins, mit einem Molekulargewicht von circa 48 kDa, werden mithilfe des spezifischen α *MDL1*-

Antikörpers (2.2.4.1) nachgewiesen.

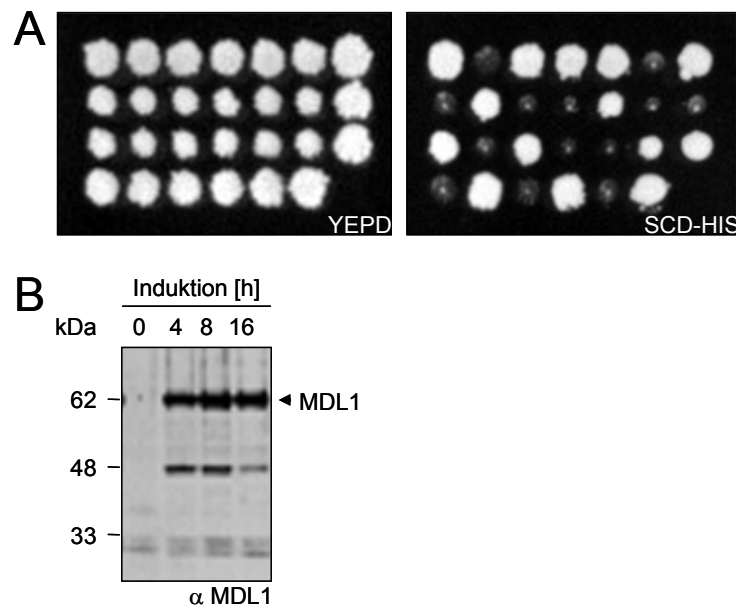


Abbildung 17 Tetradendisektion CEN.PK2 *GAL1::MDL1* und MDL1-Expression

(A) Der Hefestamm CEN.PK2 wurde mit dem PCR-Produkt der *GAL1*-Promotorregion und der Histidin-Selektionskassette transformiert. Nach Sporulation geeigneter Hefeklone wurde die Tetradendisektion durchgeführt (YEPD) und die erhaltenen Klone wurden anschließend in Abwesenheit von Histidin auf erfolgreiche homologe Rekombination analysiert. **(B)** Die zeitabhängige MDL1-Expression von *GAL1::MDL1* Mitochondrien (15 µg) wurde mittels SDS-PAGE (10%, Coomassie-Färbung) und Immundetektion mit dem spezifischen α MDL1-Antikörper untersucht. Nach vier Stunden Induktion in Anwesenheit von Galaktose ist eine deutliche MDL1-Expression zu erkennen, die nach acht Stunden ihr Maximum erreicht. Bei den Signalen eines Molekulargewichts von 48 kDa handelt es sich um C-terminale Abbauprodukte des Proteins.

Das Expressionsoptimum und die Beobachtung, dass keine Überexpression durch konstitutive Promotoren erreicht werden kann, zeigen, dass eine verstärkte MDL1-Expression nur zum Teil von den Zellen toleriert wird. Welche Mechanismen einen negativen Effekt auf die MDL1-Expression ausüben, bzw. wie es zu einer eventuell verminderten Proteininstabilität kommt, sind bis heute nicht geklärt. MDL1 kann in dem homologen Organismus *S. cerevisiae* mithilfe des induzierbaren *GAL1*-Promotors innerhalb von acht Stunden überexprimiert und steht für weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur Verfügung.

3.5. Lokalisation von MDL1

Um die MDL1-Lokalisation von überexprimiertem Protein in *S. cerevisiae* nachzuweisen, wurden Mitochondrien der $\Delta mdl1$ /MDL1 Hefen durch differentielle Zentrifugation präpariert. Immundetektionsstudien unter Benutzung des spezifischen Antikörpers zeigen, dass MDL1 selbst nach Proteinüberexpression ausschließlich in den Mitochondrien detektiert wird. Die Markerproteine TIM23 (23 kDa, Mitochondrium) und SEC61 (53 kDa, ER-Membran) zeigen, dass die mitochondriale Fraktion nur Spuren von ER-Membranen (α SEC61) enthält. Geringe Konzentrationen von MDL1 in der ER-Membranfraktion sind auf die Separationsmethode von Mitochondrien zurückzuführen.

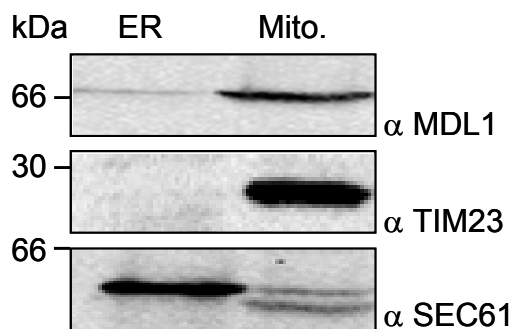


Abbildung 18 Lokalisation des MDL1-Proteins in *S. cerevisiae*

ER und mitochondriale Membranen wurden von MDL1 überexprimierenden Hefen präpariert und mittels SDS-PAGE (10%) und Immundetektion durch den MDL1-spezifischen Antikörper, das mitochondriale Markerprotein TIM23 und den ER-Marker SEC61 analysiert. MDL1 ist in den Mitochondrien lokalisiert.

Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation von MDL1 durch Gefrierbruchanalyse in Kombination mit der Immunogold-Markierung analysiert. Wie erwartet bindet der MDL1-spezifische Antikörper ausschließlich an mitochondriale Membranen und zeigt dadurch, dass nuklear kodiertes MDL1 posttranslational in Mitochondrien eingebaut wird. Ebenso wird MDL1 in Anwesenheit eines C-terminalen Tags in den Mitochondrien nachgewiesen, wodurch gezeigt wird, dass der C-Terminus kein kritischer Teil des Proteins bezüglich der Proteindirektion ist (Daten nicht gezeigt).

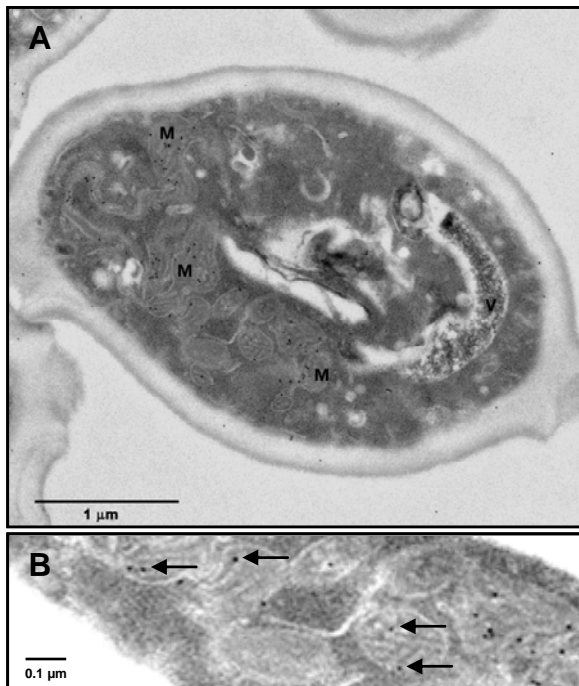


Abbildung 19 Immunogold-Markierung von MDL1 in *S. cerevisiae*

(A) Gefrierbruch in Kombination mit Immunogold-Markierung an MDL1 überexprimierenden Hefen. MDL1 ist ausschließlich in den Mitochondrien (M) lokalisiert. (B) Vergrößerung eines Bereiches der Zelle. Pfeile markieren die gebundenen Goldpartikel einiger MDL1-Transporter innerhalb der Mitochondrien.

3.6. Membranorientierung von MDL1

Die Membranorientierung von MDL1 in Mitochondrien wurde mittels Proteasezugänglichkeitsexperimenten nachgewiesen. MDL1 exprimierende Mitochondrien wurden in Anwesenheit von steigenden Trypsin-Konzentrationen inkubiert und der resultierende Abbau der NBDs wurde mittels quantitativer Immundetektion ausgewertet. Erwartungsgemäß kann für mitochondriales MDL1 keine Trypsin-Sensitivität nachgewiesen werden (Abbildung 20A). Durch die Anwesenheit der äußeren mitochondrialen Membranen wird MDL1 geschützt und kann nicht abgebaut werden. Um die Orientierung innerhalb der invertierten inneren mitochondrialen Membranvesikeln (IMV) zu beantworten, wurden Mitoplasten und invertierte innere mitochondriale Membranen auf die Zugänglichkeit ihrer Faktor Xa Schnittstelle untersucht. Diese befindet sich zwischen dem C-Terminus von MDL1 und dem sich anschließenden His₈-Tag. Nach erfolgreicher Spaltung ist der His₈-Tag durch den α His-Antikörper nicht länger nachweisbar (Abbildung 20B). An isolierten Mitochondrien und Mitoplasten kann kein Faktor Xa Verdau nachgewiesen werden, während der C-terminale His₈-Tag von IMVs für die Protease zugänglich ist (Abbildung 20C). Dies zeigte, dass die Nukleotidbindedomänen von MDL1 zur Matrix orientiert vorliegen müssen. Des Weiteren kann die umgekehrte Orientierung (NBDs zum Zytosol orientiert) von MDL1 in IMVs mithilfe von 8-azido-ATP *photo-*

crosslinking Experimenten bestätigt werden. Es kann eine Bindung von 8-azido-ATP an die, in invertierten Membranen zytosolisch orientierten, NBDs nachgewiesen werden.

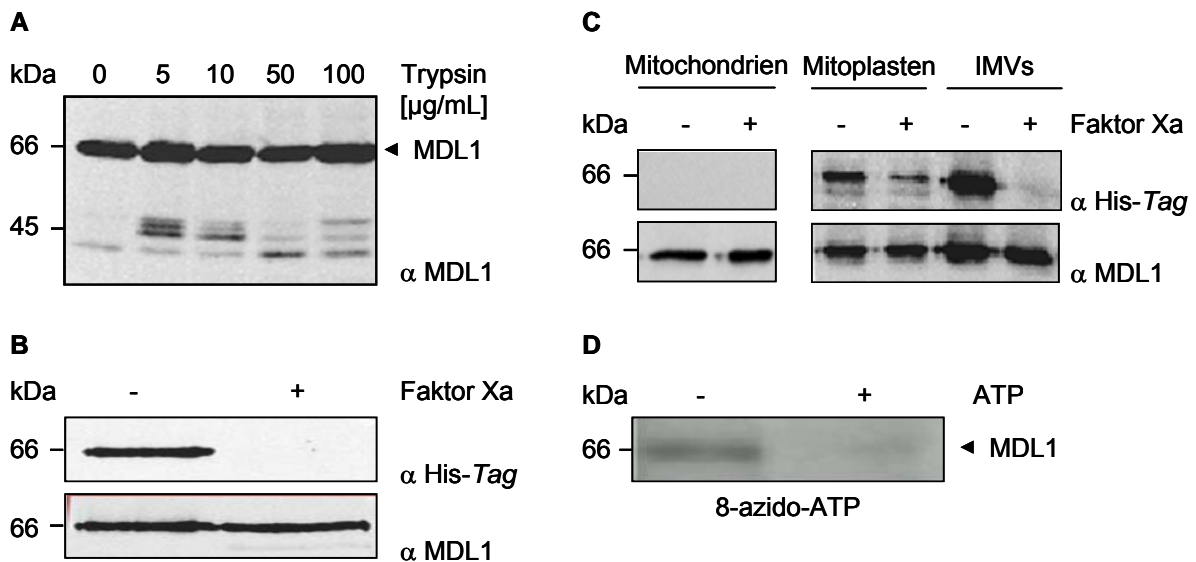


Abbildung 20 Orientierung von mitochondrialem MDL1

(A) MDL1 enthaltende Mitochondrien (30 µg Gesamtprotein) wurden mit steigenden Trypsin-Konzentrationen (0 bis 100 µg/mL) behandelt und durch SDS-PAGE (10%) gefolgt von Immundetektion analysiert. Die nicht vorhandene Trypsin-Sensitivität zeigt, dass MDL1 durch die äußere mitochondriale Membran vor Degradation geschützt wird. **(B)** Zwischen dem C-Terminus von MDL1 und dem sich anschließenden His₈-Tag befindet sich eine Faktor Xa Schnittstelle. Nach erfolgreicher Faktor Xa Spaltung (0,5 µg) ist der His₈-Tag von gereinigtem Protein durch den α His-Antikörper nicht nachweisbar. **(C)** MDL1 enthaltende Mitochondrien, Mitoplasten und IMVs (30 µg Gesamtprotein) wurden mit Faktor Xa (0,5 µg) inkubiert und durch SDS-PAGE (10%) und Immundetektion analysiert. Der Faktor Xa Verdau kann nicht an Mitochondrien und Mitoplasten erfolgen, wohingegen der C-terminale His₈-Tag von IMVs für die Protease zugänglich ist. Die MDL1-NBDs liegen zur Matrix orientiert vor und werden von den beiden mitochondrialen Membranen vor Degradationsreaktionen geschützt. **(D)** Die invertierte Orientierung von MDL1 in IMVs kann durch 8-azido-ATP *photo-crosslinking* Experimente bestätigt werden.

Die Orientierung der MDL1-Nukleotidbindedomänen wird ebenso durch Bindung von *trisNTA*(ATTO565) (Schulze *et al.*, 2006; van der Does *et al.*, 2006) an MDL1 überexprimierende invertierte Membranvesikel (pYES-MDL1-Xa-His₈) bestätigt. Die drei vorhandenen nickelbeladenen NTA-Gruppen binden spezifisch an den zytosolisch orientierten His₈-Tag der IMVs. Durch Zugabe von Histidin (60 mM) kann *trisNTA*(ATTO565) von den Vesikeln eluiert werden.

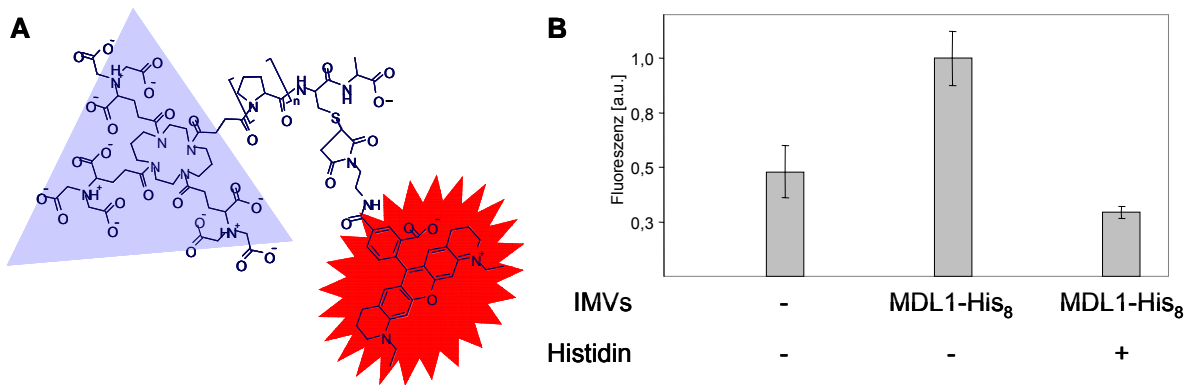


Abbildung 21 Orientierung der MDL1-NBDs

(A) Schematische Darstellung des *trisNTA(ATTO565)*-Fluorophors (Schulze *et al.*, 2006; van der Does *et al.*, 2006). Der Fluoreszenz-Tag beinhaltet drei NTA-Gruppen (blau), vier Proline ($n = 4$) als Abstandshalter und den Fluoreszenzmarker ATTO565. (B) MDL1-His₈ überexprimierende IMVs binden spezifisch *trisNTA(ATTO565)*. In Anwesenheit von 60 mM Histidin und IMVs aus Mitochondrien, die mit einem Leerplasmid transformiert wurden, ist keine Bindung zu beobachten.

3.7. Solubilisierung und Reinigung von MDL1 aus Mitochondrien

Um MDL1 aus Mitochondrien reinigen zu können, müssen die Organellen zuvor solubilisiert werden. Die höchste Solubilisierungseffizienz (44%) in Verbindung mit aktivem gereinigtem Proteine wird mit Digitonin erreicht (Hofacker *et al.*, 2007). Digitonin wird meist als Detergenz für fragile Membranproteinkomplexe verwendet (Schägger und Pfeiffer, 2000).

MDL1 kann mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden (> 95% Reinheit). Die Solubilisierung, die einzelnen Reinigungsschritte und das Eluat wurden durch SDS-PAGE (10%) mit anschließender Coomassie-Färbung und Immundetektion auf die Anwesenheit des gewünschten Proteins untersucht. Ebenso wurde die erhaltene Proteinbande in einer *Fingerprint*-Analyse mit Trypsin verdaut und mit Hilfe von MALDI-TOF *PMF* analysiert, wobei Mascot (Datenbank NCBI nr 20040521) als Referenz benutzt wurde.

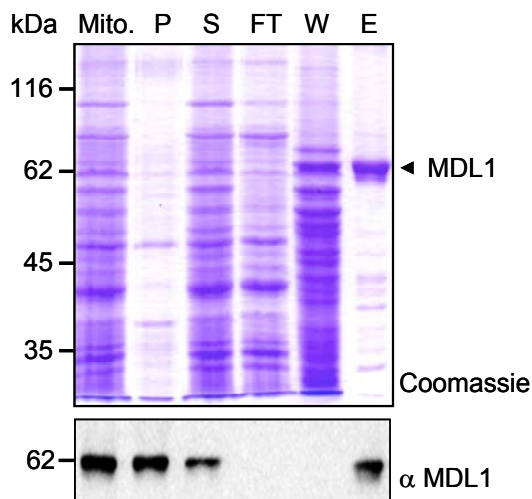


Abbildung 22
Mitochondrien

Reinigung von MDL1 aus

Zur Reinigung von MDL1, exprimiert mit einem C-terminalen His₈-Tag, wurden Mitochondrien aus *S. cerevisiae* präpariert, die das Protein überexprimieren. Mitochondrien (10 g/L) wurden in Anwesenheit von 1% (m/v) Digitonin solubilisiert. Das Protein wurde durch Metall-Affinitätschromatographie (Ni-IDA) gereinigt. Mitochondrien (Mito), Sediment (P) und Überstand des Solubilisates (S), Durchfluss (FT), Fraktionen mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (W, E) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (10%, Coomassie-Färbung) und durch Immundetektion mit dem MDL1-spezifischen Antikörper analysiert.

Wie viele andere integrale Membranproteine kann MDL1 im SDS-PAGE einer etwas geringeren apparenten molekularen Masse zugeordnet werden als aufgrund der Aminosäuresequenz vorhergesagt wird. MDL1 befindet sich im SDS-PAGE bei einer Größe von 62 kDa, wobei Berechnungen eine Masse von 71 kDa ergeben. Mit Hilfe des Detergenzes Digitonin werden aus solubilisierten Mitochondrien circa 0,1 mg MDL1 pro 6 Liter Hefekultur erhalten.

3.8. ATPase Aktivität verschiedener MDL1-Mutanten

Die spezifische ATPase Aktivität des Digitonin-solubilisierten MDL1 aus Mitochondrien zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik (Hill-Koeffizient 0,98) mit einem $K_{M,ATP}$ von $0,86 \pm 0,06$ mM, einem v_{max} von $2,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und einer Wechselzahl (k_{cat}) von $2,6 \pm 0,1 \text{ ATP sec}^{-1}$ (pro Monomer MDL1) (Hofacker *et al.*, 2007). Die ATPase Aktivität des vollständigen MDL1-Proteins liegt circa zwei Größenordnungen höher als für die gereinigte MDL1-Nukleotidbindedomäne gezeigt (Janas *et al.*, 2003). Interessanterweise wird für die gereinigte NBD eine starke Abhängigkeit zur eingesetzten Proteinkonzentration beobachtet (Janas *et al.*, 2003), wohingegen die Wechselzahl des MDL1-Komplexes über einen weiten Konzentrationsbereich (0,01 bis 1 μM) konstant ist. Innerhalb des Proteinkomplexes ist die Assoziationsrate der NBDs (Dimerbildung) nicht geschwindigkeitslimitierend für die ATP Hydrolyse. Dies wird eventuell dadurch erreicht, dass die NBDs in direkter Nachbarschaft liegen und somit eine hohe lokale Konzentration aufweisen.

Um nachzuweisen, dass die gemessenen ATPase Aktivitäten ausschließlich auf gereinigtes MDL1 zurückzuführen sind, und nicht von Verunreinigungen einer hochaktiven ATPase bewirkt werden, wurden MDL1-Mutanten analysiert. Die

Dimerisierungsreaktionen der Nukleotidbindedomänen wurden innerhalb der letzten Jahre vorwiegend mit Hilfe von zwei ATPase defiziente Mutationen untersucht. Zum einen die konservierten putativen katalytischen Base Glutamat, die sich eine Aminosäure abwärts des *Walker B*-Motivs befindet, und zum anderen durch Mutation des Histidin innerhalb der H-Schleife. Nach Mutagenese der entsprechenden Aminosäuren sind die Nukleotidbindedomänen in einem ATP-induzierten Dimerisierungszustand arretiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die ATP-Hydrolyse entweder stark eingeschränkt oder aber komplett aufgehoben. Mutagenese des Glutamats innerhalb der NBD von MDL1(E599Q) zeigt eine circa 3.000-fach verringerte ATPase Aktivität (Janas *et al.*, 2003). Mutagenese des Histidin (H211) von HisP (Shyamala *et al.*, 1991) oder MalK (H192) (Davidson und Sharma, 1997) bewirken eine ATPase Aktivität kleiner 2% und einen kompletten Zusammenbruch der Transportfunktion (Davidson und Sharma, 1997; Nikaïdo und Ames, 1999). Wurde das konservierte Histidin (H662A) der NBD des Hämolystransporters HlyB zu Alanin mutiert, konnten nur eine Hintergrund ATPase Aktivität (< 0,1%) gemessen werden (Zaitseva *et al.*, 2005b). Die verschiedenen MDL1-Mutanten wurden aus Mitochondrien, entsprechend dem Wildtyp, solubilisiert und gereinigt. MDL1-Konstrukte mit Mutationen der putativen katalytischen Base (E599Q) oder des Histidin der H-Schleife (H631A) zeigen nur eine Hintergrund ATPase-Aktivität. Hieraus wird deutlich, dass die gemessenen ATP-Hydrolyseraten MDL1-spezifisch und nicht auf eine Proteinverunreinigung zurückzuführen sind (Hofacker *et al.*, 2007). Die MDL1-Mutanten E599Q und H631A verhalten sich vergleichbar zu den entsprechenden NBD-Mutanten (Janas *et al.*, 2003). Eine spezifische ATP-Bindung, sowohl für MDL1, als auch für die beiden Mutanten MDL1(E599Q) und MDL1(H631A), kann in 8-azido-ATP *photo-crosslinking* und Konkurrenzexperimenten nachgewiesen werden (Hofacker *et al.*, 2007).

Für MDL1 werden zwei unterschiedliche Gensequenzen publiziert. Vergleiche der ATPase Aktivität der resultierenden Proteine MDL1 und MDL1(L150F) (2.1.18.9) zeigen keinerlei Unterschiede (pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J.W.-Goethe Universität Frankfurt/Main).

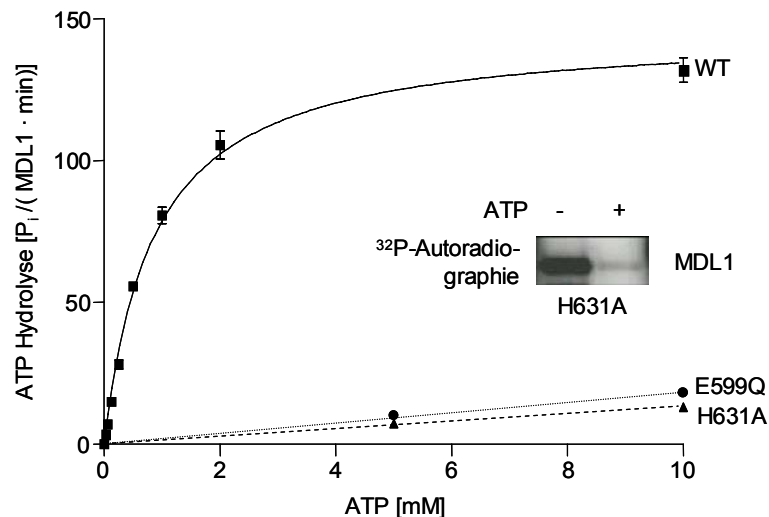


Abbildung 23 ATPase Aktivitäten von MDL1, MDL1(E599Q) und MDL1(H631A)

Die ATPase Aktivität als Funktion der ATP-Konzentration wurde bei 30°C in Anwesenheit von 0,1 µM MDL1 analysiert. Digitonin-solubilisiertes MDL1 (■) zeigt eine ATPase Aktivität mit einer Wechselzahl k_{cat} von 2,5 ATP sec⁻¹ (pro Monomer MDL1) und einem $K_{M,ATP}$ von 0,85 mM. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Hill-Gleichung ($\alpha x_n / (b_n + x_n)$) ausgewertet und ergeben eine Hill-Konstante (n) von 0,98. Durch 8-azid-[α -³²P]ATP *photo-crosslinking* Experimente kann gezeigt werden, dass die Mutante MDL1(H631A) (▲) spezifisch ATP bindet, aber ebenso wie MDL1(E599Q) (•), defizient in der ATP-Hydrolyse ist (Hofacker *et al.*, 2007).

3.9. Identifizierung der mitochondrialen Signalsequenz von MDL1

Mitochondriale Proteine können auf verschiedenen Wegen an ihren Bestimmungsort dirigiert werden. Für den Import hydrophober Innenmembranproteine wird eine N-terminale Leitsequenz diskutiert (Pfanner *et al.*, 2004). Die klassische MTS besteht aus 20 bis 35 Aminosäuren (Neupert, 1997). In Einzelfällen kann sie deutlich verlängert sein, wie dies für ABC-me (ABCB10) gezeigt wurde (Graf *et al.*, 2004). Circa 30% der mitochondrialen Proteine besitzen keine N-terminale Leitsequenz: alle Proteine der Außenmembran, einige Proteine des Innenmembranraums und der Innenmembran. Für einige Proteine der Außenmembran (z.B. Tom70) wird die Information des Bestimmungsortes durch ein kurzes MTS-ähnliches Segment, gefolgt von einem Rückhaltesignal, kodiert (Hurt *et al.*, 1985; McBride *et al.*, 1992). Für die Insertion von Tom22 in die Außenmembran ist ein internes Segment verantwortlich, dass der N-terminalen Leitsequenz ähnelt (Rodriguez-Cousino *et al.*, 1998). Innerhalb der mitochondrialen Innenmembran benötigt das Protein BCS1 zur Insertion ein internes Leitsequenz-ähnliches Segment (Fölsch *et al.*, 1996). In Kombination mit einem vorausgehenden hydrophoben Sequenzmotiv wird dadurch eine Membranpotential-abhängige Integration in die Innenmembran erreicht.

Mit Hilfe verschiedener Computerprogramme können die eventuellen Schnittstellen,

an der die vorhergesagte N-terminale Signalsequenz abgetrennt wird, bestimmt werden. Die angenommenen Leitsequenzen mitochondrialer ABC-Transporter weisen keine signifikanten Ähnlichkeiten auf. Für MDL1 variieren die Vorhersagen der Signalsequenz, abhängig von dem jeweils benutzten Programm.

| Vorhergesagte MTS (Aminosäure) | Vorhergesagte Schnittstelle | Programm |
|---|------------------------------------|--|
| 1 - 59 | zwischen Aminosäure 59 und 60 | MitoProtII 1.0a4, (Claros und Vincens, 1996) |
| 1 - 24 | zwischen Aminosäure 24 und 25 | PSORTII, (Horton und Nakai, 1997) |
| 1 - 100 | zwischen Aminosäure 100 und 101 | TargetP1.1, (Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000; Nielsen <i>et al.</i> , 1997) |

Tabelle 21 MTS-Vorhersage mittels verschiedener Computerprogramme

Um MDL1-spezifische posttranslationale Modifikationen experimentell zu analysieren wurde das Protein mit Hilfe des C-terminalen His₈-Tag aus isolierten Mitochondrien gereinigt, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Anhand der *Coomassie brilliant blue* gefärbten Membran wurde der N-terminale Bereich der MDL1-Sequenz durch Edman Sequenzierung nachgewiesen (Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Kanada).

Die Sequenz für die ersten sechs Aminosäuren des reifen Proteins lautet E S D I A Q. Hierbei handelt es sich um die MDL1-Aminosäurereste S61 bis Q65 (Swiss-Prot. P33310). Durch Edman Sequenzierung wurde somit eine ungewöhnlich lange MTS von 59 Aminosäuren identifiziert. Interessanterweise wird die Aminosäure 60 des unprozessierten Genproduktes laut Edman Abbau modifiziert. Es wird ein Glutamat statt einem Glutamin identifiziert. Ein Vergleich innerhalb der Proteindatenbanken und eine wiederholte Sequenzierung des Expressionskonstruktes bestätigten, Glutamin als Aminosäure 60 innerhalb der MDL1-Originalsequenz. Modifikationen während der Proteinreinigung können ausgeschlossen werden, da MDL1 aus isolierten Mitochondrien gereinigt wurde. Die Computerprogramme MitoProtII 1.0a4 (Claros und Vincens, 1996) und TargetP1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997) sagen für das prozessierte

MDL1(E60-695) ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation voraus.

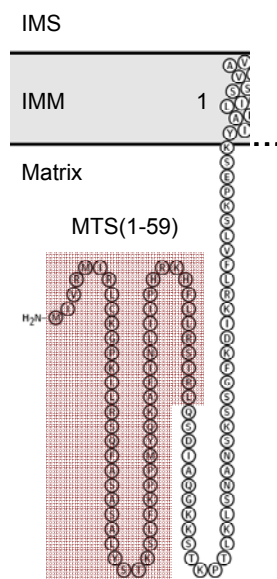


Abbildung 24 Mitochondriale Signalsequenz von MDL1 aus *S. cerevisiae*

Durch Edman Abbau wird der N-Terminus von MDL1 (gereinigt aus Mitochondrien von *S. cerevisiae*) bestimmt. E S D I A Q werden als die ersten sechs Aminosäuren des reifen Proteins identifiziert. Vergleiche der bestimmten Sequenzen mit der Originalsequenz (Swiss-Prot. P33310) zeigen eine ungewöhnlich lange MTS von 59 Aminosäuren.

Insgesamt werden zwei posttranslationale MDL1-Modifikationen festgestellt. Zum einen findet die Spaltreaktion der MTS direkt vor Aminosäure 60 in der mitochondrialen Matrix statt, wodurch eine lange Vorläufersequenz von 59 Aminosäuren entfernt wird. Ebenso kann eine enzymatische Deamidation des neu generierten N-terminalen Glutamins durch eine mitochondriale N-terminale Amidase (Nt-Amidase) nachgewiesen werden. Diese Modifikation wurde für zytosolische Proteine (*N-end rule pathway*) (Baker und Varshavsky, 1995) und für die beiden mitochondrialen Proteine, TIM44 und COX4 (Maarse *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1999), dargestellt. Bis heute ist nicht bekannt ob diese Modifikation ein Artefakt des Edman Abbaus ist oder ob eine Nt-Amidase die Deamidation während der mitochondrialen Translokation katalysiert.

3.10. Lokalisation von MDL1(60-695)

Um die funktionelle Rolle der MTS beantworten zu können, wurde ein MDL1-Konstrukt ohne die identifizierte Signalsequenz, MDL1(60-695), generiert und in *S. cerevisiae* überexprimiert. Durch differentielle Zentrifugation kann nachgewiesen werden, dass sich dieses Konstrukt im Gegensatz zu vollständigem MDL1 in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums befindet und mit dem ER Marker SEC61 kofraktioniert. MDL1-Kontaminationen in der mitochondrialen Fraktion sind auf das verwendete Präparationsprotokoll zurückzuführen.

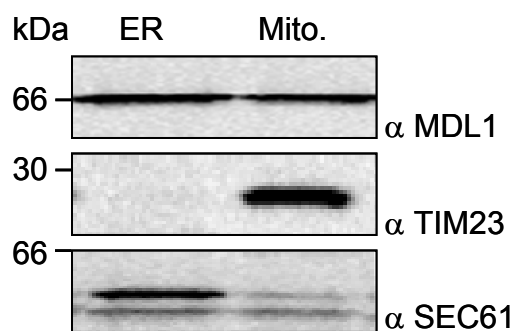


Abbildung 25

Lokalisation von MDL1(60-695) in *S. cerevisiae*

ER und mitochondriale Membranen wurden aus MDL1(60-695) überexprimierenden Hefen präpariert, mittels SDS-PAGE (10%) und Immundetektion durch den MDL1-spezifischen Antikörper und den mitochondrialen Marker TIM23 und den ER-Membran Marker SEC61 analysiert. MDL1(60-695) ist in den Membranen von *S. cerevisiae* zu finden.

SEC61 ist in der ER-Membranfraktion deutlich angereichert, aber ebenso in der mitochondrialen Fraktion enthalten; ein typischer Sachverhalt der verwendeten Mitochondrienisolation. Der mitochondriale Marker TIM23 wird hingegen ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion detektiert.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation durch Immunogold-Markierung verifiziert. MDL1(60-695) ist nicht länger im Mitochondrium lokalisiert. Die gebundenen Goldpartikel binden an tubuläre vesikuläre Membranen, die zu dem Endoplasmatischen Retikulum gehören, bzw. sich von diesem abspalten.

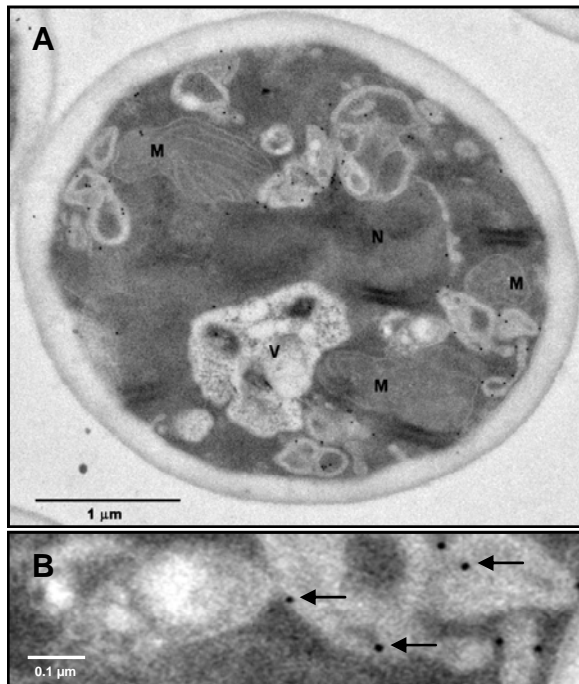


Abbildung 26 Immunogold-Markierung von MDL1(60-695) in *S. cerevisiae*

(A) Gefrierbruch in Kombination mit Immunogold-Markierung an MDL1(60-695) überexprimierenden Hefen. MDL1(60-695) wird in den tubulären vesikulären Membranen detektiert, die zu dem Endoplasmatischen Retikulum gehören, bzw. sich von diesem abspaltet. M bezeichnet das Mitochondrium, N den Nukleus und V die Vakuole. **(B)** Vergrößerung eines Bereiches der Zelle. Pfeile markieren die gebundenen Goldpartikel einiger MDL1-Proteine innerhalb der Membranen des Endoplasmatischen Retikulums.

Ebenso kann durch differentielle Zentrifugation und Immunogold-Markierung die Lokalisation des N-terminal His₁₀-getaggten MDL1(60-695) im Endoplasmatischen Retikulum gezeigt werden. Der zusätzliche His-Tag hat keinerlei Einfluss auf den Einbau in ER-Membranen (Daten nicht gezeigt).

Für die meisten ER-ständigen Proteine ist in der Aminosäuresequenz das ER-Rückhaltesignal KDEL vorhanden. Weiterhin gibt es für ER-Membranproteine das C-terminale di-Lysin-Rückholtsignal (KKXX), ebenso wie das N-terminale di-Aginin-Motiv (XXRR) (Teasdale und Jackson, 1996). Diese Motive, womit eine ER-Lokalisation von MDL1(60-695) erklärt werden könnte, sind innerhalb der MDL1(60-695)-Sequenz nicht vorhanden.

3.11. Membranorientierung von MDL1(60-695)

Identisch zu mitochondrialem MDL1, wurde ebenso für ER-ständiges MDL1(60-695) die Orientierung mittels proteolytischem Verdau nachgewiesen.

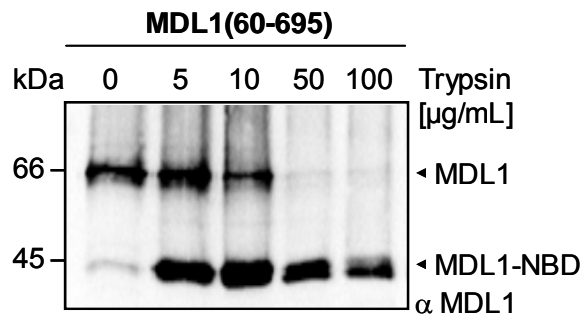


Abbildung 27 Orientierung von ER-ständigem MDL1(60-695)

MDL1(60-695) exprimierende ER-Membranen (30 µg Gesamtprotein) wurden mit steigenden Trypsin-Konzentrationen (0 bis 0,1 g/L) behandelt und durch SDS-PAGE (10%) gefolgt von Immundetektion analysiert. MDL1-NBDs können durch 50 µg/mL Trypsin abgespalten werden.

Limitierter Trypsinverdau von ABC-Halbtransportern bewirkt eine Spaltung innerhalb der Region zwischen TMD und NBD (Kashiwayama *et al.*, 2002). Der Trypsinverdau von MDL1(60-695) enthaltenden ER-Membranen zeigt in Anwesenheit von steigenden Trypsin-Konzentrationen eine Abnahme des MDL1-Signals nach Immundetektion. Schon durch 50 µg/mL Trypsin können die NBDs zu 100% abgespalten werden. Dies zeigt, dass die Nukleotidbindedomänen von MDL1(60-695) für die Protease zugänglich sind und folglich zum Zytosol orientiert vorliegen.

3.12. Transportmessungen

Der ABC-Transporter MDL1 wird als Komponente des Peptidexportes der mitochondrialen Matrix diskutiert (Young *et al.*, 2001). Bis heute kann kein direkter MDL1-spezifischer Peptidtransport gezeigt werden, da Exportprozesse aus intrazellulären Organellen schwierig zu analysieren sind. Das Substrat liegt limitiert und unkontrollierbar im Lumen vor und wird nach dem Transport extrem verdünnt. MDL1(60-695) wird ausschließlich in ER-Membranen exprimiert, wo die NBDs des homooligomere Komplexes zum Zytosol orientiert vorliegen. Im Gegensatz zu Mitochondrien ist in Mikrosomen die zytosolische ATP-Konzentration und Substratzugabe während Peptidaufnahmen-Experimenten kontrollierbar. Die MDL1-spezifische Peptidaufnahmen wurden sowohl mit IMVs (Hefestämme BY4743, Y24137, Y24137/MDL1) als auch mit Mikrosomen, aus Wildtyp-, $\Delta yll048c$ und $\Delta yll048c$ /MDL1(60-695) Hefestämmen in An- und Abwesenheit von ATP durchgeführt. YLL048c (alias BAT1, YBT1) wird als Gallensalztransporter (*bile acid*

transporter) beschrieben. Er ist zur Zeit der einzige ABC-Transporter, der vorzugsweise in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Janas, 2002; Ortiz *et al.*, 1997). Für YLL048c konnte, ebenso wie für TAP1/2, ein spezifischer Peptidtransport in das ER-Lumen nachgewiesen werden (Janas, 2002). Um während der Peptidaufnahme-Experimente eine Hintergrund-Aktivität des ABC-Transporters YLL048c auszuschließen, wurden Mikrosomen der Hefestämme $\Delta yll048c$ und $\Delta yll048c/MDL1(60-695)$ verwendet. Eine eventuell vorhandene Peptidaufnahme ist in diesem Fall ausschließlich auf MDL1 zurückzuführen. Zur Identifizierung des physiologischen MDL1-Substrates wurden radioaktiv markierte Peptidbibliotheken verschiedener Länge X_n ($n = 5$ bis $8, 11, 17$ und 23 , X repräsentiert alle 19 genetisch kodierten Aminosäure, mit Ausnahme von Cystein, in äquimolarer Verteilung) und das TAP-spezifische Peptid R9LQK (Uebel *et al.*, 1997b) angeboten. Mit Hilfe der kombinatorischen Peptidbibliotheken konnten Substratspezifität und Erkennungsprinzipien verschiedener pro- und eukaryotischer Peptidtransporter nachgewiesen werden (Detmers *et al.*, 2000; Doeven *et al.*, 2004; Uebel *et al.*, 1995; Uebel *et al.*, 1999; Wolters *et al.*, 2005). Ebenso wurden definierte Peptide eingesetzt, die eventuell für einen Substrattransport in Frage kommen. Zu diesen gehören antigene Peptide, die durch den MHC I Komplex an der Zelloberfläche von Säugerzellen präsentiert werden (Fischer Lindahl *et al.*, 1991). Diese Peptide haben ihren Ursprung in mitochondrial kodierten Proteinen. Es ist bekannt, dass Mutationen in der mitochondrialen DNA eine verstärkte Präsentation von MHC I an der Zelloberfläche hervorrufen und somit offenbar zur Eliminierung der betroffenen Zellen führen (Gu *et al.*, 2003). Trotz intensiver Studien kann keine MDL1-spezifische Transportaktivität durch Peptidbibliotheken oder spezifische Peptide in ER-Membranen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde [^{14}C] Aminolävulinat benutzt, um eine Verbindung zwischen MDL1 und der Hämbiosynthese nachzuweisen. MDL1 könnte für den Transport von Zwischenprodukten aus der Matrix in das Zytosol verantwortlich sein. In Aufnahme-Experimenten konnte aber ebenso für dieses Substrat keine Anhäufung von radioaktivem Material im Lumen des ER beobachtet werden. Ähnliche Resultate werden für Aufnahme/Transport-Experimente in Anwesenheit von invertierten mitochondrialen Innenmembranvesikeln erhalten.

Aufgrund dieser Daten besteht die Möglichkeit, dass MDL1 kein allgemeiner Peptidtransporter ist. MDL1 könnte für eine spezifische Translokation einer sehr

geringen Bandbreite von Peptiden oder aber ausschließlich für modifizierte Peptide verantwortlich sein. Diese Peptide sind wahrscheinlich in den eingesetzten Peptidbibliotheken unterrepräsentiert. Die systematischen Studien eröffnen auch die Möglichkeit, dass zusätzliche Kofaktoren für den Substrattransport benötigt werden. Die Anwesenheit dieser Faktoren kann in den Aufnahme-Experimenten und innerhalb der verwendeten Bibliotheken nicht gewährleistet werden. Damit würde sich MDL1 von anderen ABC-Transportern wie TAP (Uebel *et al.*, 1997a), TAP-like (Wolters *et al.*, 2005) und OppA (Detmers *et al.*, 2000; Doeven *et al.*, 2004) abgrenzen.

Diese Ergebnisse stehen in direktem Zusammenhang mit einer nicht stimulierbaren ATP-Hydrolyse von Digitonin-solubilisiertem gereinigtem MDL1 in Anwesenheit von Peptidbibliotheken verschiedener Länge (X_n , $n = 7$ bis 9 , 11 und 53) (pers Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main).

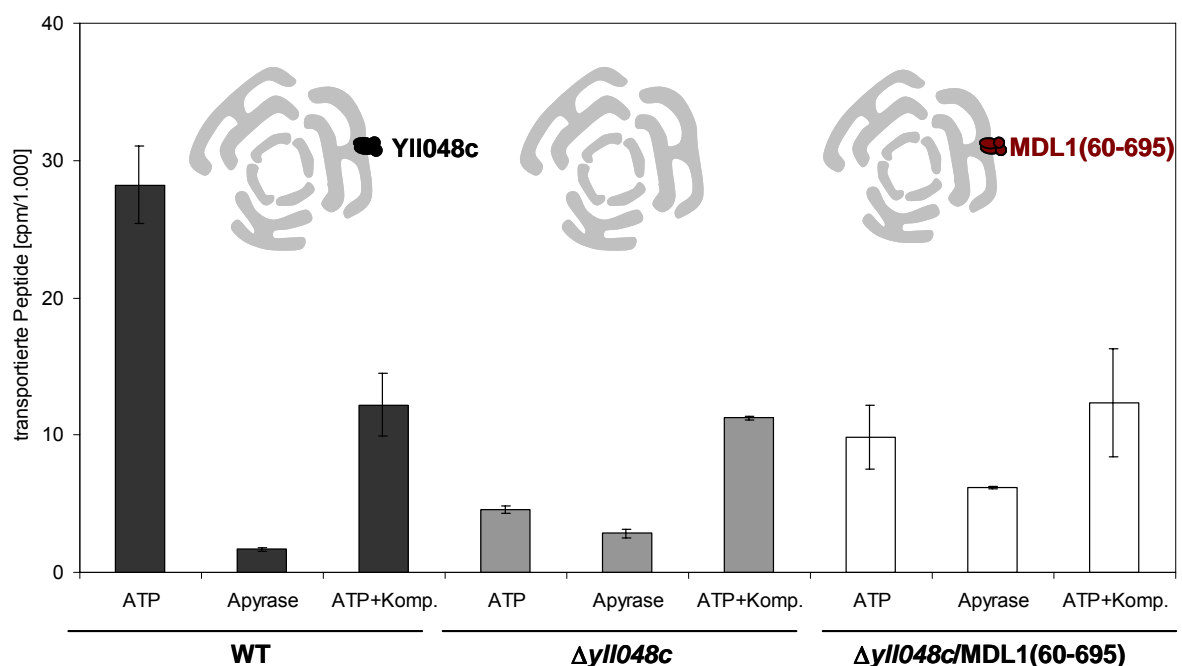


Abbildung 28 Beispielhaftes Ergebnis eines Aufnahme-Experimentes

Der MDL1-spezifische Peptidtransport wurde an ER-Membranen, isoliert aus Wildtyp-, $\Delta yII048c$ und $\Delta yII048c/MDL1(60-695)$ Hefestämmen, in Anwesenheit von radioaktivmarkierte Peptidbibliotheken verschiedener Länge (X_n ; $n = 5$ bis 8 , 11 , 17 und 23) und des TAP-spezifischen Peptides R9LQK durchgeführt. Gezeigt ist ein typisches Ergebnis des Transportexperimentes. WT Mikrosomen zeigen in Anwesenheit von ATP eine spezifische Aufnahme radioaktiven Materials, wohingegen in $\Delta yII048c$ und $\Delta yII048c/MDL1(60-695)$ Membranvesikeln keine Transportaktivität nachgewiesen werden kann. Apyrase und ATP in Anwesenheit eines Kompetitorpeptides wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

3.13. Reinigung von MDL1 aus Gesamtmembranen

Um die Ausbeute an gereinigtem MDL1 und MDL1(60-695) zu erhöhen wurden beide Proteine aus Gesamtmembranen gereinigt (2.2.2.10, 2.2.3.2).

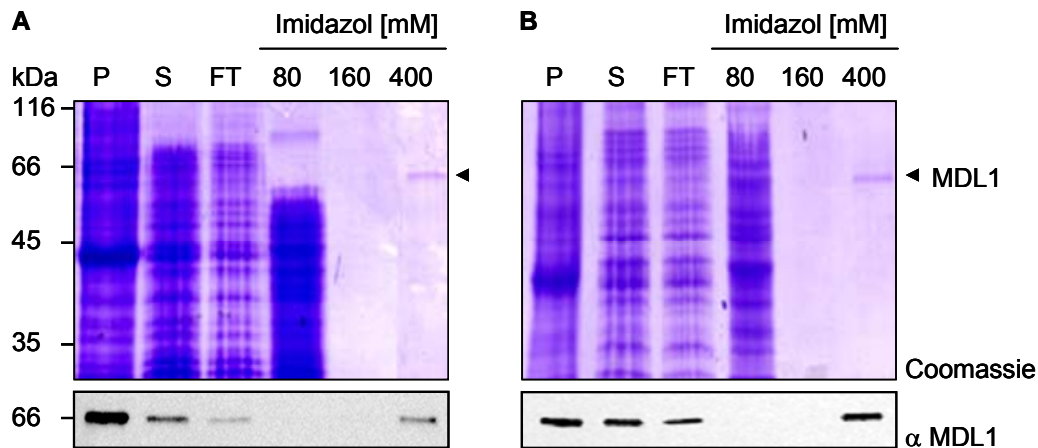


Abbildung 29 Reinigung von MDL1 und MDL1(60-695) aus Gesamtmembranen

Zur Reinigung von MDL1, mit einem C-terminalen His₈-Tag (A) und MDL1(60-695) mit einem N-terminalen His₁₀-Tag (B), wurden Gesamtmembranen aus *S. cerevisiae* präpariert, die das jeweilige Protein exprimieren. Membranen (10 g/L) wurden in Anwesenheit von 1% (m/v) Digitonin solubilisiert. Das Protein wurde homogen durch Metall-Affinitätschromatographie (Ni-IDA) gereinigt. Sediment (P) und Überstand des Solubilisates (S), Durchfluss (FT), Fraktionen mit steigenden Imidazol-Konzentrationen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (10%, Coomassie-Färbung) und durch Immundetektion mit dem MDL1-spezifischen Antikörper analysiert.

Die Ausbeuten an gereinigtem MDL1 und MDL1(60-695) aus Gesamtmembranen liegen circa 10-fach höher als die erhaltenen Proteinkonzentrationen aus isolierten Mitochondrien, bzw. ER-Membranen.

| | MDL1, bzw. MDL1(60-695) [µg/g Nassgewicht Hefe] |
|----------------------------|--|
| Mitochondrien/ER-Membranen | 3 - 5 |
| Gesamtmembranen | 20 - 45 |

Tabelle 22 Erhaltene MDL1-Konzentrationen

MDL1 und MDL1(60-695) exprimiert in ihrem entsprechenden Organell, werden mittels SDS-PAGE (10%) bei einer Größe von circa 62 kDa detektiert. Gleiches gilt für beide Proteinvarianten präpariert aus Gesamtmembranen. Kleinere Größenunterschiede sind auf die anwesenden *Tags* zurückzuführen. Mitochondriales MDL1 besitzt C-terminal vier Glyzine, eine Faktor Xa Schnittstelle und einen His₈-*Tag*, ER-ständiges MDL1(60-695) hingegen nur einen N-terminalen His₁₀-*Tag*.

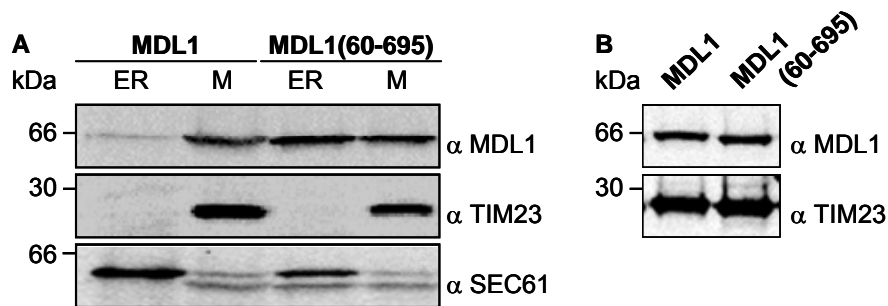


Abbildung 30 Größenvergleich von überexprimiertem MDL1 und MDL1(60-695)

(A) ER und mitochondriale Membranen (M) wurden aus MDL1 bzw. MDL1(60-695) überexprimierenden Hefen präpariert und MDL1 durch den spezifischen Antikörper nachgewiesen. TIM23 dient als mitochondriales Markerprotein, SEC61 Marker der ER-Membranen. (B) In gleicher Weise wurden MDL1 bzw. MDL1(60-695) enthaltende Gesamtmembranen analysiert. MDL1 und MDL1(60-695) werden im SDS-PAGE(10%) bei einer Größe von 62 kDa detektiert. Kleine Größenunterschiede sind auf die Anwesenheit unterschiedlicher *Tags* zurückzuführen (MDL1-Xa-His₈, His₁₀-MDL1(60-695)).

3.14. Homooligomere MDL1 und MDL1(60-695) Komplexbildung

Monomere eines ABC-Halbtransporters müssen sich zu Dimeren zusammenlagern, um funktionell aktiv zu sein. Daher wurde die korrekte Integration, Bildung von Homooligomeren und vergleichbare ATPase Aktivitäten von mitochondrialem und ER-ständigem MDL1 in die jeweiligen Membranen untersucht. Der Oligomerisierungszustand von MDL1 in unterschiedlichen Zellkompartimenten wurde durch analytische Gelfiltration analysiert und die Eluatfraktionen durch Silberfärbung und Immundetektion in Anwesenheit des spezifischen α MDL1-Antikörpers untersucht. Mitochondriales, als auch ER-ständiges MDL1(60-695), bilden homooligomere Komplexe vergleichbare Größe. Innerhalb des Ausschlussvolumens werden keine Proteinaggregate detektiert. Solubilisation mit Hilfe anderer Detergenzien hatte den Verlust der ATPase Aktivität des MDL1-Komplexes zur Folge (Hofacker *et al.*, 2007).

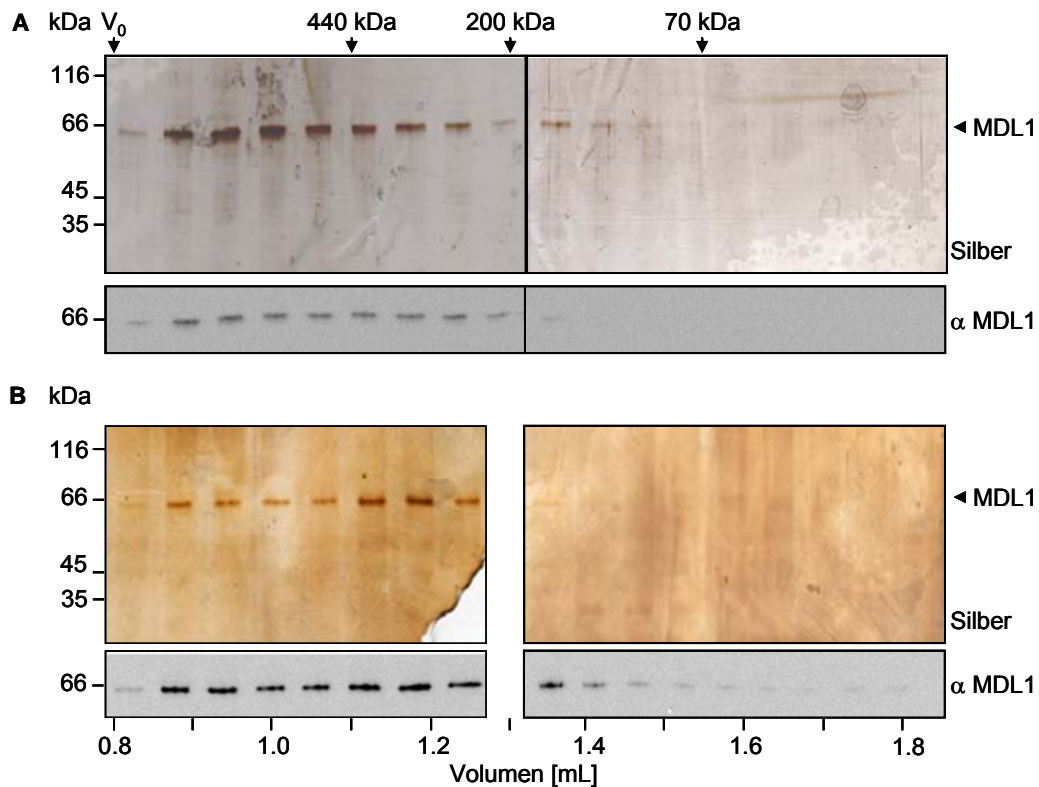


Abbildung 31 Homooligomere MDL1-Komplexe

Gereinigtes MDL1 (**A**) und MDL1(60-695) (**B**) wurden durch Gelfiltration mit einer Superdex™ 200 PC 3.2 (SMART System) in Anwesenheit von 0,1% (m/v) Digitonin analysiert. Jede zweite Fraktion (30 μ L) wurde durch SDS-PAGE (10%, Silberfärbung) und Immundetektion mit dem MDL1-spezifischen Antikörper analysiert.

Um auszuschließen, dass die breite Verteilung innerhalb der analytischen Gelfiltration nicht auf Faltungsprobleme zurückzuführen ist, wurde der oligomere Zustand von MDL1 und MDL1(60-695) zusätzlich mittels Blau Nativ Gelelektrophorese untersucht. Beide Proteinvarianten, solubilisiert aus Gesamtmembranen, werden als definierte Banden von circa 250 kDa nachgewiesen. Dies entspricht homodimeren MDL1-Komplexen, unabhängig ihres subzellulären *Targeting*. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Hilfe der Einzelpartikel Analyse erhalten (Hofacker *et al.*, 2007).

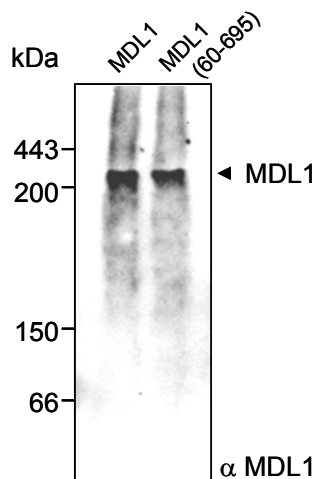


Abbildung 32
Komplexe

BN-PAGE der MDL1- und MDL1(60-695)-

Gesamtmembranen (10 mg/mL) MDL1 oder MDL1(60-695) überexprimierender Hefen wurden in Anwesenheit von 1% (m/v) Digitonin solubilisiert. Die löslichen Fraktionen wurden mittels Blau Nativ Elektrophorese und Immundetektion durch den α MDL1-Antikörper analysiert. Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und Albumin (66 kDa) wurden als Markerproteine eingesetzt.

Die Parameter der ATP-Hydrolyse sind ein wichtiges Kriterium im Vergleich von mitochondrial und ER-ständigem MDL1. Es ist technisch nicht möglich eine spezifische MDL1 ATP-Hydrolyse im entsprechenden Organell zu bestimmen, da Hintergrund ATPase Aktivitäten anderer Proteine nicht spezifisch und komplett ausgeschaltet werden können (Daten nicht gezeigt).

Digitonin-solubilisiertes mitochondriales MDL1, isoliert aus Gesamtmembranen, ist ATPase aktiv mit einem $K_{M,ATP}$ von $120 \pm 6 \mu\text{M}$ und einer Wechselzahl k_{cat} von 74 ± 1 ATP/min (pro Monomer), während ER-ständiges MDL1(60-695) einen $K_{M,ATP}$ von $200 \pm 1 \mu\text{M}$ und eine Wechselzahl von 77 ± 1 ATP/min (pro Monomer) aufweist. Die ATP-Hydrolyseraten verhalten sich linear in Bezug auf die Proteinkonzentration ($0,1 \mu\text{M}$ bis $1 \mu\text{M}$) und Inkubationszeiten bis zu 20 min (Daten nicht gezeigt).

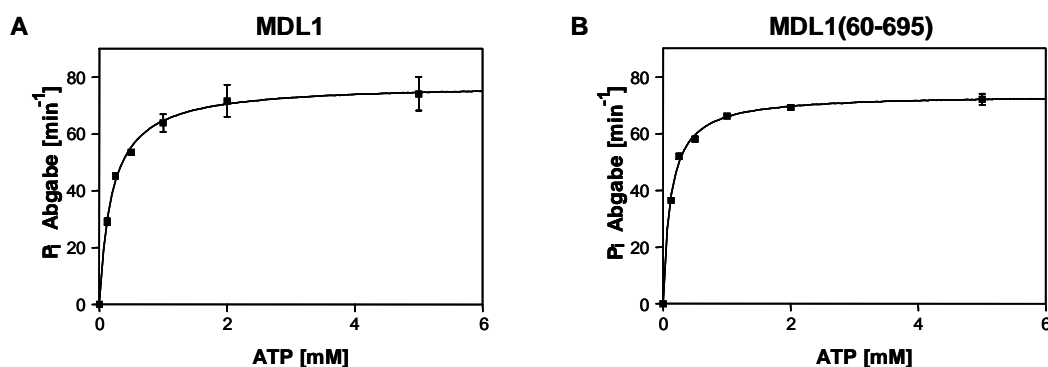


Abbildung 33 **MDL1-spezifische ATP-Hydrolyseraten**

ATPase Aktivitäten wurden in Abhängigkeit der ATP-Konzentration für 10 min bei 30°C in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ gereinigtem Protein ermittelt. MDL1 (**A**) und MDL1(60-695) (**B**) zeigen eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem k_{cat} von 74 ± 1 ATP/min, bzw. 77 ± 1 ATP/min (pro MDL1 Untereinheit). Ein $K_{M,ATP}$ von $120 \pm 6 \mu\text{M}$ für MDL1 und $200 \pm 1 \mu\text{M}$ für MDL1(60-695) wird erreicht. Alle Werte werden aus drei unabhängigen Messungen gewonnen.

Ein weiteres Kriterium der biochemischen Charakterisierung eines ABC-Transporters ist die Inhibition der ATP-Hydrolyse durch Vanadat. Die basale ATPase Aktivitäten von MDL1 kann durch Ortho-Vanadat herabgesetzt werden, wie dies schon für andere ABC-Transporter gezeigt wurde (Gorbulev *et al.*, 2001; Urbatsch *et al.*, 1995a; Urbatsch *et al.*, 1995b). Vanadat-sensitives MDL1 aus Mitochondrien zeigt eine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 0,86 mM, wohingegen der Wert für MDL1(60-695) bei vergleichbaren 1,1 mM liegt.

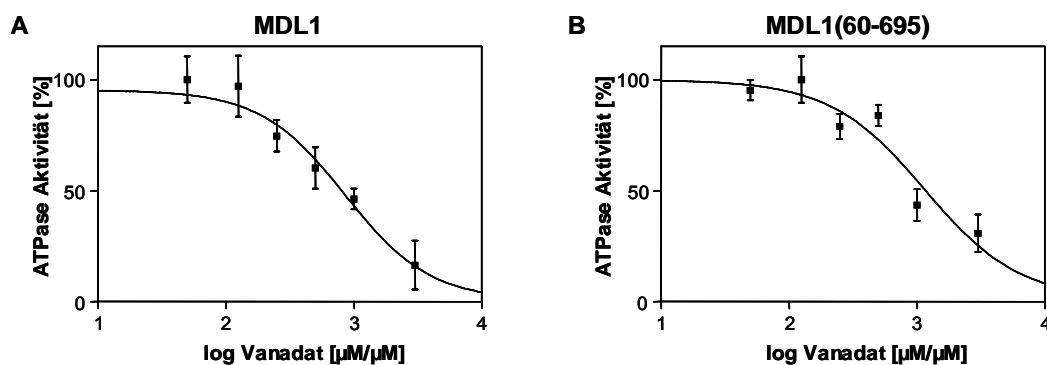
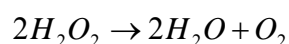


Abbildung 34 Vanadat-Inhibition von gereinigtem MDL1 und MDL1(60-695)

Inhibition der ATPase Aktivität von MDL1 (A) und MDL1(60-695) (B) in Anwesenheit von steigenden Ortho-Vanadat-Konzentrationen. Basierend auf den Daten wird eine halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}) von 860 µM, bzw. 1,1 mM bestimmt. Alle Werte basieren auf dreifachen Messungen.

3.15. Die physiologische Funktion von MDL1

MDL1 wird als Komponente von Detoxifizierungsreaktionen in *S. cerevisiae* beschrieben (Chloupková *et al.*, 2003). Der zelluläre Stoffwechsel von H_2O_2 wird vorwiegend durch die Glutathion-Peroxidase und -Katalase bestimmt (Grant *et al.*, 1998). Hinweise für eine MDL1-spezifische Funktion im zellulären Glutathion-Stoffwechsel konnten nicht beobachtet werden (Chloupková *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der Katalase durch die Expression von MDL1 beeinflusst. W303/MDL1 Zellen zeigen eine 50% Abnahme der Katalase Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.



Gleichung 2 Katalase bewirkt den Abbau von H_2O_2

Im ultravioletten Bereich weist H_2O_2 ein, mit abnehmender Wellenlänge, kontinuierlich steigendes Absorptionsvermögen auf. Der Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Peroxisomen kann daher in Quarzküvetten gegen den

Katalasepuffer in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 und 350 nm gemessen werden. Um eine Deaktivierung des Enzyms, die Freisetzung großer Mengen an Sauerstoff und eine damit verbundene Blasenbildung in den Küvetten zu verhindern, wurde mit relativ geringen H_2O_2 -Konzentrationen (13 mM) gearbeitet. Wird plasmidständiges MDL1 unter der Kontrolle des intrinsischen Promotors in dem Hefestamm W303 exprimiert, so ist eine Reduktion der Katalase Aktivität von circa 50% im Vergleich zu W303 Zellen zu beobachten. Ähnliche Werte werden durch Überexpression von MDL1 unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors erreicht. Überraschenderweise liegt die Katalase Aktivität der MDL1(H631A)-Mutante im Bereich der Aktivität des plasmidständig exprimierten MDL1. Die ATPase inaktive MDL1-Mutante verhält sich ähnlich des aktiven ABC-Transporters.

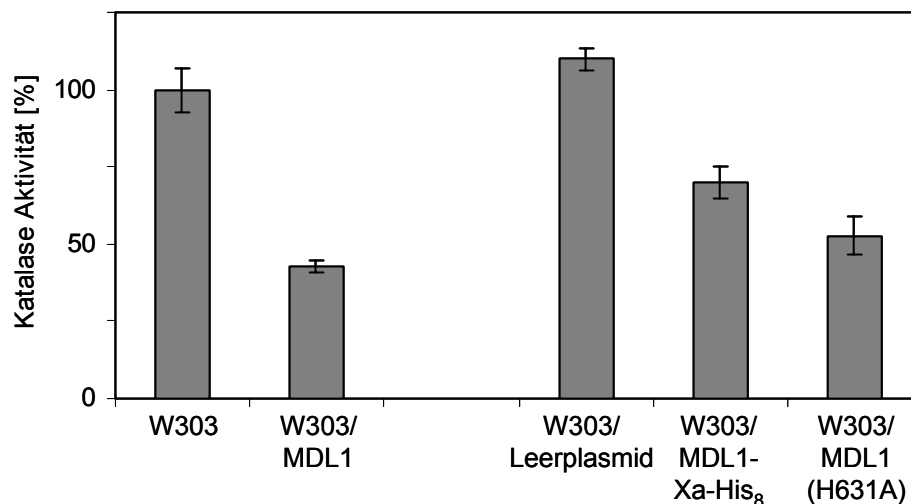


Abbildung 35 MDL1-Effekt auf die Katalase Aktivität

Die Katalase Aktivität wurde im groben Zellextrakt aus Zellen bestimmt, die in SCGal-URA-Medium bis zu einer OD_{600} von 1 kultiviert wurden. Die Aktivität des Hefestammes W303 wurde auf 100% festgesetzt. Die plasmidgetriebene MDL1-Expression unter der Kontrolle des intrinsischen Promotors bewirkt eine Reduktion der Katalase Aktivität von nahezu 50%. MDL1 kontrolliert durch den *GAL1*-Promotor zeigt eine circa 35% verringerte Aktivität. Die Werte der ATPase inaktiven MDL1(H631A)-Mutante liegen im Bereich von aktiven MDL1. Das Leerplasmid mit dem entsprechenden Selektionsmarker zeigt keinen Einfluss auf die Katalase Aktivität. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen gewonnen.

Innerhalb der mitochondrialen Innenmembran von *S. cerevisiae* sind drei unterschiedliche ABC-Transporter lokalisiert. Deletion von MDL1 oder MDL2 zeigen keinerlei Phänotyp. Nur ATM1 ist ein essentielles Protein. Es steht in Verbindung mit der Assemblierung zytosolischer Eisen/Schwefel-Cluster und $\Delta atm1$ Zellen besitzen einen deutlichen Wachstumsphänotyp (Lill und Kispal, 2000). Werden $\Delta atm1/ATM1$

Hefen durch die Anwesenheit von 5-FOA dazu angeregt ihre plasmidkodierte ATM1-Kopie (*URA3*) zu entfernen, sind die resultierenden $\Delta atm1$ Zellen nicht lebensfähig. Expression von MDL1, kodiert auf einem *multicopy* Plasmid, in $\Delta atm1$ Hefen ($\Delta atm1/MDL1$) kann diesen deutlichen Wachstumsdefekt komplementieren und dadurch teilweise die Funktion von ATM1 und somit die Assemblierung von zytosolischen Eisen/Schwefel-Cluster restaurieren (Chloupková *et al.*, 2003).

Alle Versuche wurden in dem W303 Hefestamm (Wildtyp, MATa, *ade2*, *can1-100*, *his3-11,15*, *leu2-3,112*, *trp1-1*, *ura3-1*) durchgeführt. Die Abwesenheit eines funktionellen *URA3* Gens, kann durch Transformation eines plasmidständigen Wildtyp-*URA3* oder durch dessen genomische Integration aufgehoben werden. Welche Form von *URA3* vorliegt kann durch Anwesenheit von 5-FOA im Wachstumsmedium überprüft werden. Zellen, die funktionelles *URA5* oder *URA3* enthalten, konvertieren 5-FOA zu toxischem 5'-Fluorouridin Monophosphat, was die Zellwachstumsrate drastisch senkt und eventuell sogar zum Verlust des plasmidständigen funktionellen *URA3* führt. W303 Zellen sind in Anwesenheit von 5-FOA lebensfähig (Abbildung 36A), da sie nur die mutierte *ura3-1* Variante beinhalten. Werden sie hingegen mit dem Leerplasmid p426-*ADH* (funktionelles *URA3*) transformiert, ist ihr Wachstum in Anwesenheit von 5-FOA aufgehoben (Abbildung 36B). Auch $\Delta atm1$ Hefen, die eine plasmidständige ATM1-Kopie (*URA3*) enthalten, sind nach *in vivo* Komplementation nicht lebensfähig (Abbildung 36C). Eine Kotransformation mit dem Leerplasmid pRS424 (*TRP1*) (Christianson *et al.*, 1992) führt ebenfalls zu keinem Wachstum in Anwesenheit von 5-FOA (Abbildung 36D). Dadurch ist auszuschließen, dass Vorstufen des Tryptophan-Stoffwechsels ausschlaggebend für die ATM1-Komplementation sind. Wachstum in Anwesenheit von 5-FOA wird hingegen für $\Delta atm1$ Zellen, transformiert mit zwei unabhängigen plasmidständigen Kopien von ATM1 (funktionelles *URA3*) und MDL1 (*TRP1*), beobachtet (Abbildung 36E). In diesem Fall übernimmt MDL1 teilweise die Funktion von ATM1 und hebt dadurch den Wachstumsphänotyp der $\Delta atm1$ Hefen auf.

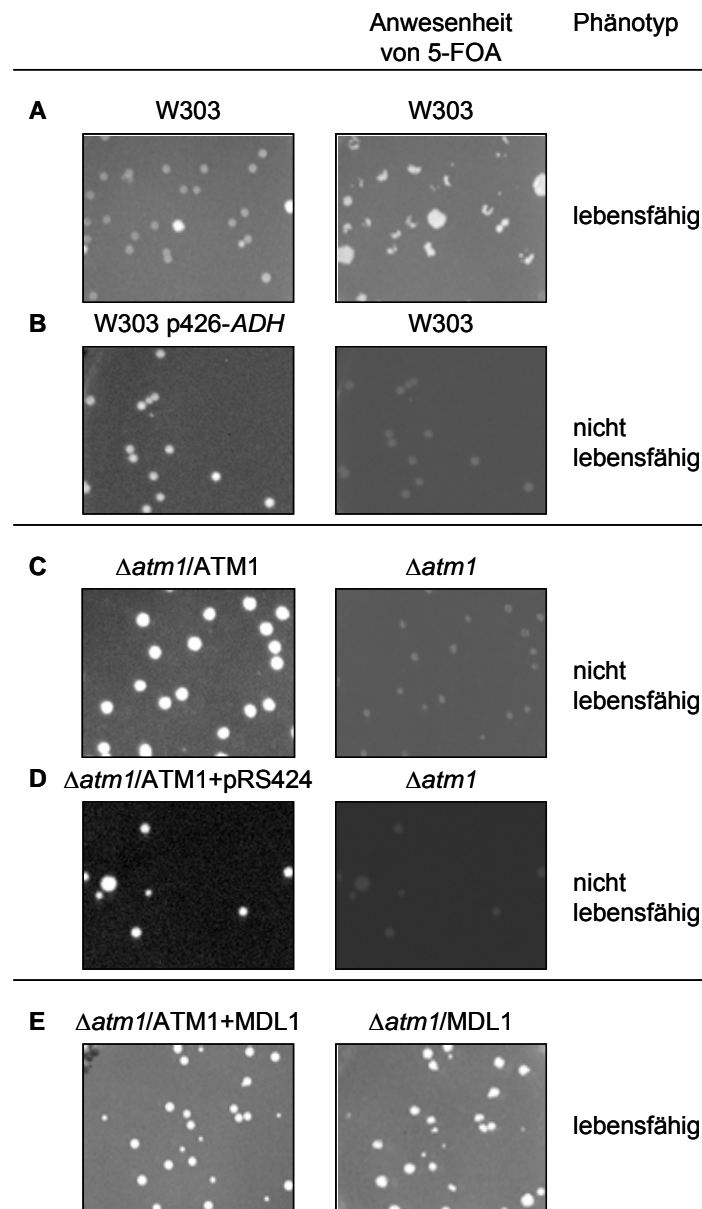


Abbildung 36 ATM1-Komplementation durch MDL1

Unterschiedliche Zellen (W303 **(A)**, W303 p426-ADH **(B)**, $\Delta atm1/ATM1$ **(C)**, $\Delta atm1/ATM1+pRS424$ **(D)** und $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ **(E)**) wurden auf SCD-Platten mit den entsprechenden Aminosäuren zur Selektion plattiert. Selektivplatten inkl. 5-FOA nach Replikation wurden 7 Tage bei 30°C inkubiert. W303 Zellen sind aufgrund ihres mutierten *ura3-1* in Anwesenheit von 5-FOA lebensfähig **(A)**, wohingegen W303 p426-ADH aufgrund des plasmidständigen funktionellen *URA3* in Anwesenheit von 5-FOA nicht lebensfähig sind **(B)**. $\Delta atm1/ATM1$ **(C)** und $\Delta atm1/ATM1+pRS424$ **(D)** werden durch 5-FOA zum Verlust des plasmidständigen *ATM1* (Selektion durch *URA3*) angeregt. $\Delta atm1/ATM1+pRS424$ beinhalten neben dem plasmidständigen *ATM1* das pRS424 Plasmid (Selektion durch *TRP1*). Diese Plasmid kann, ebenso wie $\Delta atm1$ Zellen, nicht die Funktion von *ATM1* komplementieren. Das Wachstum von $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Hefen in Anwesenheit von 5-FOA ist auf die teilweise Komplementation von *ATM1* durch plasmidständiges *MDL1* (Selektion durch *TRP1*) zurückzuführen **(E)**.

Das Wachstumsverhalten der Zellen nach *in vivo* Komplementationsanalyse wurde durch Anzucht auf entsprechenden Selektivplatten untersucht (Abbildung 37). Lebensfähige W303 Zellen können ohne Aminosäuren Uracil bzw. Tryptophan nicht

wachsen, da deren Biosynthese aufgrund chromosomaler Deletion nicht möglich ist. $\Delta atm1$ Hefen zeigen in Anwesenheit von 5-FOA kein Wachstum, wodurch auch keine Zellen auf den Selektivplatten erhalten werden. $\Delta atm1/MDL1$ Zellen wachsen auf SCD-TRP-Platten, da Tryptophan durch das *MDL1* Plasmid kodiert wird. Die Uracil-Synthese wird dagegen durch den Verlust des *ATM1*-Plasmids abgeschaltet. Nach sechs Passagen in Komplexmedium und anschließender Analyse auf entsprechendem Selektivmedium zeigen $\Delta atm1/MDL1$ Zellen weiterhin kein Wachstum in Abwesenheit von Uracil. Die mögliche Kultivierung ohne Tryptophan, ist ein Indiz für den vollständigen Verlust des *ATM1*-Plasmids und die überlebenssichernde Anwesenheit des *MDL1*-Plasmids.

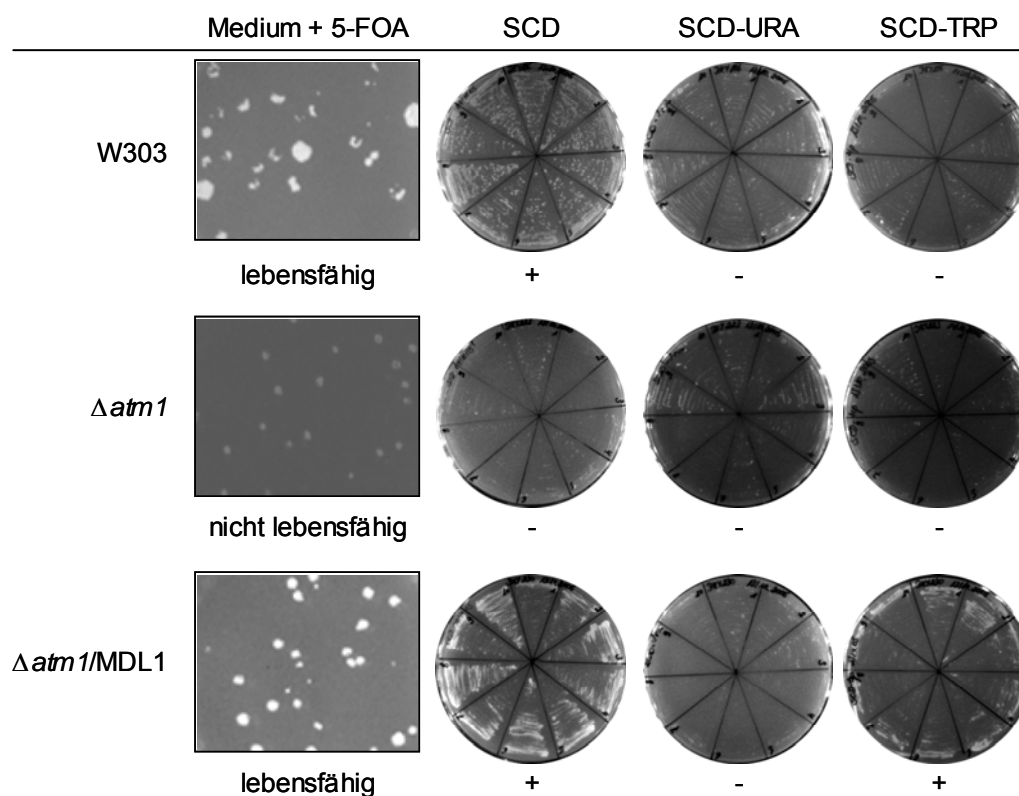


Abbildung 37 Charakterisierung der Hefestämme nach *in vivo* Analyse

Hefen des Stammes W303 sind in Anwesenheit von 5-FOA lebensfähig. Diese Zellen können auf SCD-Medium kultiviert werden. Sie können aber in Abwesenheit von Uracil oder Tryptophan nicht wachsen, da die Biosynthese dieser Aminosäuren aufgrund chromosomaler Deletion nicht möglich ist. $\Delta atm1$ Zellen sind in Anwesenheit von 5-FOA nicht lebensfähig. $\Delta atm1/MDL1$ Zellen wachsen in Anwesenheit von 5-FOA. Diese Zellen zeigen Wachstum auf SCD-Medium und in Abwesenheit von Tryptophan. Das *MDL1*-Plasmid (Selektion durch *TRP1*) ist somit nach *in vivo* Komplementation weiterhin vorhanden. Die Zellen können ohne Uracil nicht überleben, da sie das *ATM1*-Plasmid (Selektion durch *URA3*) verloren haben. Legende: + Wachstum; - kein Wachstum

Durch Immundetektionsstudien sollte gezeigt werden, ob eine erhöhte MDL1-Expressionsrate für die gezeigte Komplementation des $\Delta atm1$ -Phänotyps verantwortlich ist. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien (10 μ g) des W303-Hefestammes und $\Delta atm1$ Hefen in Anwesenheit der plasmidkodierten Gene *ATM1* und *MDL1* unter Kontrolle der endogenen Promotoren ($\Delta atm1/ATM1$, $\Delta atm1/MDL1$, $\Delta atm1/ATM1+MDL1$) analysiert. Die vermehrte MDL1-Expressionsrate in $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ und $\Delta atm1/MDL1$ Hefen im Vergleich zu W303 bzw. $\Delta atm1/ATM1$ Zellen ist ausschließlich auf eine Erhöhung der MDL1-Genzahl (*multicopy* Plasmid) zurückzuführen. Nach Verlust des *ATM1*-Plasmids ($\Delta atm1/MDL1$) ist keine Steigerung der endogenen MDL1-Promotoraktivität zu beobachten.

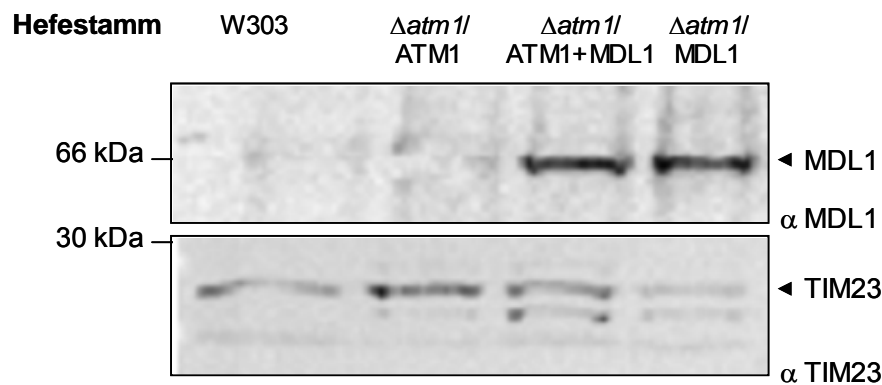
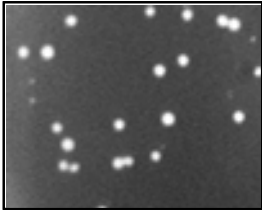
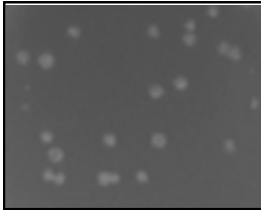

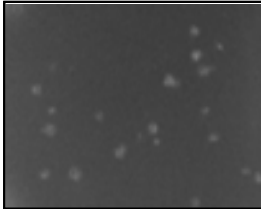
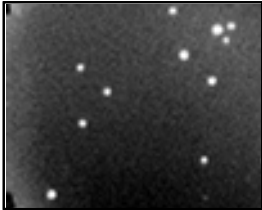
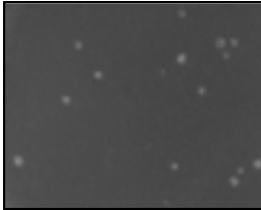


Abbildung 38 MDL1-Expressionsrate in $\Delta atm1$ Hefen

Mitochondrien (10 μ g) unterschiedlicher Hefestämme wurden durch SDS-PAGE (10%) und Immundetektion mit Antikörpern gegen MDL1 und das mitochondriale Referenzprotein TIM23 analysiert. Die Anwesenheit von plasmidständigem *MDL1* führt zu einer Erhöhung der MDL1-Expression in Mitochondrien, wohingegen der Verlust von *ATM1*, sowohl chromosomal als auch plasmidständig, die MDL1-Expressionsrate nicht beeinflusst.

Werden $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Zellen durch 5-FOA zum Verlust der *ATM1*-Kopie gebracht, ist deren Lebensfähigkeit abhängig von der Funktionalität der plasmidständigen MDL1-Kopie. Die ATPase inaktiven MDL1-Mutanten K473A, E599Q und H631A zeigen keinerlei Komplementation des $\Delta atm1$ Phänotyps.

| Konstrukt | $\Delta atm1/$ ATM1+MDL1 | $\Delta atm1/$ MDL1 | Phänotyp |
|-----------|---|--|-------------------|
| K473A |  |  | nicht lebensfähig |
| E599Q |  |  | nicht lebensfähig |
| H631A |  |  | nicht lebensfähig |

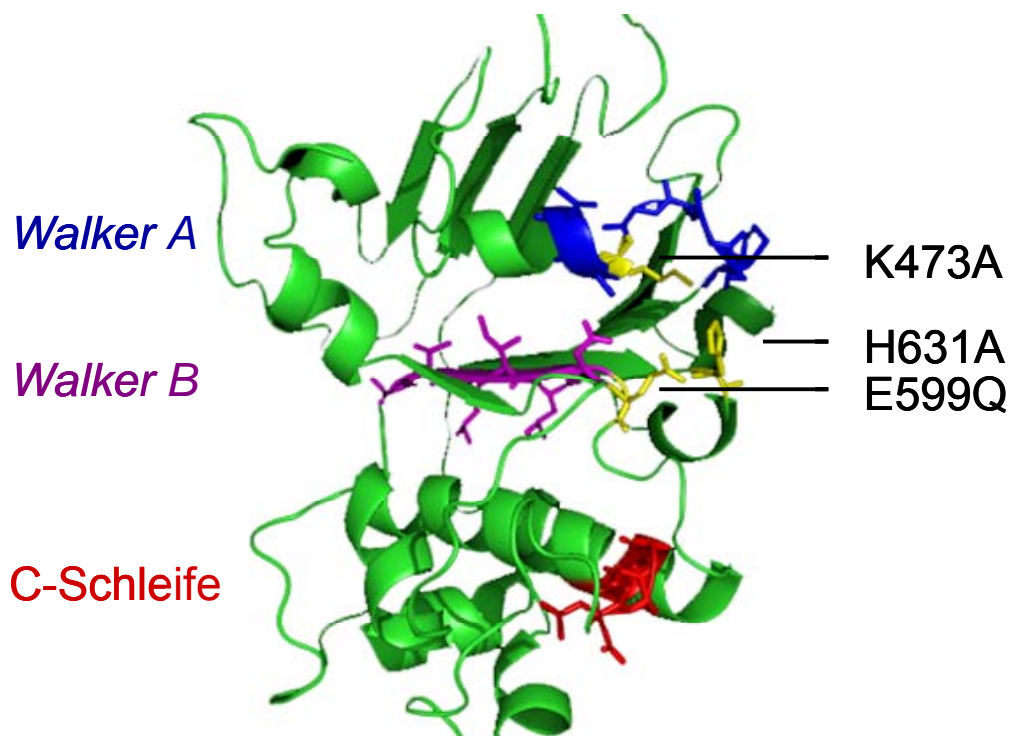
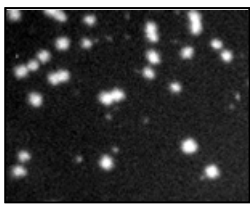
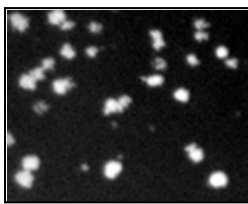
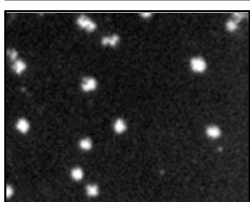
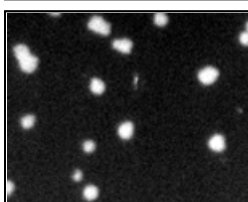
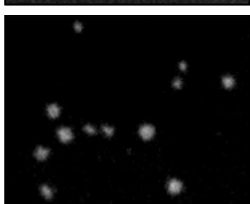
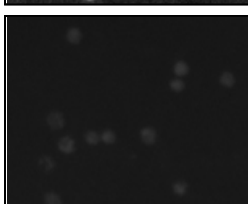


Abbildung 39 ATM1-Komplementationsverhalten ATPase defizienter MDL1-Mutanten

$\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Zellen wurden auf SCD-Platten ohne Uracil und Tryptophan ausgestrichen und anschließend zur Replikation verwendet. Selektivplatten in Anwesenheit von 5-FOA wurden 7 Tage bei 30°C inkubiert. Die ATPase inaktiven Mutanten MDL1(K473A), (E599Q) und (H631A) (Hofacker *et al.*, 2007) zeigen keine Komplementation von ATM1. Die vorliegenden Punktmutationen wurden im MDL1-Plasmid (Chloupková *et al.*, 2003) generiert. Die verwendeten MDL1-Mutationen sind in einem 3D-MDL1 Model dargestellt. Die MDL1-NBD-Sequenz wurde auf die bekannte Kristallstruktur des ABC-Transporters Sav1866 (Dawson und Locher, 2006) modelliert und die entsprechenden Aminosäuren im 3D-MDL1-Model farblich markiert.

In den vorangegangenen Untersuchungen wird das plasmidständige MDL1 durch seinen intrinsischen Promotor reguliert. Wird dem Gen der Galaktose induzierbare *GAL1*-Promotor vorgeschaltet, so ist weiterhin eine ATM1-Komplementation möglich. Ebenso ist die Komplementation unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle. $\Delta atm1$ /MDL1, bei denen MDL1 durch den intrinsischen oder induzierbaren Promotor kontrolliert wird, zeigen Wachstum in Gegenwart von Glukose bzw. Galaktose (Abbildung 40). In Anwesenheit von Glukose wird die Proteinexpression durch den *GAL1*-Promotor nicht induziert. Es erfolgt nur eine geringe Expression des Zielproteins aufgrund unspezifischer Eigenschaften des Promotors (Abbildung 40A). Mit MDL1(H631A) kann auch unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors keine ATM1-Komplementation erreicht werden (Abbildung 39, Abbildung 40).

| A | Verwendetes MDL1 Plasmid | SC-URA-TRP Glukose | 5-FOA Behandlung | Phänotyp |
|----------|----------------------------|---|--|----------------------|
| | MDL1 |  |  | lebensfähig |
| | pRS424 GAL1:MDL1 |  |  | lebensfähig |
| | pRS424 GAL1:MDL1(H631A) |  |  | nicht lebensfähig |

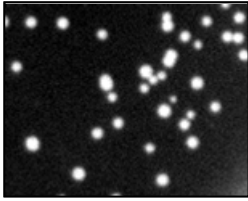
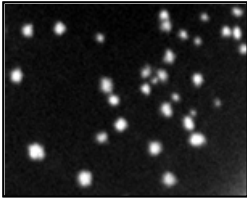
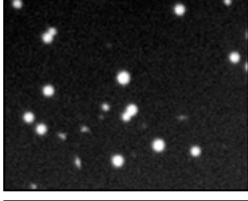
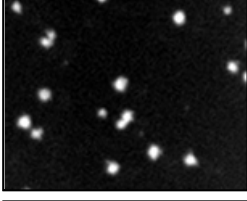

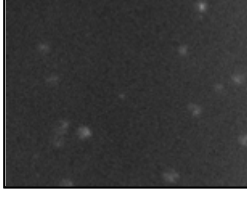
| B | Verwendetes MDL1 Plasmid | SC-URA-TRP Galaktose | 5-FOA Behandlung | Phänotyp |
|----------|--------------------------|---|--|-------------------|
| | MDL1 |  |  | lebensfähig |
| | pRS424 GAL1:MDL1 |  |  | lebensfähig |
| | pRS424 GAL1:MDL1(H631A) |  |  | nicht lebensfähig |

Abbildung 40 **Abhängigkeit der ATM1-Komplementation durch Promotoren**

$\Delta atm1/ATM1$ Zellen kotransformiert mit unterschiedlichen MDL1-Plasmiden (MDL1 kontrolliert durch den intrinsischen oder Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotor) wurden zur *in vivo* Analyse in Anwesenheit von 5-FOA verwendet. Die ATM1-Komplementation der $\Delta atm1/MDL1$ Zellen ist unabhängig des verwendeten Promotors und der anwesenden Kohlenstoffquelle (Glukose **(A)**, Galaktose **(B)**). Als Negativkontrolle dient MDL1(H631A) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Diese Zellen sind nicht in der Lage MDL1 zu komplementieren.

Ein Lokalisationsunterschied zwischen MDL1 und MDL1-His₈, MDL1 inklusive vier C-terminalen Glyzinen, einer Faktor Xa Schnittstelle und eines His₈-Tag, ist innerhalb der Immunogold-Markierungsstudien nicht zu beobachten (3.5). Gereinigtes MDL1 (3.3.7) in Anwesenheit des Tags zeigt eine ATPase Aktivität mit einem k_{cat} von $2,6 \pm 0,1 \text{ ATP sec}^{-1}$ (3.3.8). Mit Hilfe der Komplementationsstudien kann überprüft werden, ob der zusätzliche Tag eine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins hat. $\Delta atm1/ATM1$ Zellen kotransformiert mit MDL1 zeigen in Anwesenheit von 5-FOA Wachstum. $\Delta atm1$ Hefen die einen C-terminalen Tag kodieren, bzw. deren Tag durch ein vorgeschaltetes N-terminales Stopkodon nicht exprimiert wird, können den $\Delta atm1$ Phänotyp komplementieren.

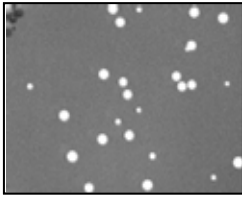
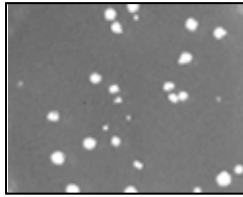
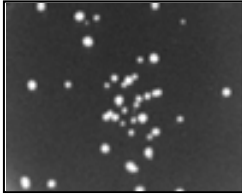
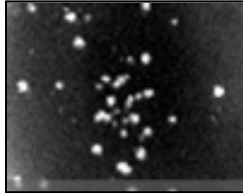
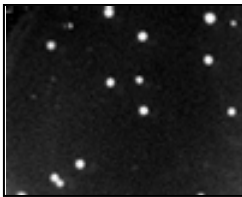
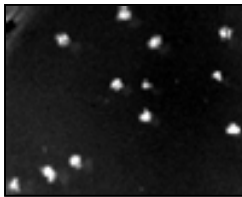
| Konstrukt | $\Delta atm1$ / ATM1+MDL1 | $\Delta atm1$ /MDL1 | Phänotyp |
|--------------------------------------|---|--|-------------|
| WT (MDL1-Stop) |  |  | lebensfähig |
| MDL1-His ₈ -Stop |  |  | lebensfähig |
| MDL1-Stop- His ₈ -Stop |  |  | lebensfähig |

Abbildung 41 Einfluss eines C-terminalen His₈-Tags auf die Komplementation

$\Delta atm1$ Zellen wurden mit ATM1 und verschiedenen MDL1-Plasmiden kotransformiert und zur *in vivo* Analyse in Anwesenheit von 5-FOA verwendet. Alle untersuchten MDL1-Konstrukte, MDL1-Stop, MDL1-His₈-Stop und MDL1-Stop-His₈-Stop, sind in der Lage ATM1 zu komplementieren.

Mitochondriales MDL1 kann den drastischen Wachstumsdefekt von $\Delta atm1$ Zellen komplementieren. ER-ständiges MDL1(60-695) ist hingegen nicht in der Lage einen Teil der ATM1-Funktion zu übernehmen, was durch dessen Wachstumsdefekt in Anwesenheit von 5-FOA gezeigt wird. Diese Daten zeigen, dass die MDL1-Komplementation des zytosolischen Eisen/Schwefel-Cluster-Assemblierungsapparates mit dem posttranslationalen Einbau in die mitochondrialen Membranen verbunden ist.

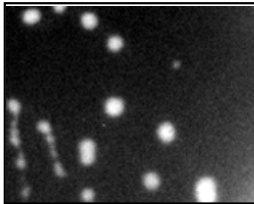
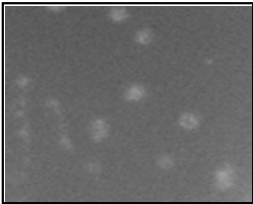
| Konstrukt | $\Delta atm1$ / ATM1+MDL1 | $\Delta atm1$ /MDL1 | Phänotyp |
|--------------|---|--|-------------------|
| MDL1(60-695) |  |  | nicht lebensfähig |

Abbildung 42 Analyse des Komplementationsverhalten von MDL1(60-695)

$\Delta atm1$ /ATM1+MDL1(60-695) Zellen wurden auf SCD-URA-TRP-Platten ausgestrichen und zur Replikation auf 5-FOA-Platten verwendet. ER-ständiges MDL1(60-695) kann die Funktion von ATM1 nicht übernehmen.

Kürzlich konnte die ATPase Aktivität von ATM1 durch Cystein-haltige Peptide stimuliert werden (Kuhnke *et al.*, 2006). Aus diesem Grunde wurde Cystein-freies MDL1 auf seine Funktion innerhalb der *in vivo* Komplementation untersucht. Durch die Lebensfähigkeit der $\Delta atm1$ /MDL1(Cys-frei) Hefen wird gezeigt, dass Cysteine nicht für die Funktion des ABC-Transporters MDL1 benötigt werden.



| Konstrukt | $\Delta atm1$ / ATM1+MDL1 | $\Delta atm1$ /MDL1 | Phänotyp |
|-----------|---|--|-------------|
| Cys-frei |  |  | lebensfähig |

Abbildung 43 Physiologische Funktion von MDL1(Cys-frei)

$\Delta atm1$ /ATM1+MDL1(Cys-frei) Zellen wurden auf SCD-URA-TRP Agarplatten ausgestrichen und anschließend zur Replikation auf 5-FOA verwendet. Cystein-freies MDL1 zeigt Komplementation von ATM1, da die Zellen in Anwesenheit von 5-FOA lebensfähig sind.

Isolierte Mitochondrien aus $\Delta atm1$ Zellen haben eine weiße Farbe (Leighton und Schatz, 1995), ebenso wie $\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien. Diese Beobachtung zeigt, dass ATM1 in der Assemblierung von Cytochromen oder Eisen/Schwefel-Cluster involviert ist.

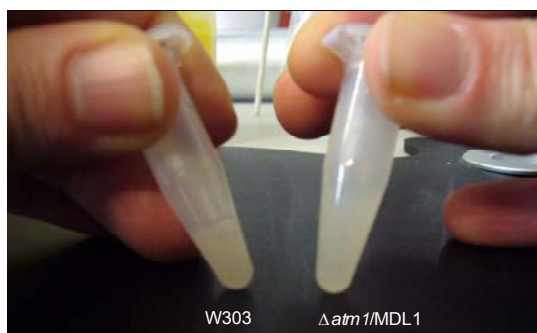


Abbildung 44 Farbunterschied von W303 und $\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien

Aus jeweils 2 L Kultur (W303 YEPGal, $\Delta atm1$ /MDL1 SCGal-HIS-TRP) wurden Mitochondrien isoliert und in SEM-Puffer aufgenommen (Proteinkonzentration 10 g/L). Präparierte Mitochondrien der W303 Hefen zeigen eine braune Färbung, wohingegen $\Delta atm1$ /MDL1 Hefen weiße, bzw. deutlich hellere, Mitochondrien besitzen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die ATPase Aktivität von gereinigtem ATM1 durch Cys-haltige Peptide stimuliert werden kann (Kuhnke *et al.*, 2006). Für MDL1 wurde bis heute keine Stimulation mit Hilfe verschiedener Cys-haltiger Peptide der Länge von 10 und 15 Aminosäure beobachtet (Daten nicht gezeigt, pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main).

Mitochondrien ohne funktionelles ATM1 zeigen eine deutliche Erhöhung des freien, nicht-hämgebundenen Eisengehaltes. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MDL1 in $\Delta atm1$ Zellen eine Verringerung dieser Eisenkonzentration von mehr als 50% bewirkt. Der Eisengehalt war im Vergleich zu Wildtyp-Zellen immer noch 8-fach höher (Chloupková *et al.*, 2003).

Um eine Verbindung zwischen dem Komplementationsverhalten von MDL1 und dem mitochondrialen Eisengehalt herstellen zu können, wurden Mitochondrien unterschiedlicher Hefestämme präpariert. Eine Verdopplung des Eisengehaltes für $\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien (Eisengehalt festgesetzt auf 100%) im Vergleich zu $\Delta atm1$ /MDL1+ATM1 Mitochondrien kann nur auf den Verlust von ATM1 und die Komplementation des $\Delta atm1$ Phänotyps durch MDL1 zurückgeführt werden. Ein leichter Anstieg der Eisenkonzentration ist zwischen Wildtyp- und $\Delta atm1$ /MDL1+ATM1 Mitochondrien zu erkennen. Kaum Veränderungen zeigen hingegen Mitochondrien des Wildtyp- und $\Delta atm1$ /ATM1 Hefestammes.

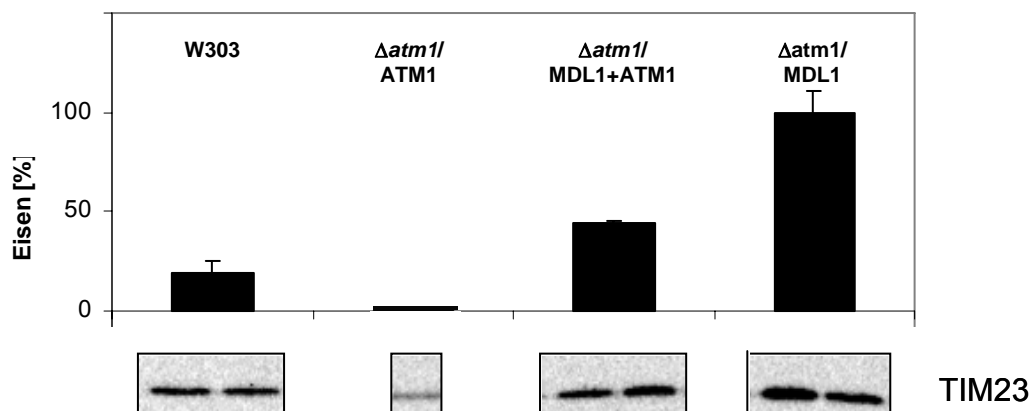


Abbildung 45 Freier, nicht-hämgebundener Eisengehalt in Abhängigkeit zur ATM1-Expression

Die Quantifizierung von Eisen in Mitochondrien (200 μ g Gesamtprotein) der Hefestämme W303, $\Delta atm1$ /ATM1, $\Delta atm1$ /ATM1+MDL1 und $\Delta atm1$ /MDL1 erfolgte wie beschrieben (Fish, 1988). $\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien zeigen einen drastischen Anstieg des prozentualen Eisens im Vergleich zu W303 und $\Delta atm1$ /ATM1+MDL1 Mitochondrien.

$\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien haben eine deutlich erhöhte Eisenkonzentration und die Farbe der Organellen ist heller als für Wildtyp-Mitochondrien beobachtet. Daraufhin wurden diese Mitochondrien auf das Vorhandensein der Atmungskettenkomplexe untersucht. Mit Hilfe der Blau Nativ Elektrophorese wurden Digitonin-solubilisierte

Mitochondrien (100 µg Gesamtprotein, Detergenz/Protein 6 g/g) der Stämme W303, $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ und $\Delta atm1/MDL1$ separiert. In $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien sind keinerlei Komplexe der Atmungskette zu erkennen, wohingegen Mitochondrien der Hefestämme W303 und $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ diese ausbilden. In *S. cerevisiae* liegen die Komplexe der Atmungskette als Superkomplexe vor. Die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) ist mit der Cytochrom c Reduktase (Komplex III) verbunden und kann drei unterschiedliche Formen ausbilden: den freien Dimerkomplex III (III_2 500 kDa), Superkomplex S_1 (III_2IV_1 750 kDa) und S_2 (III_2IV_2 1.000 kDa). Komplex IV (200 kDa) liegt nur in schwachen Konzentrationen vor. Der Großteil ist in den verschiedenen Superkomplexen gebunden. Komplex V tritt in Mitochondrien als *S. cerevisiae* als Monomer (V_M 600 kDa) und Dimer (V_D 1.250 kDa) auf.

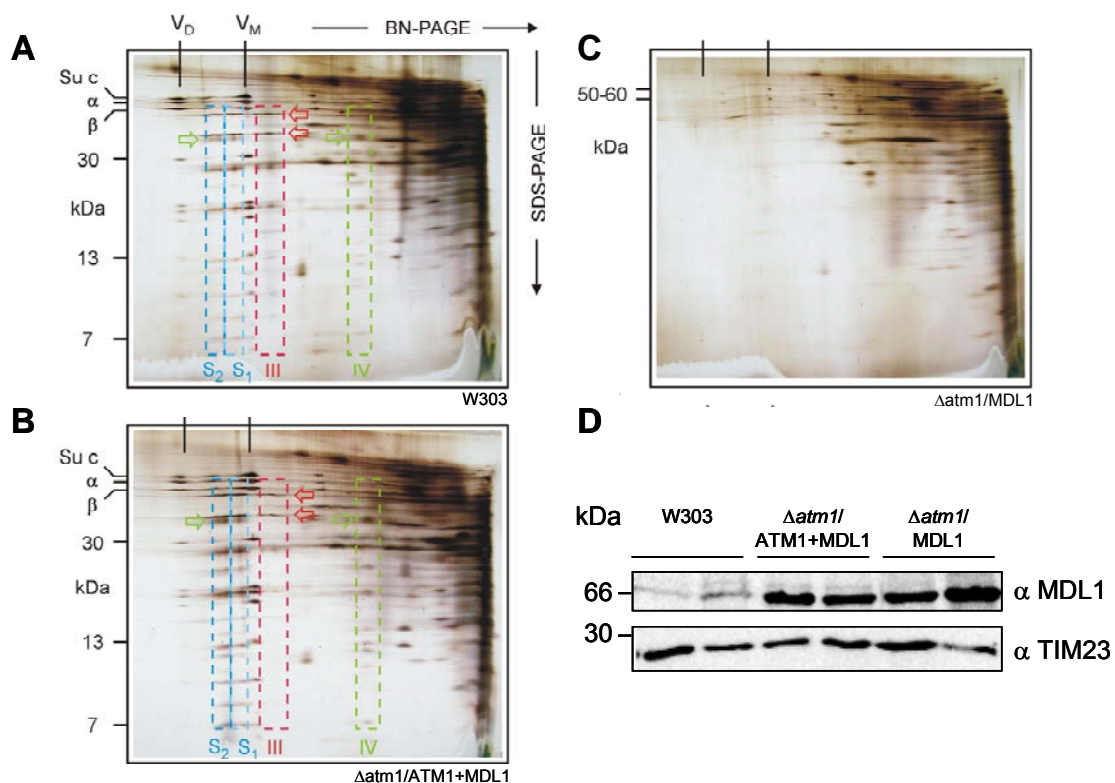


Abbildung 46 Isolierung des MDL1-Proteinkomplexen durch BN-PAGE

BN-PAGE von Mitochondrien der Hefestämme W303 (A), $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ (B) und $\Delta atm1/MDL1$ (C). Je 100 µg Gesamtprotein) wurden in 6 g/g Digitonin (Detergenz/Protein) solubilisiert. Die solubilisierten Atmungskettenkomplexe wurden in einen linearen 4 - 13% Acrylamidgel (BN-PAGE) und anschließend mit Hilfe eines 13% Trizin SDS-PAGE aufgetrennt. In *S. cerevisiae* treten konzentrationsabhängige Superkomplexe aus Komplex IV und III auf (S_1 : III_2IV_1 , S_2 : III_2IV_2). V_D und V_M bezeichnen die dimere, bzw. monomere, ATP-Synthase (Komplex V). \Rightarrow COX1, Untereinheit der Cytochrom c Oxidase, \Leftarrow die beiden Monomere des Komplex III. Interessanterweise treten keine Atmungskettenkomponenten in Mitochondrien des Hefestammes $\Delta atm1/MDL1$ auf. (D) Der Nachweis der Expression von MDL1 und dem ER-ständigen Markerprotein TIM23 durch Immundetektion wurde an jeweils zwei unabhängigen Mitochondrienpräparationen der Hefestämme W303, $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ und $\Delta atm1/MDL1$ vorgenommen.

Ein weiterer Beweis für das Fehlen der Atmungskettenkomplexe liefert die *in organello* Translation. Für Mitochondrien der Hefestämme W303, $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ und $\Delta atm1/MDL1$ können keinerlei Translationsprodukte nachgewiesen werden (pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main).

Die Morphologie der beschriebenen Mitochondrien wird mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Hefestämme W303, $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ und $\Delta atm1/MDL1$ analysiert. W303 Mitochondrien zeigen vorwiegend schlauchförmige Cristae. Manche dieser Cristae sind als kleine Kreise zu erkennen, da sie während der Präparation angeschnitten wurden. $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Mitochondrien besitzen eine längliche Morphologie, wobei in dieser Abbildung die Cristae vorwiegend der Länge nach angeschnitten wurden und sie somit scheibenförmig wirken. Mitochondrien des $\Delta atm1/MDL1$ Hefestammes zeigen meist nur die Matrix. Es sind nur sehr vereinzelt ringförmige Cristae-Strukturen zu erkennen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien zeigen sie eine komplett veränderte Morphologie.

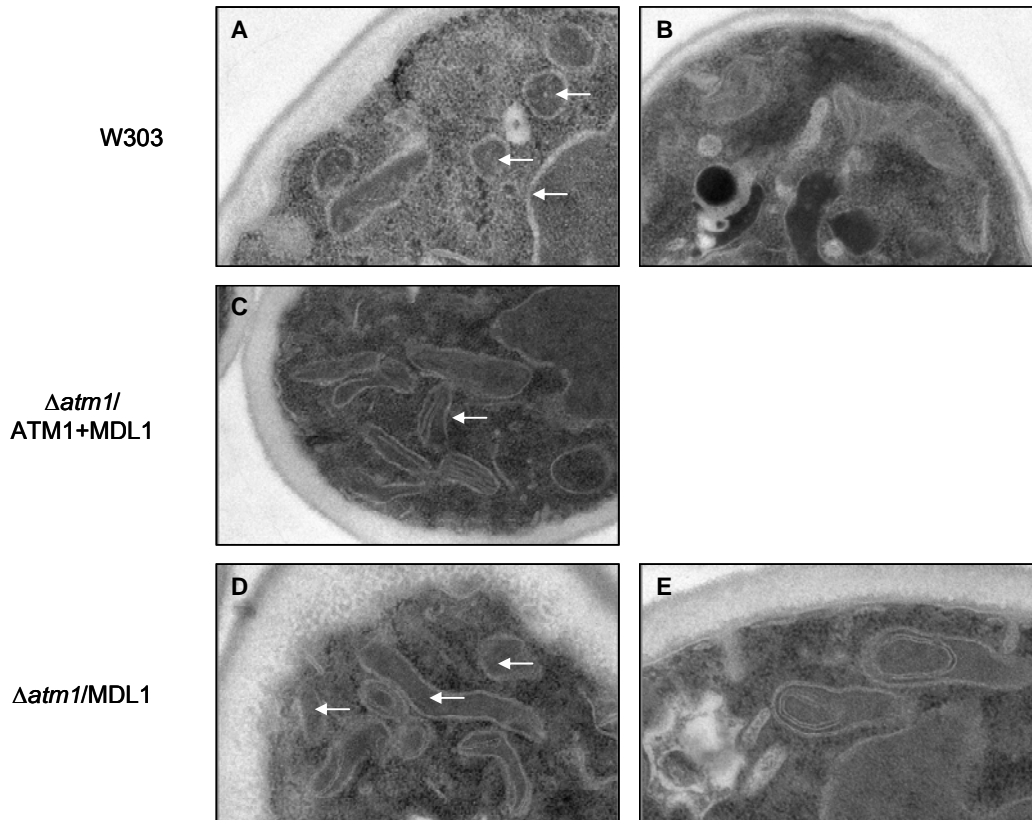


Abbildung 47 Vergleich der Mitochondrien-Morphologie versch. Hefestämme

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hefestämme W303 (A, B), $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ (C) und $\Delta atm1/MDL1$ (D, E). W303 Mitochondrien zeigen schlauchförmige Cristae (zu erkennen als kleine Kreise), $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Mitochondrien besitzen eine längliche Morphologie, und keine Cristae ist in Mitochondrien des $\Delta atm1/MDL1$ Hefestammes zu erkennen. $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien besitzen in Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine komplett veränderte Morphologie und beinhalten keine inneren mitochondrialen Membranen. Pfeile kennzeichnen die Charakteristika der Mitochondrien des jeweiligen Hefestammes.

Aufgrund der besonderen Charakteristika von $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien, dem Fehlen von Atmungskettenkomplexen und Cristae, bleibt die Frage offen, ob dies auf eine Depletion oder Deletion von mitochondrialer DNA zurückzuführen ist und es sich somit um ρ^- oder ρ^0 Hefen handelt. Fragmente der mitochondrial kodierten Gene COX1 und COX3 können aus der eingesetzten mtDNA der Hefestämme W303 und amplifiziert werden. Das Fehlen des Cytochrom b Genfragments in $\Delta atm1/MDL1$ Zellen könnte auf eine Deletion des DNA Bereiches zurückzuführen sein. In diesem Falle wären $\Delta atm1/MDL1$ Zellen mit ρ^- Zellen vergleichbar und es würde eine Depletion der mitochondrialen DNA im Bereich des Cyt b Gens (COB/Q0105 Koordinaten 36.540 – 43.647) vorliegen.

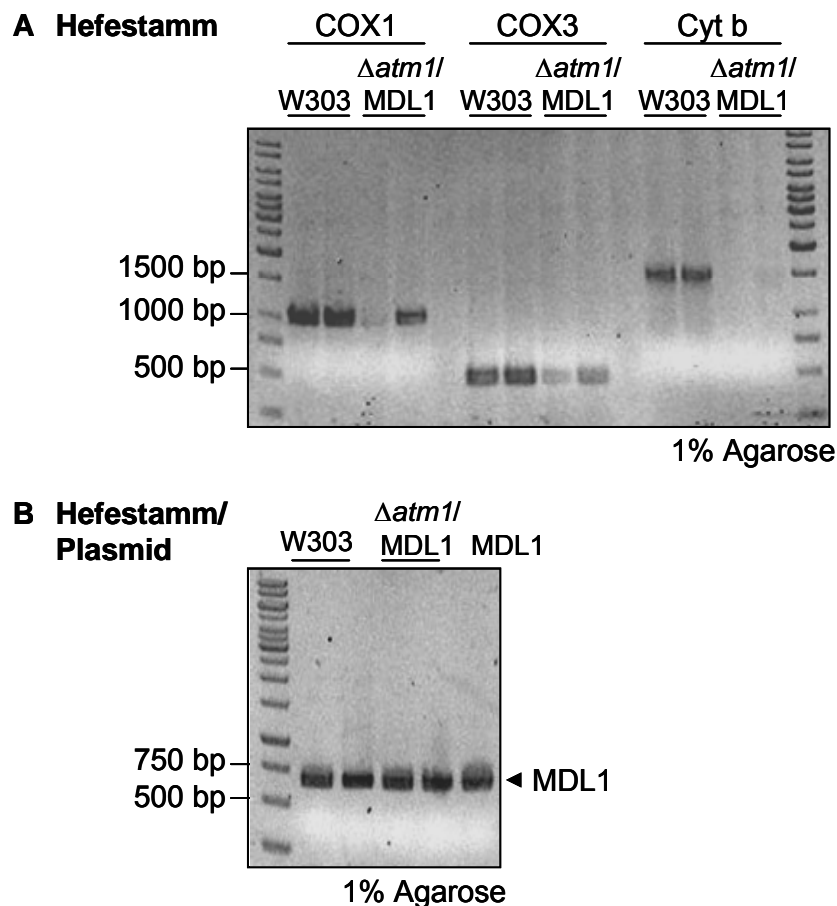


Abbildung 48 Amplifikation mitochondrial kodierter Genfragmente

(A) Amplifikation von PCR-Fragmenten der mitochondrial kodierten Gene Cytochrom b (1.488 Bp), COX1 (991 Bp) und COX3 (438 Bp). Für mitochondriale DNA aus den Hefestämmen W303 und *Δatm1/MDL1* können die PCR-Fragmente für COX1 und COX3 amplifiziert werden. Für Cyt b wird in *Δatm1/MDL1* Hefen keine Amplifikation erreicht. (B) Amplifikation eines PCR-Fragmentes für chromosomal kodiertes MDL1 (674 Bp). Beide Hefestämme und das eingesetzte MDL1-Plasmid dienten als Matrize für die Amplifikation. Die eingesetzte mitochondriale DNA besitzt anteilig chromosomale DNA. Alle PCR-Amplifikationen an mitochondrialer W303 und *Δatm1/MDL1* DNA wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Ein weiterer Hinweis für eine Schädigung mitochondrialer DNA der *Δatm1/MDL1* Zellen liefert die Rücktransformation des ATM1-Plasmids in diesen Hefestamm. Die resultierenden Zellen sind aufgrund ihres Wachstumsverhaltens nicht mit den ursprünglichen *Δatm1/MDL1*+ATM1 Zellen vergleichbar. Sie weisen in Anwesenheit von Galaktose eine extrem verlängerte Generationszeit von circa 48 Stunden, im Vergleich zu 2 – 3 Stunden, auf (Daten nicht gezeigt). Ebenso ist festzustellen, dass Wildtyp- und *Δatm1/MDL1*+ATM1 Hefen in SCD Medium ihre stationäre Phase bei einer OD_{600} von circa 10 erreichen. *Δatm1/MDL1* Zellen stellen hingegen unter vergleichbaren Bedingungen bei einer OD_{600} zwischen 3,5 und 4 ihre Zellteilung ein (Daten nicht gezeigt).

3.16. Funktionelles humanes Homolog von ATM1

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktives MDL1 zum Teil die Funktion von ATM1 übernehmen kann. In *Homo sapiens* wurden vier mitochondrialständige ABC-Transporter beschrieben: ABCB6, ABCB7, ABCB8 und ABCB10 (Dean *et al.*, 2001). Nach Identitätsvergleich gilt ABCB10 als Homolog von MDL1 (Identität 44%, Ähnlichkeit 61%, Abbildung 5, siehe 10.10.3). ABCB7 gilt als humanes ATM1-Homolog (Identität 49%, Ähnlichkeit 69%, Abbildung 5, siehe 10.10.3), welches den $\Delta atm1$ -Phänotyp aber nur zum Teil komplementieren kann (Csere *et al.*, 1998).

| | Länge [Basenpaare] | Identität | Ähnlichkeit |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| YLR188W, MDL1 | 695 | | |
| ABCB6 | 842 | 29% (TMD o.A.; NBD 40%) | 47% (TMD o.A.; NBD 59%) |
| ABCB7 | 752 | 30% (TMD o.A.; NBD 40%) | 49% (TMD o.A.; NBD 57%) |
| ABCB8 | 735 | 35% (TMD 29%; NBD 43%) | 55% (TMD 47%; NBD 65%) |
| ABCB10 | 735 | 44% (TMD 43%; NBD 46%) | 61% (TMD 63%; NBD 62%) |
| YMR301C, ATM1 | 694 | | |
| ABCB7 | 752 | 49% (TMD 48%; NBD 51%) | 69% (TMD 67%; NBD 71%) |

Tabelle 23 MDL1-Alignierung gegen humane mitochondriale ABC-Transporter

Die Alignierung wurde mit Hilfe *SIB BLAST Network Service* <http://expasy.org/tools/blast/> durchgeführt. Es wurde die Sequenz von MDL1 bzw. ATM1 aus *S. cerevisiae* gegen die in der Datenbank vorhandenen Proteine von *Homo sapiens* analysiert. Ebenso wurden die entsprechenden TMDs und NBDs analysiert.

Durch die *in vivo* Komplementation kann das funktionelle humane Homolog von MDL1 identifiziert werden. Hierzu wurden die vier Gene in den pRS424::GAL 1(a)/(b) Vektor integriert. Für ABCB8 wurde das Homolog aus *Mus musculus* verwendet. Nach der *in vivo* Komplementationsanalyse sind für das humane ATM1-Homolog ABCB7 nach circa vier Tagen Klone in Anwesenheit von 5-FOA sichtbar. Die Komplementation des $\Delta atm1$ Phänotyps durch das humane ABCB10 Protein dauert einige Tage länger. ABCB6 und ABCB8 können die Funktion von ATM1 nicht übernehmen.

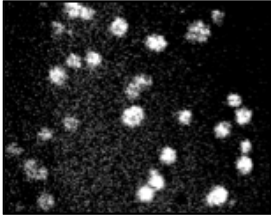
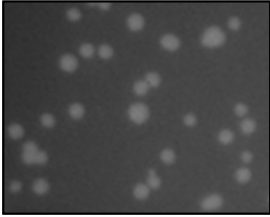
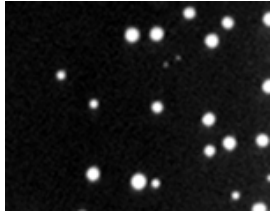
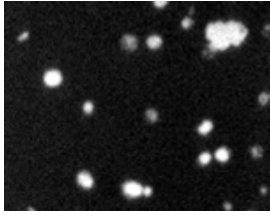
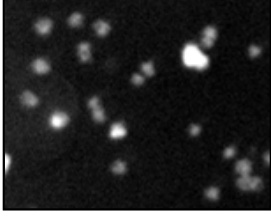
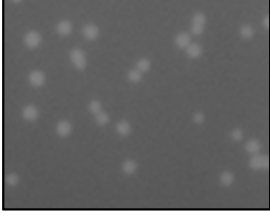
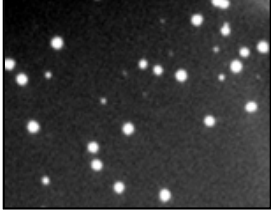
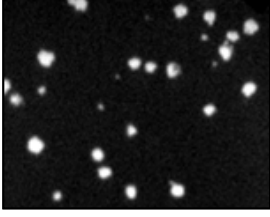
| Konstrukt | $\Delta atm1$ / ATM1+Konstr. | $\Delta atm1$ /Konstr. | Phänotyp |
|-----------|--|---|-------------------|
| hABCB6 |  |  | nicht lebensfähig |
| hABCB7 |  |  | lebensfähig |
| mABCB8 |  |  | nicht lebensfähig |
| hABCB10 |  |  | lebensfähig |

Abbildung 49 *In vivo* Komplementation mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern

Die Gene der humanen ABC-Transporter ABCB6, ABCB7, ABCB10 und ABCB8 aus *Mus musculus* wurden in den Vektor pRS424::GAL1(a)/(b) integriert und in Hefen des Stammes DKY223 ($\Delta atm1$ /ATM1) transformiert. Durch Gendeletion mittels 5-FOA wurden $\Delta atm1$ Zellen erhalten, die auf ihr Komplementationsverhalten des entsprechenden vorhandenen plasmidständigen ABC-Transporters untersucht wurden.

3.17. Funktionelles MDL1-Homolog aus *Podospora anserina*

In *Podospora anserina* wurden mittels Sequenzalignierung Homologe der mitochondrialen ABC-Transporter MDL1, MDL2 und ATM1 vorhergesagt (Tabelle 24, Abbildung 5). Für MDL2 aus *S. cerevisiae* konnte nur ein homologes *P. anserina* Protein identifiziert werden, welches eine Sequenzidentität von 25% besitzt. Die Homologen von MDL1 und ATM1 besitzen hingegen Sequenzidentitäten zwischen 48% und 61%.

| Alignierung von <i>P. anserina</i> Protein | gegen | Identität | Ähnlichkeit |
|--|------------------|-----------|-------------|
| Pa_2_9660, SC_A_chrm2.seq: 3444179..3446605 | YLR188W, MDL1 | 48% | 64% |
| Pa_3_7490, SC_B_chrm3.seq: 1977864..1980110 | YPL270W, MDL2 | 25% | 42% |
| Pa_5_7360, SC_E_chrm5.seq: 343712..346046 | YMR301C, ATM1 | 61% | 77% |

Tabelle 24 Sequenzalignierung von *P. anserina* Proteinen gegen MDL1, MDL2 und ATM1

Die Alignierung wurde mit Hilfe SIB BLAST Network Service <http://expasy.org/tools/blast/> durchgeführt. Es wurde die entsprechenden Sequenz aus *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr>) gegen MDL1, MDL2 bzw. ATM1 analysiert.

Mitochondrien spielen als zellulärer Kupferspeicher eine große Rolle, da Kupfer als Kofaktor diverser Enzyme (z.B. Cu/Zn-Superoxid-Dismutase, Cytochrom Oxidase) ein essentielles Spurenelement darstellt. Die Eigenschaften der leichten Elektronenaufnahme bzw. -abgabe machen Kupfer zu einem idealen Kofaktor der Katalyse von Redoxreaktionen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Kupfer aber auch sehr gefährlich, da durch die Elektronenübertragung auf Sauerstoff eine Reihe reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) entstehen, vor allem das hochgiftige Hydroxylradikal (OH), dass für die Zerstörung aller Arten von Biomolekülen, einschließlich Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden verantwortlich ist. Aus diesem Grund liegt Kupfer innerhalb der Zelle vorwiegend in proteingebundener Form vor und die Kupferaufnahme und -weitergabe ist streng reguliert (Cervantes und Gutierrez-Corona, 1994; Cobine *et al.*, 2004; Dameron und Harrison, 1998). Eine mögliche Verbindung zwischen zellulär verfügbaren Kupferkonzentrationen und Zellalterung wird in *P. anserina* untersucht. Dies ist ein filamentöser Pilz, der zu der Klasse der *Ascomyceten* gehört. Er hat nur eine kurze Lebensspanne von wenigen Wochen, die sowohl von genetischen als auch durch Umweltfaktoren beeinflusst wird. Es existieren eine Reihe verschiedener langlebiger Mutanten, von denen einige unsterblich zu sein scheinen. Untersuchungen belegen für Mitochondrien und deren Energietransduktion eine besondere Rolle innerhalb des Alterungsprozesses. Während der mitochondrialen ATP-Synthese führen Elektronentransportprozesse innerhalb der IMM zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die zu molekularen Schädigungen und schließlich zur Seneszenz führen. Die langlebige *P. anserina* Mutante *grisea* zeichnet sich durch eine 60% verlängerte Lebensspanne aus (Prillinger und Esser, 1977). Aufgrund einer Mutation im *Grisea* Gen ist der

Transkriptionsfaktor GRISEA nicht vorhanden und PaCTR3 wird nicht translatiert. PaCTR3 kodiert für einen hochaffinen Kupfertransporter, der auch in Anwesenheit geringer Kupferkonzentrationen eine effiziente Translokation über die Plasmamembran gewährleistet. Durch die nicht letale PaCTR3 Deletion kommt es zu einem zellulären Kupfermangel und zu einer Aktivitätseinschränkung der Cytochrom c Oxidase (Borghouts *et al.*, 2001; Esser und Keller, 1976; Prillinger und Esser, 1977). Dadurch ist der Kupfertransport in die Mitochondrien und die Kupferionen benötigende Assemblierung des Komplexes VI gestört. Vergleichbar zu Hefe und anderen Systeme scheint dieser Prozess in Verbindung mit kupferbindenden Chaperone zu stehen, die Kupfer direkt nach Zelleintritt binden. In Hefe sind yCOX17, ySCOI und sicherlich yCOX11 in diesen Prozess eingebunden (Glerum *et al.*, 1996a; Glerum *et al.*, 1996b; Hiser *et al.*, 2000; Lode *et al.*, 2000). In *P. anserina* wurde das Homolog PaCOX17 gefunden, das Kupfer in den Innenmembranraum des Mitochondriums transportiert. Von dort aus wird Kupfer an die kupferbindenden Untereinheiten COXI und COXII des Komplexes IV weitergegeben. Da es sich hier ATP-erzeugenden Prozess handelt, sollte ein Defekt innerhalb des Kupfertransports in die Mitochondrien letal sein. *P. anserina* induziert in diesem Falle eine alternative Oxidase (PaAOX), die Eisen statt Kupfer als Kofaktor nutzt (Borghouts *et al.*, 2001). Der alternative Weg führt zu einer geringeren ATP und somit ROS-Konzentrationen, da AOX dem Komplex III direkt vorgeschaltet ist und das Membranpotential komplett durch Komplex I aufrechterhalten werden muss. Sekundär treten weniger ROS induzierte zelluläre Schädigungen auf: eine mögliche Ursache der beobachteten Lebensverlängerung (Dufour *et al.*, 2000).

Durch *in vivo* Komplementation kann das funktionelle Homolog von MDL1 (Pa_MDL1, Pa_2_9660) aus *P. anserina* identifiziert werden. Hierzu wurden die drei Pilz-Homologen zu MDL1, MDL2 und ATM1 (Pa_2_9660, Pa_3_7490, Pa_5_7360) in den pRS424::GAL1(a)/(b) Vektor integriert. Die Sequenzidentitäten von ATM1 aus *P. anserina* und *S. cerevisiae* stehen in direkter Nachbarschaft zueinander (Abbildung 5, Tabelle 24). Innerhalb des Komplementationsversuches kann Pa_ATM1(Pa_5_7360) die Funktion des Hefetransporters übernehmen, wodurch die resultierenden Hefen $\Delta atm1/Pa_ATM1$ in Anwesenheit von 5-FOA lebensfähig sind. Auch die MDL1-Sequenzen der beiden Organismen zeigen hohe Homologien zueinander (Identität 48%, Ähnlichkeit 64%) (Abbildung 5, Tabelle 24).

Pa_MDL1(Pa_2_9660) kann zum Teil die Funktion von ATM1 aus *S. cerevisiae* übernehmen. Für MDL2(Pa_3_7490) aus *P. anserina* kann hingegen kein Komplementationsverhalten beobachtet werden. Der Wachstumsphänotyp von $\Delta atm1$ Hefen wird am stärksten durch Pa_ATM1(Pa_5_7360) aus *P. anserina* komplementiert. Nach circa vier Tagen sind Klone in Anwesenheit von 5-FOA sichtbar. Die Komplementation durch Pa_MDL1(Pa_2_9660) dauert deutlich länger. Erst nach circa sieben Tagen kann eine Aussage über das Wachstumsverhalten von $\Delta atm1$ /Pa_MDL1(Pa_2_9660) und $\Delta atm1$ /Pa_MDL2(Pa_3_7490) Hefen getroffen werden.

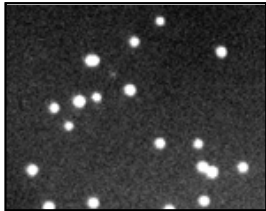
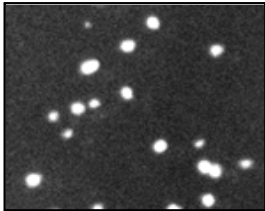


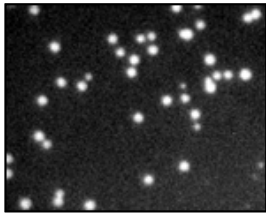
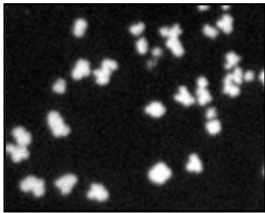
| Konstrukt | $\Delta atm1$ / ATM1+Konstr. | $\Delta atm1$ /Konstr. | Phänotyp |
|------------------------|---|--|----------------------|
| Pa_MDL1 (Pa_2_9660) |  |  | lebensfähig |
| Pa_MDL2 (Pa_3_7490) |  |  | nicht lebensfähig |
| Pa_ATM1 (Pa_5_7360) |  |  | lebensfähig |

Abbildung 50 *In vivo* Komplementation MDL1, MDL2 und ATM1 Homologe aus *P. anserina*

Die Gene der MDL1, MDL2 und ATM1 Homologen aus *P. anserina* (Pa) wurden über neu generierte Schnittstellen in den Vektor pRS424::GAL1(a)/(b) integriert und in Hefen des Stammes DKY223 ($\Delta atm1$ /ATM1) transformiert. Durch *in vivo* Komplementationsanalyse mittels 5-FOA wurden $\Delta atm1$ Zellen erhalten, die auf ihr Komplementationsverhalten durch den vorhandenen plasmidständigen ABC-Transporter untersucht wurden.

4. Diskussion

Mitochondriale ABC-Transporter sind aufgrund der Morphologie des Zellorganells ein schwieriges Forschungsobjekt. Durch die „Zwei-Membranen-Architektur“ sind Exportprozesse schwierig zu analysieren. Die Innenmembranen von Mitochondrien und Chloroplasten sind die einzigen zellulären Membranen, die nicht in direkter Verbindung mit dem Zytosol stehen. Der ausschließlich zytosolisch lokalisierte Ubiquitin/Protease-Abbaumechanismus kann somit nicht verwendet werden. Die Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine wird über die ATP-abhängigen AAA Proteasen vorgenommen. Diese bauen falsch oder ungefaltete mitochondriale Membranproteine zu kleinen Peptidfragmenten ab (Arnold und Langer, 2002; Langer *et al.*, 2001).

MDL1, ein ABC-Transporter der mitochondrialen Innenmembran, ist involviert Abbauprodukte der m-AAA Protease in den Intermembranraum zu transportieren (Young *et al.*, 2001). In dem Organismus *S. cerevisiae* wird MDL1 nur in geringen Konzentrationen exprimiert (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Durch *microarray* Analysen wurde gezeigt, dass eine Zelle circa 1.000 Moleküle MDL1 enthält, wogegen für die F_1F_0 -ATPase α -Untereinheit circa 41.500 Moleküle pro Zelle identifiziert wurden (www.yeastgfp.uscf.edu). Der Expressionsvergleich von intrinsischem MDL1 und der gereinigter MDL1-NBD zeigte, dass MDL1 circa 0,01 – 0,1% aller mitochondrialen Proteine ausmacht. Aufgrund der geringen MDL1-Expressionsrate im homologen Organismus wurde versucht den ABC-Transporter in Prokaryonten zu überexprimieren. Hierzu wurde MDL1 durch den Einsatz spezifischer Restriktionsschnittstellen systematisch in drei Kassetten unterteilt. Durch Austausch einzelner Kassetten können Mutationen, N- und C-terminale *Tags* und eine Deletion der mitochondrialen Leitsequenz schneller in verschiedenen Konstrukten integriert werden. Weder in dem gram-negativen Bakterium *E. coli*, noch in dem gram-positiven Bakterium *L. lactis* wird eine MDL1-Überexpression erreicht.

□ In einem systematischen Ansatz wurden die Überexpression in verschiedenen *E. coli* Stämme untersucht. Ebenso wurde das *MDL1*-Gen ohne die mitochondriale Leitsequenz in verschiedene Vektoren integriert und deren Überexpression in Abhängigkeit der Plasmid-Kopienzahl, der verwendeten Promotoren, der transformierten *E. coli* Stämme, der Wachstumstemperatur und unterschiedlicher Induktionsbedingungen bestimmt. Weiterhin wurde MDL1 mit Komponenten der bakteriellen Proteintranslokationsmaschinerie (SecY, SecE, SecG, YidC) und in

Anwesenheit von selten vorkommenden tRNAs koexprimiert. Auch die Anwendung von Hitzeschock und der Gebrauch hoher Ethanol- und Sorbitol-Konzentration um durch eine herbeigeführte Stresssituation die Konzentration von Chaperonen zu erhöhen, führen zu keiner signifikanten MDL1-Überexpression. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen beträgt die MDL1-Konzentration 0,005% aller Membranproteine und ist somit im Vergleich mit der intrinsischen MDL1-Konzentration im homologen System circa 20-fach verringert.

□ Es wurde gezeigt, dass *L. lactis* ein ideales System zur Überexpression mitochondrialer Proteine darstellt (Kunji *et al.*, 2003). Eine Überexpression von MDL1 unter der Kontrolle des Nisin induzierbaren Promotors ist nicht möglich. Optimierte Expressionsbedingungen führen zu einer MDL1-Konzentration, die 0,01% aller Membranproteine entspricht. In dem Organismus *L. lactis* wird somit eine 10-fach verringerte Expression im Vergleich zu intrinsischem MDL1 des homologen Organismus *S. cerevisiae* erhalten.

Der Grund einer ausbleibenden Überexpression ist bis heute unbekannt, die unterschiedliche Lipidzusammensetzung im Vergleich zu der mitochondrialen Innenmembran könnte eine Rolle spielen. In Eukaryonten gilt Cardiolipin beispielsweise als essentielle Komponente für den funktionellen Einbau mitochondrialer Membranproteine, z.B. für den Cytochrom bc1 Komplex (Lange *et al.*, 2001). In den eingesetzten Expressionssystemen *E. coli* und *L. lactis* ist dieses stickstofffreie Phospholipid nicht vorhanden. Ebenso könnte die Deletion der vorhergesagten mitochondrialen Leitsequenz negativen Einfluss auf eine Überexpression ausüben. ATM1 kann heterolog in *E. coli* überexprimiert werden und liegt in Konzentrationen von 0,4 bis 1 mg/L Kultur vor (Kuhnke *et al.*, 2006). Vergleichbare Experimente für MDL1 zeigen keinen Anstieg der MDL1-Konzentration (pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J.W.-Goethe Universität Frankfurt/Main).

Interessanterweise kann auch durch homologe plasmidgetriebene Expression in Anwesenheit starker konstitutiver Promotoren die MDL1-Konzentration nicht signifikant erhöht werden. Da über eine längere Zeitdauer induzierte Zellen keinen Phänotyp aufweisen und ihr Wachstumsverhalten zu Wildtyp-Zellen keine signifikanten Unterschiede zeigt, wird davon ausgegangen, dass eine Induktion über den konstitutiven Promotor keine toxischen Auswirkungen hat. Aus welchem Grund keine Überexpression erhalten werden kann, ist bis heute unklar. Vergleichbare

Ergebnisse werden mit dem Protein *AtATM2*, einem ATM1-Homologe aus *Arabidopsis*, erhalten. Plasmidständiges konstitutiv exprimiertes *AtATM2* verhält sich in *E. coli* und Hefe toxisch. Dieser Sachverhalt kann durch Expression des *GAL1*-Promotors verhindert werden (Chen *et al.*, 2007).

Einzig der induzierbare *GAL1*-Promotor bewirkt eine spezifische 10 bis 100-fache Proteinüberexpression in der Hefe *S. cerevisiae*. Eine Induktion von mehr als zwölf Stunden führt zu einer Abnahme der MDL1-Konzentration. Dies könnte darauf hindeuten, dass die MDL1-Expression über eine längere Zeitdauer von den Zellen nicht toleriert und das Protein abgebaut wird. Die Konzentrationsabnahme ist aber nicht auf eine verminderte Transkriptionsrate zurückzuführen. Ebenso zeigen Hefen, die für eine längere Zeit zur Proteinexpression angeregt werden, keinen signifikanten Phänotyp, einzig die zeitabhängige Proteinabnahme. Eine Toxizität durch die MDL1-Überexpression wird somit ausgeschlossen.

Die Ermittlung erster biochemischer Daten setzt den Einsatz von gereinigtem Protein voraus. Überexprimiertes MDL1 wird mittels immobilisierter Metallchelataffinitätschromatografie gereinigt. Die spezifische ATPase Aktivität für solubilisiertes MDL1 aus präparierten Mitochondrien wird mit einer maximalen Geschwindigkeit von $2,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert liegt etwas höher als für die Mehrzahl anderer ABC-Transporter, wie z.B. MRP ($0,46 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Chang *et al.*, 1997), MsbA ($0,04 - 0,15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Doerrler und Raetz, 2002) oder BmrA ($1,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Ravaud *et al.*, 2006). Die MDL1-spezifische Wechselzahl wird mit einem Wert von 156min^{-1} bestimmt. In diesem Falle wird nur für den mitochondriale ABC-Transporter ATM1 ein ähnlich hoher Wert festgestellt. ATM1 besitzt einen Wechselzahl von 127min^{-1} ($v_{\text{max}} 1,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Kuhnke *et al.*, 2006). Aufgrund der hohen ATPase Aktivität des solubilisierten ABC-Transporters MDL1 wird davon ausgegangen, dass das solubilierte Protein in einem aktiven Zustand gereinigt werden kann. Eventuell ist die hohe Aktivität auf die Bindung ATPase stimulierender Faktoren wie das MDL1-spezifische Substrat oder spezieller Lipide (z.B. Cardiolipin) zurückzuführen. Diese potentiellen Bindungspartner könnten generell an dem Protein assoziiert vorliegen und die Prozedur der Proteinreinigung überdauern. Bis heute wurde kein solcher Bindepartner charakterisiert. Der aktive Zustand des gereinigten Proteins wird durch nicht vorhandene ATPase Aktivität der Mutanten E599Q und H631A unterstützt. Beide Mutanten greifen in die ATP-

Hydrolyse der Nukleotidbindedomänen ein (Janas *et al.*, 2003). Durch Mutationen der katalytischen Basen (E599Q, H631A) kommt es zu einer Inhibition der ATP-Hydrolyse (Zaitseva *et al.*, 2005a), wobei eine ATP-Bindung aber gewährleistet ist. Vergleichbar zu dem vollständigen Transporter wird für die MDL1-NBD(E599Q) eine circa 3.000-fach verringerte ATP-Hydrolyserate ermittelt (Janas *et al.*, 2003). Durch die kaum vorhandene ATPase Aktivität der MDL1-Mutanten werden Kontaminationen mit anderen ATPasen nach Proteinreinigung ausgeschlossen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mutanten des vollständigen Proteins ein ähnliches Verhalten wie innerhalb der isolierten Nukleotidbindedomäne zeigen und dass die ermittelten ATPase Aktivitäten MDL1-spezifisch sind. Vergleichbare ATPase Werte der NBD und des vollständigen Proteins zeigen, dass MDL1 vollständiger Länge bei gleicher Proteinkonzentration deutlich aktiver ist. Ebenso ist die Aktivität der isolierten NBDs konzentrationsabhängig, wohingegen das Wildtyp-Protein davon unbeeinflusst ist. Innerhalb des Proteinkomplexes ist die Assoziationsrate der NBDs (Dimerbildung) nicht der geschwindigkeitslimitierend Schritt der ATP Hydrolyse. Dies wird eventuell dadurch erreicht, dass die NBDs in direkter Nachbarschaft liegen und somit eine hohe lokale Konzentration aufweisen.

Der Hauptanteil aller mitochondrialen Proteine wird durch freie zytosolische Ribosomen synthetisiert. Diese Proteine werden als Vorläuferproteine in das Zytoplasma abgegeben und daraufhin posttranslational in die Mitochondrien importiert (Lill *et al.*, 1996; Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 1997; Schatz und Dobberstein, 1996). Die Vorläuferproteine besitzen eine charakteristische N-terminale MTS von 20 bis 35 Aminosäuren Länge (Neupert, 1997). Ihre Primärsequenz ist sehr ungewöhnlich und besteht aus einer Vielzahl basischer, hydrophober und hydroxylierter Reste, verzichtet aber generell auf die Anwesenheit saurer Aminosäuren (Schatz und Dobberstein, 1996). Mittels N-terminaler Sequenzierung des gereinigten prozessierten Proteins wird eine ungewöhnlich lange Leitsequenz von 59 Aminosäuren identifiziert, die für den posttranslationalen Proteinimport verantwortlich ist. Diese wird nach Transport in die Matrix entfernt. Zusätzlich findet eine enzymatische Deamidation des neu generierten N-terminalen Glutamins an Position 60, möglicherweise durch eine mitochondriale N-terminale Amidase, statt. Bis heute wurden solche Modifikationen nur für zytosolische (*N-end rule pathway*) (Baker und Varshavsky, 1995) und die beiden mitochondrialen Proteine, TIM44 (Weiss *et al.*, 1999) und COX4 (Maarse *et al.*, 1984), dargestellt.

Das MDL1-Homolog ABC-me (ABCB10) aus *Mus musculus* (Abbildung 5) weist ebenfalls lange mitochondriale Vorläufersequenzen, von 105 Aminosäuren Länge aus (Graf *et al.*, 2004).

Membrantopologievorhersage-Algorithmen schlagen für den ABC-Transporter MDL1 fünf oder sechs Transmembranhelices vor. Der N-Terminus des reifen Proteins beinhaltet eine hohe positive Ladung, was für seine Lokalisation in der mitochondrialen Matrix spricht. Gleichzeitig bestätigen differentielle Zentrifugations- und Proteasezugänglichkeitsexperimente an präparierten Mitochondrien, Mitoplasten und invertierten Innenmembranvesikeln, mitochondriale Lokalisation des Proteins und matrixständige Orientierung der C-terminalen Nukleotidbindedomänen. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass der ABC-Exporter MDL1 aus einer geraden Anzahl von Transmembranhelices besteht, deren N- und C-Terminus innerhalb der Matrix liegen. Im Hinblick auf die Membrantopologievorhersage-Algorithmen wird somit von sechs Transmembranhelices ausgegangen.

Im Gegensatz zu dem vollständigen Protein, das auch nach Überexpression in die Mitochondrien importiert wird, kann durch differentielle Zentrifugation und Immunogold-Markierung gezeigt werden, dass MDL1(60-695) ausschließlich in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums vorliegt. Proteasezugänglichkeitsexperimente zeigen, dass die Nukleotidbindedomänen des ER-ständigen Transporters zytosolisch orientiert sind. Somit können MDL1(60-695) exprimierende ER-Membranen ein einfacheres System darstellen, um die Substratspezifität mittels Aufnahme-Experimenten zu untersuchen. Die Lokalisation beider MDL1 Varianten, MDL1 und MDL1(60-695), bleibt unbeeinflusst von der Anwesenheit zusätzlicher N- oder C-terminaler His-Tags.

Innerhalb dieser Arbeit werden vollständiges MDL1 und MDL1(60-695) näher charakterisiert. Beide Proteine bilden homooligomere Komplexe von circa 400 kDa und können mittels immobilisierter Metallchelataffinitätschromatografie aus den entsprechenden Digitonin-solubilisierten Organellen bzw. Gesamtmembranen gereinigt werden. Sie zeigen vergleichbare ATPase Aktivitäten mit Werten für $K_{M,ATP}$ von 120 μ M und 200 μ M und k_{cat} von 74 ATP/min und 77 ATP/min (pro MDL1 Monomer). Die erhaltenen biochemischen Daten zeigen, dass die mitochondrial oder ER-ständigen MDL1-Komplexe funktionell vergleichbar sind und beide MDL1 Varianten korrekt gefaltet vorliegen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, ob und in welchem Maße deren TMDs durch die Lipidzusammensetzung der jeweiligen

Membranen beeinflusst werden. Die ermittelten ATPase Aktivitäten der vollständigen MDL1-Transportkomplexe liegen in Übereinstimmung mit den Daten der gereinigten MDL1-NBD (Janas *et al.*, 2003). In Anwesenheit höherer Proteinkonzentration der Nukleotidbindedomäne wurde ein $K_{M,ATP}$ von 600 μM und eine Wechselzahl von 25 ATP/min (pro Monomer) bestimmt. Beide MDL1-Proteine reagieren sensitiv auf die Anwesenheit des ABC-Protein Inhibitors ortho-Vanadat mit vergleichbaren IC_{50} -Werten (MDL1 0,86 mM, MDL1(60-695) 1,1 mM). Dieses Verhalten wurde ebenso für die ABC-Transporter TAP1/2 (Gorbulev *et al.*, 2001) und P-gp (Urbatsch *et al.*, 1995a; Urbatsch *et al.*, 1995b) beschrieben.

Die Untersuchung der Substratspezifität von Peptidexportern wie MDL1 stellt ein generelles Problem dar. Die Substratbindestelle und die Nukleotidbindedomänen sind nicht direkt für Substrat und ATP zugänglich. Ebenso müssen ATP, markiertes Substrat und eventuell benötigte Inhibitoren in der mitochondrialen Matrix vorhanden sein, um eine Exportreaktion beobachten zu können. Diese Komponenten und deren Konzentration kann von außen nicht beeinflusst werden. Auch kann eine anschließende zytosolische Prozessierung der exportierten Peptide durch Proteasen nicht ausgeschlossen werden. Die MDL1(60-695)-Überexpression innerhalb der ER-Membranen stellt ein geeignetes System zur Charakterisierung der Substratspezifität und Funktion des ABC-Transporters dar. Da in diesem Fall die C-terminalen Nukleotidbindedomänen zytosolisch lokalisiert vorliegen kann eine Substrataufnahme untersucht werden. Bis heute wurde nur ein Transporter innerhalb der ER-Membranen identifiziert. YLL048c transportiert Gallensäure in Vakuolen und sekretorische Vesikel (Ortiz *et al.*, 1997) und fungiert als spezifischer Peptidexporter des Endoplasmatischen Retikulums in *S. cerevisiae* (Janas, 2002). Der Verlust der Peptidaufnahme in $\Delta yll048c$ Hefen kann durch Transformation von plasmidständigem YLL048c wiederhergestellt werden (Janas, 2002). Um einen YLL048c spezifischen Effekt auf Peptidaufnahme durch MDL1 zu unterbinden, wird plasmidständiges MDL1(60-695) in $\Delta yll048c$ Hefen exprimiert. Gleichzeitig werden Wildtyp- und untransformierten $\Delta yll048c$ Hefen für Transport-Experimente eingesetzt. Bis heute kann keine spezifische Transportaktivität, weder für MDL1(60-695) exprimierende Mikrosomen, noch für MDL1 enthaltende invertierte Innenmembranvesikel, nachgewiesen werden.

-
- Peptidbibliotheken verschiedener Länge (X_n , $n = 5 - 23$ Aminosäuren) wurden bereits für die Charakterisierung der Substratspezifität anderer pro- und eukaryotischer Peptidtransporter eingesetzt (Detmers *et al.*, 2000; Doeven *et al.*, 2004; Uebel *et al.*, 1999; Wolters *et al.*, 2005). Im Fall von MDL1 kann keine Aufnahme radioaktiv markierter Peptide nachgewiesen werden.
 - RRYQKSTEL gilt als spezifisches Peptid des homologen TAP1/2 Transportkomplexes (Uebel *et al.*, 1997b). Dieses Peptid kann nicht spezifisch durch MDL1 in das Lumen des ER, bzw. die Mikrosomen, transportiert werden. Wodurch eine Überlappung der Spezifität der Transportfunktionen von TAP1/2 und MDL1 unwahrscheinlich wird.
 - Ein Peptidfragment der mitochondrial kodierten Untereinheit der Cytochrom c Oxidase, COX1, wird in den MHC1 Komplexen an der Zelloberfläche von Säugerzellen präsentiert (Fischer Lindahl *et al.*, 1991). Hierzu müssen diese kleinen Antigene aus der mitochondrialen Matrix in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transportiert werden. Dies war ein Grund für die Annahme, dass ein ähnlicher Transportweg in dem Immunsystem-defizienten Organismus *S. cerevisiae* existieren könnte. Auch für Peptidfragmente unterschiedlicher Länge (7, 9, 12 Aminosäuren) der Cytochrom c Oxidase kann keine MDL1-spezifische Transportaktivität nachgewiesen werden.
 - Des Weiteren wurde [^{14}C] Aminolävulinat als Substrat überprüft. Es wird vermutet, dass MDL1 für den Export von Zwischenprodukten der Hämbiosynthese verantwortlich ist (Shirihai *et al.*, 2000). Auch hier kann keine MDL1-spezifische Aufnahme in IMVs oder Membranen des ER beobachtet werden.
 - MDL1 wurde durch eine indirekten experimentelle Methode als Peptidexporter charakterisiert (Young *et al.*, 2001). Peptide, die z.B. aus Komplexen der Atmungskette stammen, werden durch MDL1 in den Intermembranraum transportiert. Mit Hilfe von *in organello* Translationsexperimente kann das potentielle MDL1-spezifische Substrat in seiner natürlichen Umgebung in Anwesenheit von [^{35}S] Methionin synthetisiert werden. Durch Gelfiltration des mitochondrialen Überstandes nach *in organello* Translation werden Abbauprodukte eines Molekulargewichtsbereiches zwischen 600 und 2.000 Dalton gefunden. Isolierte Mitochondrien des $\Delta mdl1$ Deletionsstammes zeigen einen reduzierten Export radioaktiven Materials in dem erwarteten Molekulargewichtsbereich. Der Einsatz exportierten radioaktiven Materials aus Wildtyp- oder MDL1 überexprimierenden

Mitochondrien, bzw. der Inhalt nach *in organello* Translation durch Ultraschall zerstörte $\Delta md11$ Mitochondrien, zeigt keine Anreicherung von radioaktivem Material innerhalb der ER- oder invertierten Innenmembranvesikeln.

Trotz intensiver Studien in Anwesenheit verschiedener Peptidbibliotheken, Peptide und zellulärer Substanzgemische konnte keine MDL1-spezifische Transportaktivität in ER-Membranen oder invertierten Innenmembranvesikeln nachwiesen werden.

Die ATPase Aktivitäten verschiedener ABC-Transporter kann durch die Zugabe des potentiellen Substrates gesteigert werden. Der mitochondriale ABC-Transporter ATM1 zeigt beispielsweise eine erhöhte ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von Cys-haltigen Peptiden (Kuhnke *et al.*, 2006). Für MDL1 können keine vergleichbaren Ergebnisse in Anwesenheit verschiedener Cys-haltiger Peptide zwischen 10 und 15 Aminosäuren Länge beobachtet werden. Kürzlich wurde publiziert, dass Thiol-haltige Moleküle via ATM1 in das ER-Lumen transportiert und anschließend durch ERV1 oxidiert werden. Diese Schritte sind für die Reifung der zytosolisch und kernlokalisierten Eisen/Schwefel-Proteine essentiell (Kuhnke *et al.*, 2006). Eine funktionelle Überschneidung zwischen ATM1 und MDL1 im Hinblick auf den Transport Thiol-haltiger Peptide erscheint somit unwahrscheinlich.

Alle MDL1-spezifischen ATPase Aktivitätsmessungen erfolgten in Anwesenheit von 1,4-Dithio-D,L-threitol. DTT, Glutathion und β -Mercaptoethanol können die ATPase Aktivität circa 1,3-fach erhöhen (pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J.W.-Goethe Universität Frankfurt/Main). Ähnliche Ergebnisse werden mit P-gp (Urbatsch *et al.*, 2000a; Urbatsch *et al.*, 2000b) und ATM1 erhalten (Kuhnke *et al.*, 2006). Der molekulare Mechanismus der Reduktion von Cysteinen bzw. der Öffnung von Disulfidbrücken wird bis heute kontrovers diskutiert. Da innerhalb der ABC-Transportersequenzen keine konservierten Cysteine vorliegen, wird ein genereller Mechanismus ausgeschlossen. Für ATM1 wird eine ATPase Stimulation neben Cys-haltigen Peptiden auch in Anwesenheit von Thiolgruppen-enthaltenden Substanzen beobachtet (Kuhnke *et al.*, 2006). Der Gebrauch millimolarer Konzentrationen von Glutathion und Cystein sorgen für eine bis zu 5-fach erhöhte ATP-Hydrolyse. Die oxidierte Form dieser Substanzen bewirkt keine Steigerung der ATPase. Neben den Cystein-haltigen Peptiden zeigen auch verschiedene Peptidbibliotheken, bzw. spezifische Peptide keine stimulierte ATP-Hydrolyse des solubilisierten gereinigten Proteins MDL1 (pers. Komm. A. Zutz, Institut für Biochemie, J.W.-Goethe Universität Frankfurt/Main). Der Versuch die MDL1-spezifischen ATPase-Raten invertierter

Innenmembranvesikel und ER-Membranen durch Zugabe potentieller Substanzen zu erhöhen und gleichzeitig MDL1-fremde ATPase zu unterdrücken scheitert an unspezifischer und unvollständiger Inhibition anderer ATP-abhängiger Proteine. Eine stimulierte ATPase Aktivität kann unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden.

Alle diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass MDL1 für einen sehr spezifischen Peptidtransportprozess verantwortlich ist und nur eine eingeschränkte Bandbreite von Peptiden, evtl. modifizierte Peptide, transportieren kann. Aufgrund der Durchführung der Transport-Experimente mittels Peptidbibliotheken ist davon auszugehen, dass gerade diese spezifischen Peptide unterrepräsentiert sind und somit keine signifikante Transportrate und Substratakkumulation innerhalb der jeweiligen Vesikel erreicht wird. Es wird vermutet, dass es sich bei MDL1 um einen Peptidexporter handelt, der sich von anderen bekannten Transportern, wie TAP (Uebel *et al.*, 1997a), TAP-like (Wolters *et al.*, 2005) und OppA (Detmers *et al.*, 2000; Doeven *et al.*, 2004), signifikant unterscheidet. Es besteht die Möglichkeit, dass MDL1 nur für eine spezifische Translokation einer sehr geringen Bandbreite von Peptiden oder aber ausschließlich für modifizierte Peptide verantwortlich ist. Weiterhin bleibt unklar, ob die Bindung von Kofaktoren für die Substraterkennung und den anschließenden Transport essentiell ist. Die Anwesenheit dieser Faktoren kann in Aufnahme-Experimenten in invertierte Innenmembranvesikel und ER-Membranen nicht gewährleistet werden. ABC-me (ABCB10), das MDL1-Homolog aus *M. musculus* (Abbildung 5), wird während erhöhter Häm biosynthese verstärkt in Erythrozyten exprimiert (Shirihai *et al.*, 2000). In diesem Fall könnten Peptide als Chaperone für ein potentielles Zwischenprodukt der Häm biosynthese dienen und MDL1 würde aufgrund seiner Transportfunktion Matrix und Intermembranraum/Zytosol verbinden. Hauptsächlich erfolgt der Informations- und Materialtransfer innerhalb der Zelle von Zellkern und Zytoplasma zu den Mitochondrien. Aber auch für den entgegengesetzten Transfer existieren verschiedene Signalwege, die die Expression kernkodierter Gene in Abhängigkeit funktioneller mitochondrialer Veränderungen regulieren. Dieser so genannte *retrograde* (zurückgehende) Signalweg ist ein wichtiger Kommunikationsmechanismus zwischen Mitochondrium und Zellkern in einzelligen Eukaryonten. Er erlaubt den Zellen ihren mitochondrialen Metabolismus den gegenwärtigen Bedürfnissen anzupassen. Ausgelöst werden diese Signalwege meist

durch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, z.B. durch den Verlust der mitochondrialen DNA. Wie die Signalübermittlung genau funktioniert ist bis heute unbekannt, die Beteiligung von aus den Mitochondrien exportierten Peptiden wird diskutiert (Butow und Avadhani, 2004). Negativ beeinflusste Transportaktivitäten durch die Anwesenheit von C- oder N-terminalen *Tags* können aufgrund von *in vitro* ATPase und *in vivo* Komplementationsstudien ausgeschlossen werden. *Getaggte* MDL1-Varianten sind in Bezug auf ATP-Hydrolyse aktiv und in der Lage den durch ATM1-Deletion hervorgerufenen Wachstumsphänotyp zu komplementieren. Zum heutigen Zeitpunkt ist die Substratspezifität aller drei bekannten mitochondrialen ABC-Transporter in *S. cerevisiae*, ATM1, MDL1 und MDL2, unbekannt.

In Folge der zentralen Funktion von ATM1 innerhalb der Assemblierung zytosolischer Eisen/Schwefel-Cluster-Proteine zeigen $\Delta atm1$ Hefen einen deutlichen Wachstumsphänotyp. Werden $\Delta atm1/ATM1$ durch Wachstum in Anwesenheit von 5-FOA zum Verlust des plasmidkodierten *ATM1*-Gens (*URA3*) gezwungen, sind resultierende $\Delta atm1$ Zellen extrem eingeschränkt bis gar nicht lebensfähig. Die plasmidgetriebene MDL1-Expression kann diesen Phänotyp komplementieren (Chloupková *et al.*, 2003), unabhängig zusätzlicher C- bzw. N-terminaler Reinigungs-*Tags*. Der Verlust des ATM1-Plasmids von $\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Hefen führt zu keiner Erhöhung der Promotoraktivität. Die MDL1-Expressionsraten von $\Delta atm1$ Hefen in Anwesenheit beider Plasmide, bzw. nur des MDL1-Plasmids, sind nahezu identisch. Die Komplementation des $\Delta atm1$ Wachstumsphänotyps ist folglich nicht auf eine gesteigerte Aktivität des endogenen MDL1-Promotors zurückzuführen. Ebenso sind $\Delta atm1/MDL1$ Hefen in der Lage auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu überleben. Sie besitzen eine stark verlängerte Generationszeit, die auch in $\Delta atm1/AtATM$ Hefen, dem ATM1-Homolog aus *Arabidopsis*, beobachtet wird (Chen *et al.*, 2007). Mitochondrien von $\Delta atm1/MDL1$ Hefen haben eine weiße Färbung, wohingegen Wildtyp-Mitochondrien bräunlich erscheinen. Die Farbunterschiede können darauf hindeuten, dass ATM1 an der Assemblierung von Cytochromen und Eisen/Schwefel-Cluster involviert ist. Bei Verlust von ATM1 ist keine Assemblierung mehr möglich und die Mitochondrien erscheinen weiß. Ähnliche Erkenntnisse wurden kürzlich in $\Delta atm1/AtATM$ Hefen erhalten (Chen *et al.*, 2007). In dieser Dissertation konnte mittels Blau Nativ-PAGE nachgewiesen werden, dass nur Wildtyp- und

$\Delta atm1/ATM1+MDL1$ Mitochondrien Atmungskettenkomplexe bilden. In $\Delta atm1/MDL1$ Hefen sind keine dieser Komplexe zu finden. Eventuell ist die mtDNA durch die 8-fach erhöhte Konzentration von freiem, nicht-hämgebundenem Eisen (Chloupková *et al.*, 2003) geschädigt, wodurch eine Expression mitochondrial kodierter Komponenten der Atmungskette verhindert wird. Ebenso drückt sich das Fehlen der Atmungskettenkomplexe in einer veränderten Morphologie der Mitochondrien aus. $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien besitzen keinerlei Cristae-Strukturen. Fragmente mitochondrial kodierter Gene konnten durch PCR-Amplifikation nachgewiesen werden. Aufgrund all dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach Vorhandensein oder Umorientierung der mtDNA in $\Delta atm1/MDL1$ Hefen.

Eine funktionelle Überlagerung der beiden mitochondrialen Transporter ATM1 und MDL1 innerhalb des Exports essentieller Faktoren der zytosolischen Eisen/Schwefel-Proteine wird diskutiert. Die Mutationen des konservierten Lysin im Walker A-Motiv (K473A) ist für die Inhibition der ATP-Bindung bekannt, wohingegen der Aminosäureaustausch der katalytischen Base (E599Q oder H631A) die Inhibition der ATP-Hydrolyse bewirkt (Janas *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002; Zaitseva *et al.*, 2005a). Diese drei Mutanten zeigen keine Komplementation des $\Delta atm1$ Phänotyp, wodurch zum ersten Mal gezeigt wird, dass ATP-Bindung und -Hydrolyse von MDL1 essentiell für die Funktionalität des ABC-Transporters MDL1 und die Komplementation der zytosolischen Eisen/Schwefel-Assemblierung sind.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die ATPase Aktivität von ATM1 durch die Anwesenheit Cys-haltiger Peptide stimuliert werden kann. Aus diesem Grunde wurde eine Cys-freie MDL1 Variante generiert. MDL1 besitzt fünf nicht konservierte Cysteine; C9 befindet sich innerhalb der mitochondrialen Leitsequenz, die im reifen Protein abgespalten ist, C257 innerhalb der Transmembranhelix 4 und die restlichen drei Cysteine (C464, C531, C552) sind innerhalb nicht konservierter Regionen der Nukleotidbindedomäne lokalisiert. $\Delta atm1/MDL1$ (Cys-frei) Hefen sind innerhalb der *in vivo* Komplementation lebensfähig, wodurch deutlich wird, dass Cysteine innerhalb von MDL1 nicht für eine Substrattranslokation über die IMM essentiell sind. Die Folgerung, dass Cysteine nicht an der Substrattranslokation beteiligt sind, steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die MDL1-spezifische ATPase Aktivität nicht durch Cys-haltige Peptide stimuliert werden kann. Aus diesem Grund kann eine funktionelle Überschneidung der beiden mitochondrialen ABC-Transporter MDL1 und ATM1 in Hinsicht auf Cys-haltige Peptide ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist ER-ständiges MDL1(60-695) nicht in der Lage den beschriebenen Wachstumsdefekt zu komplementieren. Dadurch wird deutlich, dass die physiologische Funktion der beiden ABC-Transporter eng mit ihrer Expression innerhalb der mitochondrialen Innenmembran verknüpft ist.

ABCB10 gilt als humanes Homolog zu MDL1 (Identität 44%, Ähnlichkeit 61%, siehe Abbildung 5). Durch *in vivo* Komplementationsstudien wird gezeigt dass es sich bei diesem Transportkomplex gleichzeitig um das funktionelle MDL1-Homolog handelt.

In *P. anserina* werden für MDL1-, MDL2- und ATM1-Homologe mit einer Sequenzidentität von 48%, 25% bzw. 61% identifiziert (Tabelle 24). Pa_ATM1(Pa_5_7360) kann innerhalb weniger Tage den Wachstumsphänotyp von $\Delta atm1$ Hefen komplementieren. Pa_MDL1(Pa_2_9660) kann, ebenso wie MDL1 aus *S. cerevisiae*, zum Teil die Funktion des Hefeexporters ATM1 übernehmen. Pa_MDL2(Pa_3_7490) aus *P. anserina* ist in Anwesenheit von 5-FOA nicht lebensfähig. Trotz der geringen Sequenzidentität zwischen MDL2 und Pa_MDL2(Pa_3_7490), wird eine überlagernde Funktion der Proteine Pa_ATM1(Pa_5_7360) und Pa_MDL2(Pa_3_7490), bzw. ATM1 und MDL2, ausgeschlossen. Die Kenntnis der funktionellen Homologe von MDL1 und ATM1 in *P. anserina* ermöglicht die chromosomale Deletion des gewünschten Gens. Mitochondrien von *P. anserina* sind in den Alterungsprozess involviert, eine Deletion kann in diesem Fall über jeden der beiden beschriebenen Weg, COX1 und AOX, charakterisiert werden. Durch Zugabe von Inhibitoren kann jeder der beiden Wege spezifisch abgeschaltet werden und somit kann in diesem Kontext die Deletionsmutante charakterisiert werden. Resultierende Phänotypen sind auf den entsprechenden deletierten ABC-Transporter zurückzuführen. Ebenso können die *knock-out* Stämme bezüglich ihrer Lebensdauer untersucht werden.

5. Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit und den damit verbundenen Publikationen werden grundsätzliche biochemische Fragen des mitochondrialen ABC-Transporters MDL1 beantwortet und Systeme zur Durchführung von Transportstudien und *in vivo* Komplementationsstudien etabliert.

Die wichtigsten offenen Fragen sind die Aufklärung der physiologischen Funktion des MDL1-Transportkomplexes *in vivo*, der zugrunde liegende molekulare Mechanismus und die Substratspezifität. Ebenso ist der ATP-Hydrolysezyklus der Nukleotidbindedomänen nur anhand der isolierten Motordomänen geklärt (Janas *et al.*, 2003) und es ist bis heute nicht analysiert, ob das „*processive clamp*“ Modell auf den vollständigen Transportkomplex anwendbar ist. Zur strukturellen Organisation des ABC-Transporters sind kaum Daten vorhanden.

MDL1 wird postuliert Abbauprodukte der m-AAA Protease aus der Matrix in den Intermembranraum zu exportieren (Young *et al.*, 2001). Aufgrund durchgeführter Transportstudien mittels MDL1(60-695) exprimierender ER-Membranen und invertierten Innenmembranvesikeln wird davon ausgegangen, dass MDL1 sich von anderen reinen ABC-Peptidtransportern wie TAP (Uebel *et al.*, 1997a), TAP-like (Wolters *et al.*, 2005) und OppA (Detmers *et al.*, 2000; Doeven *et al.*, 2004) unterscheidet. Es wird vermutet, dass die Bindung von noch unbekanntem Kofaktoren für die Substraterkennung und den anschließenden Transportprozess von essentieller Bedeutung ist.

□ Mit Hilfe der *in organello* Translation werden mitochondriale Gene translatiert und gleichzeitig durch den Einbau von [³⁵S] Methionin markiert. Die m-AAA Protease baut diese Translationsprodukte in Peptidfragmente ab, die anschließend in den Intermembranraum entlassen werden. Der Vergleich der exportierten radioaktiv markierten Fragmente, durch z.B. Massenspektrometrie, aus Wildtyp-, MDL1 defiziente und MDL1 überexprimierende Mitochondrien könnte zur Identifikation der Substratspezifität des ABC-Transporters beitragen. Ebenso würde eine Anhäufung des potentiellen Substrates einschließlich aller eventuell gebundenen Kofaktoren innerhalb der Matrix von $\Delta mdl1$ Mitochondrien erwartet werden. Die Extrakte unterschiedlicher Mitochondrien (Wildtyp, $\Delta mdl1$, MDL1 überexprimierend) sollten sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

-
- Das exportierte potentielle [³⁵S] markierte Substrat nach *in organello* Translation kann für Transportstudien in Anwesenheit von entsprechenden ER-Membranen und invertierten Innenmembranvesikeln eingesetzt werden. Ebenso wie mitochondriale Extrakte aus $\Delta md1$ Hefen. Vorversuche zu diesen Experimenten zeigen keine MDL1-spezifische Transportfunktion. Hier sei aber erwähnt, dass das potentielle Substrat in extrem niedrigen Konzentrationen vorliegt und die Anwesenheit eventueller Kofaktoren, besonders nach Export in das Zytosol, nicht gewährleistet werden kann.
 - Die *in organello* Translation erfolgt gewöhnlich durch [³⁵S] Markierung. Denkbar wäre der Gebrauch weiterer radioaktiv markierter Substanzen die in mitochondrialen Genen von *S. cerevisiae* Verwendung finden, z.B. radioaktiv markiertes Leucin oder Cystein.
 - Die Kenntnis eines membranpassierbaren spezifischen MDL1-Inhibitors würde ebenfalls für Veränderungen der Zusammensetzung des exportierten, bzw. in der Matrix zurückgehaltenen, Materials sorgen, ohne dass Mitochondrien verschiedener Hefestämme verwendet werden müssten. Dieser inhibierte Hefestamm könnte gleichzeitig hinsichtlich eines sich verändernden Phänotyps beobachtet werden.

Während der mitochondrialen Hämbiosynthese erfolgt eine drastisch erhöhte Expression von ABC-me (ABCB10), dem MDL1-Homolog aus *M. musculus* (Shirihai *et al.*, 2000) (Abbildung 5). Peptide könnten dort als Chaperone für ein potentielles Zwischenprodukt der Hämbiosynthese dienen und MDL1 würde aufgrund seiner Exportfunktion Matrix und Intermembranraum/Zytosol verbinden.

- Die Kultivierung von Hefen unterschiedlicher Stämme (Wildtyp, $\Delta md1$, $\Delta md1/MDL1$) in Anwesenheit verschiedener radioaktiver Substanzen, wie z.B. Eisen oder organische Vorstufen der Hämbiosynthese, könnte die oben beschriebene Hypothese verifizieren. Es wäre möglich den Weg des exportierten markierten Materials zu rekonstituieren und somit die physiologische Funktion des ABC-Transporters zu charakterisieren.
- ABCB10 wurde als funktionelles MDL1-Homolog identifiziert. Die Überprüfung eines eventuell sichtbaren Phänotyps innerhalb eines ABC-me Knock-outs könnte nähere Auskünfte über die Funktion des ABC-Transportkomplexes liefern.
- Da ATM1 am Eisenexport in das Zytosol beteiligt sein soll, wären Transportstudien im MDL1 rekonstituierten System denkbar. Durch die Anwesenheit

von *Phen Green SK* innerhalb der Liposomen kann der Metalltransport verfolgt werden (Shingles *et al.*, 2001). Die Bindung von Eisen an die Phenanthrolingruppe des *Phen Green SK* vermittelt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Bis heute sind die Vermittler des *retrograden* Signalweges, die in den Informationensaustausch zwischen Mitochondrium und Zellkern eingreifen, nicht bekannt. In der Literatur wird die Beteiligung spezifischer Peptide nicht ausgeschlossen (Butow und Avadhani, 2004). Des Weiteren wurde beobachtet, dass mitochondriales Kupfer vorwiegend in nicht-proteingebundener Form innerhalb der Matrix vorliegt (Cobine *et al.*, 2004). Kupfer ist eine essentielle Substanz (Linder und Hazegh-Azam, 1996), die in hohen Konzentrationen toxisch wirken kann. Innerhalb der Zelle existieren homöostatische Mechanismen, die das Gleichgewicht der zellulären Kupferkonzentration regulieren, um z.B. schädliche Effekt zu minimieren und das Mitochondrium an unterschiedliche zytosolische Einflüsse anzupassen. Der für Kupferionen verantwortliche Exportweg, ebenso wie die Identität des matrixständigen Kupferliganden ist bis heute unbekannt. Bei diesem Liganden könnte es sich z.B. um Peptide handeln, die durch ein spezifisches Cysteinmotiv Kupferionen komplexieren.

□ Es wäre denkbar, dass MDL1 in diesem Falle die Exportfunktion eines solchen Peptid-Kupfer-Komplexes in den Intermembranraum gewährleisten könnte. Aufnahme-Experimente in Anwesenheit eines Extraktes aus Kupferionen enthaltenen Mitochondrien zeigten bis heute keine messbare spezifische Aktivität. Trotz allem wären detailliertere Untersuchungen, ebenso wie Aufnahme-Experimente in rekonstituierten Proteoliposomen und stimulierte ATPase Aktivitätsmessungen denkbar.

□ Generell kann die Substratidentifikation durch Anwendung stimulierter ATPase Messungen erfolgen. Verschiedene ABC-Transporter besitzen in Anwesenheit ihres (gebundenen) Substrates eine erhöhte ATP-Hydrolyserate (Borths *et al.*, 2005; Gorbulev *et al.*, 2001). Dieses System kann für solubilisiertes gereinigtes MDL1 und rekonstituierte Proteoliposomen (Hofacker *et al.*, 2007) angewendet werden. Prinzipiell können verschiedenste chemische und zelluläre Substanzen und Komponenten, ohne Limitation, überprüft werden.

Der essentielle mitochondriale Exporter ATM1 ist für die Assemblierung zytosolischer Eisen/Schwefel-Cluster-Proteine verantwortlich. Das Wachstum der $\Delta atm1$ Hefen ist deutlich eingeschränkt. Die Möglichkeit ATM1 *in vivo* durch MDL1 zu komplementieren (Chloupková *et al.*, 2003) liefert ein ideales System um die Funktionalität verschiedener MDL1-Mutanten zu überprüfen. Werden $\Delta atm1/ATM1$ Hefen zum Verlust des plasmidständigen ATM1 gezwungen, ist deren Überleben allein von der Funktionalität des vorhandenen plasmidständigen MDL1-Transporters abhängig.

□ Mit Hilfe dieses System können verschiedenste MDL1-Mutanten auf ihre Funktionalität überprüft werden. Darunter befinden sich Mutanten, die eventuell den ATP-Hydrolysezyklus, ebenso wie die Dimerbildung (Mutationen innerhalb der C-Schleife), beeinflussen. Auch können funktionelle MDL1-Homologe identifiziert werden (z.B. *P. anserina*).

□ Der *in vivo* Ansatz eignet sich ebenso zur Überprüfung wesentlicher, zur Komplementation benötigter, MDL1-Sequenzabschnitte. Die ATM1-Deletion äußert sich in eingeschränktem Wachstumsverhalten, wohingegen plasmidständiges ATM1 und MDL1 diesen Phänotyp aufheben können. Die Überprüfung verschiedener ATM1/MDL1 Chimären könnte Aufschluss über den wesentlichen essentiellen Sequenzabschnitt der Komplementation liefern. Ebenso können systematische Verkürzungen des N-Terminus, bzw. die Deletion bestimmter Transmembranhelices, die Region der Substratbindestelle eingrenzen.

□ Bis heute sind in *S. cerevisiae* drei Exporter der mitochondrialen Innenmembran bekannt. Um einen Komplementationseffekt auf $\Delta atm1/ATM1$ bzw. $\Delta atm1/MDL1$ Hefen durch die chromosomale Anwesenheit von MDL2 ausschließen zu können, wären *in vivo* Untersuchungen in einem $\Delta atm1\Delta mdl2$ Hintergrund möglich.

□ Die isolierten Mitochondrien aus $\Delta atm1/MDL1$ Hefen haben im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien eine deutlich hellere Färbung. Dieses Verhalten könnte durch UV-VIS Spektren näher untersucht werden und eventuell Rückschlüsse auf den Grund des Farbunterschiedes liefern. $\Delta atm1/MDL1$ Hefen enthalten keine Komponenten der Atmungskette, zeigen aber gleichzeitig eine erhöhte Eisenkonzentration. Bis heute ist keine Erklärung für dieses gegensätzliche Verhalten gefunden worden.

-
- Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass $\Delta atm1/MDL1$ keine Komplexe der Atmungskette, ebenso wie Cristae Membranen, enthalten. Fragmente mitochondrialer kodierter Gene können durch PCR-Reaktion amplifiziert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gehen wir davon aus, dass diese Mitochondrien eine deletierte Form der mitochondrialen DNA enthalten (ρ^-). Die Bestätigung dieser Vermutung kann durch *Southern Blot* Experimente erfolgen, bzw. kann der komplette Verlust mitochondrialer DNA (ρ^0) ausgeschlossen werden.
 - Mit Hilfe einer *in vitro* Eisen/Schwefel-Assemblierungsuntersuchung könnte der Export von radioaktiv markiertem Eisen und Schwefel aus isolierten $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien verfolgt werden. Zuvor werden die Zellorganellen mit [^{57}Fe] und [^{32}S]-Cystein markiert. Die aktiven Mitochondrien werden mit einem Eisen/Schwefel-Cluster-Chaperon und LEU1 inkubiert und der Transfer von Eisen und Schwefel in LEU1 gemessen. Handelt es sich bei $\Delta atm1/MDL1$ Mitochondrien um Hefen des ρ^- oder ρ^0 Phänotyps ist eine quantitative Aussage über den Eiseneinbau schwierig, da unter diesen Bedingung bereits die Transkription von LEU1 (auf 10%) und herunterreguliert wird. Eine verlässliche Aussage ist somit nicht möglich (pers. Komm. Prof. Dr. R. Lill, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg).
 - Bis heute ist kein MDL1-Phänotyp in *S. cerevisiae* beschrieben. MDL1-Homologe sind aber in fast allen Organismen zu finden. Eventuell zeigt die MDL1-Deletion in anderen Organismen (z.B. *C. elegans*, *P. anserina*) einen ausgeprägten Phänotyp.

6. Literatur

Abele R & Tampé R (2004) The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* 19, 216-224.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.

Allikmets R (2000) Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease. *Am J Hum Genet* 67, 793-799.

Arnold I & Langer T (2002) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1592, 89-96.

Askwith C & Kaplan J (1998) Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci* 23, 135-138.

Baker RT & Varshavsky A (1995) Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 270, 12065-12074.

Baneyx F & Georgiou G (1990) In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* 172, 491-494.

Bauer BE, Wolfger H & Kuchler K (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 217-236.

Beismann-Driemeyer S & Tampé R (2004) Function of the antigen transport complex TAP in cellular immunity. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 4014-4031.

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.

Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G & Fink GR (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175.

Borghouts C, Werner A, Elthon T & Osiewacz HD (2001) Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol Cell Biol* 21, 390-399.

Borths EL, Poolman B, Hvorup RN, Locher KP & Rees DC (2005) In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake. *Biochemistry* 44, 16301-16309.

Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P & Boeke JD (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Butow RA & Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1-15.

Carlson M & Botstein D (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-154.

Carvajal E, van den Hazel HB, Cybularz-Kolaczowska A, Balzi E & Goffeau A (1997) Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Genet* 256, 406-415.

Cervantes C & Gutierrez-Corona F (1994) Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev* 14, 121-137.

Chang XB, Hou YX & Riordan JR (1997) ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 272, 30962-30968.

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM & Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389.

Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL & Quijcho FA (2003a) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12, 651-661.

Chen M, Abele R & Tampé R (2003b) Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* 278, 29686-29692.

Chen S, Sánchez-Fernández R, Lyver ER, Dancis A & Rea PA (2007) Functional characterization of AtATM1, AtATM2 and AtATM3, a subfamily of Arabidopsis half-molecule ABC transporters implicated in iron homeostasis. *J Biol Chem*

Chloupková M, LeBard LS & Koeller DM (2003) MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol* 331, 155-165.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH & Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122.

Claros MG & Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779-786.

Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM & Winge DR (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 279, 14447-14455.

Csere P, Lill R & Kispal G (1998) Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast *Atm1p*. *FEBS Lett* 441, 266-270.

Dameron CT & Harrison MD (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 67, 1091S-1097S.

- Davidson AL & Chen J (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 73, 241-268.
- Davidson AL & Sharma S (1997) Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 5458-5464.
- Dawson RJ & Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-185.
- De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T & Vulpe C (2003) Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* 16, 185-197.
- de Ruyter PG, Kuipers OP & de Vos WM (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* 62, 3662-3667.
- de Winde JH & Grivell LA (1993) Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 46, 51-91.
- Dean M & Allikmets R (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5, 779-785.
- Dean M, Allikmets R, Gerrard B, Stewart C, Kistler A, Shafer B, Michaelis S & Strathern J (1994) Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10, 377-383.
- Dean M & Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123-142.
- Dean M, Rzhetsky A & Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11, 1156-1166.
- Decottignies A & Goffeau A (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15, 137-145.
- Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB & Goffeau A (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* 273, 12612-12622.
- Detmers FJ, Lanfermeijer FC, Abele R, Jack RW, Tampé R, Konings WN & Poolman B (2000) Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12487-12492.
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA & Eide DJ (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 26092-26099.
- Doerrler WT & Raetz CR (2002) ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277, 36697-36705.

- Doeven MK, Abele R, Tampé R & Poolman B (2004) The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 279, 32301-32307.
- Dufour E, Boulay J, Rincheval V & Sainsard-Chanet A (2000) A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4138-4143.
- el Moualij B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J & Sluse FE (1997) Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 573-581.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S & von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016.
- Endo T, Yamamoto H & Esaki M (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* 116, 3259-3267.
- Esser K & Keller W (1976) Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 144, 107-110.
- Fischer Lindahl K, Hermel E, Loveland BE & Wang CR (1991) Maternally transmitted antigen of mice: a model transplantation antigen. *Annu Rev Immunol* 9, 351-372.
- Fish WW (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158, 357-364.
- Fölsch H, Guiard B, Neupert W & Stuart RA (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 15, 479-487.
- Fritz S, Rapaport D, Klanner E, Neupert W & Westermann B (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Gavel Y & von Heijne G (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng* 4, 33-37.
- Gerber J & Lill R (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2, 71-86.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK & Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Glerum DM, Shtanko A & Tzagoloff A (1996a) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271, 14504-14509.

Glerum DM, Shtanko A & Tzagoloff A (1996b) SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 20531-20535.

Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL & 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.

Gorbulev S, Abele R & Tampé R (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3732-3737.

Gottesman MM & Ambudkar SV (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* 33, 453-458.

Graf SA, Haigh SE, Corson ED & Shirihi OS (2004) Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). *J Biol Chem* 279, 42954-42963.

Grant CM, Perrone G & Dawes IW (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 893-898.

Grivell LA (1989) Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem* 182, 477-493.

Gu Y, Wang C, Roifman CM & Cohen A (2003) Role of MHC class I in immune surveillance of mitochondrial DNA integrity. *J Immunol* 170, 3603-3607.

Hanahan D (1985) *DNA-Cloning* 109-136.

Hendrick JP, Hodges PE & Rosenberg LE (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4056-4060.

Herrmann JM & Neupert W (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3, 210-214.

Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.

Higgins CF (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* 82, 693-696.

Hiser L, Di Valentin M, Hamer AG & Hosler JP (2000) Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 275, 619-623.

Hofacker M, Gompf S, Zutz A, Presenti C, Haase W, van der Does C, Model K & Tampé R (2007) Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 3951-3961.

Hogue DL, Liu L & Ling V (1999) Identification and characterization of a mammalian mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *J Mol Biol* 285, 379-389.

Holland IB & Blight MA (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293, 381-399.

Horton P & Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5, 147-152.

Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF & Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396, 703-707.

Hunter WM & Greenwood FC (1964) A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem J* 91, 43-56.

Hurt EC, Muller U & Schatz G (1985) The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane. *EMBO J* 4, 3509-3518.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE & Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365.

li M & Mihara K (2001) Insertion of mitochondrial DNA-encoded F1F0-ATPase subunit 8 across the mitochondrial inner membrane in vitro. *J Biol Chem* 276, 24704-24712.

Janas E (2002) Intracellular Peptide Trafficking in Yeast. PhD thesis, Institut für Biochemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt

Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C & Tampé R (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem* 278, 26862-26869.

Jascur T (1991) Import of precursor proteins into yeast submitochondrial particles. *Methods Cell Biol* 34, 359-368.

Jensen RE & Dunn CD (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* 1592, 25-34.

Jobling MG & Holmes RK (1990) Construction of vectors with the p15a replicon, kanamycin resistance, inducible lacZ alpha and pUC18 or pUC19 multiple cloning sites. *Nucleic Acids Res* 18, 5315-5316.

Kambacheld M, Augustin S, Tatsuta T, Muller S & Langer T (2005) Role of the novel metallopeptidase Mop112 and saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 20132-20139.

- Kashiwayama Y, Morita M, Kamijo K & Imanaka T (2002) Nucleotide-induced conformational changes of PMP70, an ATP binding cassette transporter on rat liver peroxisomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 1245-1251.
- Kispal G, Csere P, Guiard B & Lill R (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418, 346-350.
- Kispal G, Csere P, Prohl C & Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18, 3981-3989.
- Koehler CM (2004) New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 309-335.
- Kohlhaw GB (1988) Alpha-isopropylmalate synthase from yeast. *Methods Enzymol* 166, 414-423.
- Kuchler K & Thorner J (1992) Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocr Rev* 13, 499-514.
- Kuhnke G, Neumann K, Mühlenhoff U & Lill R (2006) Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Mol Membr Biol* 23, 173-184.
- Kunji ER, Slotboom DJ & Poolman B (2003) *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1610, 97-108.
- Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lange C, Nett JH, Trumppower BL & Hunte C (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure. *EMBO J* 20, 6591-6600.
- Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 25, 247-251.
- Langer T, Kaser M, Klanner C & Leonhard K (2001) AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* 29, 431-436.
- Lankat-Buttgereit B & Tampé R (2002) The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 82, 187-204.
- Leighton J & Schatz G (1995) An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J* 14, 188-195.

Lill R & Kispal G (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 352-356.

Lill R & Kispal G (2001) Mitochondrial ABC transporters. *Res Microbiol* 152, 331-340.

Lill R, Kispal G, Künkele KP, Mayer A, Risse B, Steiner H, Heckmeyer P, Van der Klei I & Court DA (1996) "Protein transport into and across the mitochondrial outer membrane: Recognition, insertion and translocation of preproteins." In "Proceedings of the NATO/ASI, Cell Biology": Molecular Dynamics of Biomembranes, J. A. F. Op den Kamp, ed., Berlin: Springer-Verlag.

Linder MC & Hazegh-Azam M (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63, 797S-811S.

Locher KP, Lee AT & Rees DC (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091-1098.

Lode A, Kuschel M, Paret C & Rodel G (2000) Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett* 485, 19-24.

Loo TW, Bartlett MC & Clarke DM (2002) The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J Biol Chem* 277, 41303-41306.

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA & Mathur EJ (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.

Maarse AC, Van Loon AP, Riezman H, Gregor I, Schatz G & Grivell LA (1984) Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J* 3, 2831-2837.

McBride HM, Millar DG, Li JM & Shore GC (1992) A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 119, 1451-1457.

Meisinger C, Sommer T & Pfanner N (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem* 287, 339-342.

Meyers S, Schauer W, Balzi E, Wagner M, Goffeau A & Golin J (1992) Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5. *Curr Genet* 21, 431-436.

Michael SF (1994) Mutagenesis by incorporation of a phosphorylated oligo during PCR amplification. *Biotechniques* 16, 410-412.

Michaelis S & Berkower C (1995) Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 291-307.

- Miroux B & Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-298.
- Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF & Thomas PJ (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* 277, 21111-21114.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL & Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726-730.
- Mumberg D, Muller R & Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66, 863-917.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S & von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nikaido K & Ames GF (1999) One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease. *J Biol Chem* 274, 26727-26735.
- Ortiz DF, St Pierre MV, Abdulmessih A & Arias IM (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* 272, 15358-15365.
- Pfanner N, Craig EA & Honlinger A (1997) Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 25-51.
- Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C & Lithgow T (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1044-1048.
- Pinkett HW, Lee AT, Lum P, Locher KP & Rees DC (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* 315, 373-377.
- Prillinger H & Esser K (1977) The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol Gen Genet* 156, 333-345.
- Ravaud S, Do Cao MA, Jidenko M, Ebel C, Le Maire M, Jault JM, Di Pietro A, Haser R & Aghajari N (2006) The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state. *Biochem J* 395, 345-353.
- Riordan JR (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67, 701-718.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL & et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.

Rodriguez-Cousino N, Nargang FE, Baardman R, Neupert W, Lill R & Court DA (1998) An import signal in the cytosolic domain of the *Neurospora* mitochondrial outer membrane protein TOM22. *J Biol Chem* 273, 11527-11532.

Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC & Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* 272, 10685-10694.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sambrook J, Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Schägger H (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 65, 231-244.

Schägger H & Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.

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 & Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.

Schmitt L & Tampé R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12, 754-760.

Schmitz G, Kaminski WE & Orso E (2000) ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol* 11, 493-501.

Schulze K, Mulder A, Tinazli A & Tampé R (2006) Controlling the activity of the 20S proteasome complex by synthetic gatekeepers. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 5702-5705.

Senbongi H, Ling F & Shibata T (1999) A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA. *Mol Gen Genet* 262, 426-436.

- Sherman F (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.
- Shimada Y, Okuno S, Kawai A, Shinomiya H, Saito A, Suzuki M, Omori Y, Nishino N, Kanemoto N, Fujiwara T, Horie M & Takahashi E (1998) Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet* 43, 115-122.
- Shingles R, North M & McCarty RE (2001) Direct measurement of ferrous ion transport across membranes using a sensitive fluorometric assay. *Anal Biochem* 296, 106-113.
- Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH & Weiss MJ (2000) ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *EMBO J* 19, 2492-2502.
- Shyamala V, Baichwal V, Beall E & Ames GF (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* 266, 18714-18719.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N & Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13207-13212.
- Sickmann T & Alzheimer C (2003) Short-term desensitization of G-protein-activated, inwardly rectifying K⁺ (GIRK) currents in pyramidal neurons of rat neocortex. *J Neurophysiol* 90, 2494-2503.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ & Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10, 139-149.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Stuart R (2002) Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1592, 79-87.
- Sudhop T & von Bergmann K (2004) Sitosterolemia--a rare disease. Are elevated plant sterols an additional risk factor? *Z Kardiol* 93, 921-928.
- Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW & Ghosh SS (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* 21, 281-286.
- Teasdale RD & Jackson MR (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 27-54.
- Thomas BJ & Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619-630.

Tomblin G & Fishel R (2002) Biochemical characterization of the human RAD51 protein. I. ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 277, 14417-14425.

Towbin H, Staehelin T & 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.

Uebel S, Kraas W, Kienle S, Wiesmüller KH, Jung G & Tampé R (1997a) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8976-8981.

Uebel S, Meyer TH, Kraas W, Kienle S, Jung G, Wiesmüller KH & Tampé R (1995) Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J Biol Chem* 270, 18512-18516.

Uebel S, Plantinga T, Weber PJ, Beck-Sickinger AG & Tampé R (1997b) Peptide binding and photo-crosslinking to detergent solubilized and to reconstituted transporter associated with antigen processing (TAP). *FEBS Lett* 416, 359-363.

Uebel S, Wiesmüller KH, Jung G & Tampé R (1999) Peptide libraries in cellular immune recognition. *Curr Top Microbiol Immunol* 243, 1-21.

Urbatsch IL, Gimi K, Wilke-Mounts S & Senior AE (2000a) Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* 39, 11921-11927.

Urbatsch IL, Julien M, Carrier I, Rousseau ME, Cayrol R & Gros P (2000b) Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* 39, 14138-14149.

Urbatsch IL, Sankaran B, Bhagat S & Senior AE (1995a) Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J Biol Chem* 270, 26956-26961.

Urbatsch IL, Sankaran B, Weber J & Senior AE (1995b) P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem* 270, 19383-19390.

van der Does C, de Keyzer J, van der Laan M & Driessen AJ (2003) Reconstitution of purified bacterial preprotein translocase in liposomes. *Methods Enzymol* 372, 86-98.

van der Does C, den Blaauwen T, de Wit JG, Manting EH, Groot NA, Fekkes P & Driessen AJ (1996) SecA is an intrinsic subunit of the Escherichia coli preprotein translocase and exposes its carboxyl terminus to the periplasm. *Mol Microbiol* 22, 619-629.

van der Does C, Manting EH, Kaufmann A, Lutz M & Driessen AJ (1998) Interaction between SecA and SecYEG in micellar solution and formation of the membrane-inserted state. *Biochemistry* 37, 201-210.

- van der Does C, Presenti C, Schulze K, Dinkelaker S & Tampé R (2006) Kinetics of the ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of Mdl1 studied by a novel site-specific labeling technique. *J Biol Chem* 281, 5694-5701.
- van der Giezen M, Slotboom DJ, Horner DS, Dyal PL, Harding M, Xue GP, Embley TM & Kunji ER (2002) Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J* 21, 572-579.
- van der Heide T & Poolman B (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* 3, 938-943.
- van der Laan M, Houben EN, Nouwen N, Luirink J & Driessen AJ (2001) Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep* 2, 519-523.
- van der Sluis EO, Nouwen N & Driessen AJ (2002) SecY-SecY and SecY-SecG contacts revealed by site-specific crosslinking. *FEBS Lett* 527, 159-165.
- van Dijken JP, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois JM, Gancedo C, Giuseppin ML, Heijnen JJ, Hoare M, Lange HC, Madden EA, Niederberger P, Nielsen J, Parrou JL, Petit T, Porro D, Reuss M, van Riel N, Rizzi M, Steensma HY, Verrips CT, Vindelov J & Pronk JT (2000) An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb Technol* 26, 706-714.
- Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ & Thunnissen AM (2002) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an archaeal ABC-ATPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 362-365.
- Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ & Thunnissen AM (2003) Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol* 330, 343-358.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R & Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Wada S, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD & Uehara Y (2002) *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *J Biol Chem* 277, 46809-46821.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.
- Weiss C, Oppliger W, Vergeres G, Demel R, Jenö P, Horst M, de Kruijff B, Schatz G & Azem A (1999) Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8890-8894.

Wiedemann N, Frazier AE & Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 14473-14476.

Wolfger H, Mahé Y, Parle-McDermott A, Delahodde A & Kuchler K (1997) The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett* 418, 269-274.

Wolters JC, Abele R & Tampé R (2005) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the homodimeric ATP binding cassette transporter TAP-like (ABCB9). *J Biol Chem* 280, 23631-23636.

Wontner M & Jaehning JA (1990) Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265, 8979-8982.

Xiao W (2006) *Methods in Molecular Biology, Yeast protocols*. Human Press, Totowa, New Jersey

Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J & Langer T (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291, 2135-2138.

Yuan YR, Martsinkevich O & Hunt JF (2003) Structural characterization of an MJ1267 ATP-binding cassette crystal with a complex pattern of twinning caused by promiscuous fiber packing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 225-238.

Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB & Schmitt L (2005a) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J* 24, 1901-1910.

Zaitseva J, Jenewein S, Wiedemann A, Benabdelhak H, Holland IB & Schmitt L (2005b) Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry* 44, 9680-9690.

Zhang F, Hogue DL, Liu L, Fisher CL, Hui D, Childs S & Ling V (2000) M-ABC2, a new human mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *FEBS Lett* 478, 89-94.

Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT & Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 21, 4411-4419.

7. Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| ABC-me | <i>ABC-mitochondrial erythroid</i> |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATM1 | <i>ABC transporter of mitochondria</i> |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure, <i>bicinchononic acid</i> |
| BN-PAGE | Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese, <i>blue native PAGE</i> |
| Bp | Basenpaar |
| Bq | Becquerel |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | Komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i> |
| CFTR | <i>cystic fibrosis transmembrane regulator</i> |
| Ci | Curie |
| CIAP | <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> |
| C-terminal | carboxyterminal |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| Da | Dalton |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| DTT | 1,4-Dithio-D,L-threitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescent</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FOA | Fluorouracil, <i>fluoro orotic acid</i> |
| Gal | Galaktose |
| HEPES | <i>N</i> -(2-Hydroxyethylpiperazin)- <i>N'</i> -2-ethanolsulfat |
| i-AAA | <i>intermembrane space-oriented ATPase associated with a variety of cellular activities</i> |

| | |
|------------------|---|
| IC ₅₀ | Halbmaximale inhibitorische Konzentration, <i>half maximal inhibitory concentration</i> |
| ICL | Intrazellulärer Schleife, <i>intracellular Loop</i> |
| IDA | Iminodiessigsäure, <i>iminodiacetic acid</i> |
| IMM | Mitochondriale Innenmembran, <i>inner mitochondrial membrane</i> |
| IMS | Mitochondrialer Intermembranraum, <i>intermembrane space</i> |
| IMV | Invertierte mitochondriale Vesikel der inneren Membran, <i>inverted inner mitochondrial membrane vesicles</i> |
| IPTG | Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid |
| Kan | Kanamycin |
| LB | Bakteriennährlösung, <i>lysogenic broth</i> |
| LCR | Mutagenesereaktion, <i>ligase chain reaction</i> |
| LEU1 | Isopropylmalat-Isomerase |
| m-AAA | <i>matrix-oriented ATPase associated with a variety of cellular activities</i> |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MDL | <i>multidrug resistance like</i> |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i> |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propylsulfonsäure |
| mRNA | Boten RNA, <i>messenger RNA</i> |
| mtDNA | Mitochondriale DNA |
| MTS | Mitochondriale Leitsequenz, <i>mitochondrial targeting sequence</i> |
| m/v | Massenanteil |
| NAD | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid |
| NBD | Nukleotidbindedomäne |
| Nt-Amidase | N-terminale Amidase |
| N-terminal | Aminoterminal |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OD _x | Optische Dichte bei x nm |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatpuffer, <i>phosphate buffered saline</i> |

| | |
|------------|--|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Polyethyleglycol |
| <i>pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| PMF | <i>peptide mass fingerprint</i> |
| PMSF | Phenylmethylylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i> |
| ROS | reaktiver Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| SC | Synthetisches Vollmedium, <i>synthetic complete medium</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulphate</i> |
| TAE | TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer |
| TAP1/2 | <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| <i>taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TBS | TRIS-gepufferte Salzlösung, <i>TRIS buffered saline</i> |
| TEMED | N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin |
| TIM | <i>translocase of the inner mitochondrial membrane</i> |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| TOM | <i>translocase of the outer membrane</i> |
| TRIS | TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| v/v | Volumenanteil |
| WT | Wildtyp |
| XLSA/A | <i>X-linked sideroblastic anemia associated with cerebellar ataxia</i> |
| YEPD | Hefeextrakt-Pepton-Glukose-Medium, <i>yeast peptone dextrone</i> |

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Subzelluläre Lokalisation von ABC-Proteinen in Hefe | 12 |
| Vorgeschlagene Membrantopologie eines ABC-Transporters..... | 15 |
| Modell des ATP-Hydrolysezyklus der MDL1-NBDs | 17 |
| Aminosäureverteilung innerhalb der MDL1-MTS | 21 |
| Phylogenetischer Baum der mitochondrialen ABC-Transporter von <i>S. cerevisiae</i> und deren Homologe in <i>H. sapiens</i> , <i>P. anserina</i> und ABC-me aus <i>Mus musculus</i> | 23 |
| Schematische Darstellung von MDL1 (eine Halbseite)..... | 25 |
| Vorgeschlagene physiologische Funktion von MDL1 | 27 |
| Überblick über intrazelluläre Peptidtransporter..... | 28 |
| Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von MDL1 | 42 |
| <i>MDL1</i> unter der Kontrolle des <i>PDR5</i> -Promotors..... | 53 |
| Schematische Darstellung der Tetradendisektion..... | 58 |
| Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Komplementation | 60 |
| Schematische Darstellung der Mitochondrienpräparation | 62 |
| MDL1-Konz. in Mitochondrien von <i>S. cerevisiae</i> | 80 |
| MDL1-Expression in Abhängigkeit des verwendeten Promotors | 83 |
| Transkription und Translation von <i>MDL1</i> in <i>S. cerevisiae</i> | 84 |
| Tetradendisektion CEN.PK2 <i>GAL1::MDL1</i> und MDL1-Expression | 85 |
| Lokalisation des MDL1-Proteins in <i>S. cerevisiae</i> | 86 |
| Immunogold-Markierung von MDL1 in <i>S. cerevisiae</i> | 87 |
| Orientierung von mitochondrialem MDL1 | 88 |
| Orientierung der MDL1-NBDs..... | 89 |
| Reinigung von MDL1 aus Mitochondrien | 90 |
| ATPase Aktivitäten von MDL1, MDL1(E599Q) und MDL1(H631A) | 92 |
| Mitochondriale Signalsequenz von MDL1 aus <i>S. cerevisiae</i> | 94 |
| Lokalisation von MDL1(60-695) in <i>S. cerevisiae</i> | 95 |
| Immunogold-Markierung von MDL1(60-695) in <i>S. cerevisiae</i> | 96 |
| Orientierung von ER-ständigem MDL1(60-695) | 97 |
| Beispielhaftes Ergebnis eines Aufnahme-Experimentes | 99 |
| Reinigung von MDL1 und MDL1(60-695) aus Gesamtmembranen..... | 100 |
| Größenvergleich von überexprimiertem MDL1 und MDL1(60-695) | 101 |
| Homooligomere MDL1-Komplexe..... | 102 |
| BN-PAGE der MDL1- und MDL1(60-695)-Komplexe | 103 |

| | |
|--|-----|
| MDL1-spezifische ATP-Hydrolyseraten | 103 |
| Vanadat-Inhibition von gereinigtem MDL1 und MDL1(60-695)..... | 104 |
| MDL1-Effekt auf die Katalase Aktivität | 105 |
| ATM1-Komplementation durch MDL1 | 107 |
| Charakterisierung der Hefestämme nach <i>in vivo</i> Analyse | 108 |
| MDL1-Expressionsrate in $\Delta atm1$ Hefen..... | 109 |
| ATM1-Komplementationsverhalten ATPase defizienter MDL1-Mutanten..... | 110 |
| Abhängigkeit der ATM1-Komplementation durch Promotoren..... | 112 |
| Einfluss eines C-terminalen His ₈ -Tags auf die Komplementation | 113 |
| Analyse des Komplementationsverhalten von MDL1(60-695)..... | 113 |
| Physiologische Funktion von MDL1(Cys-frei)..... | 114 |
| Farbunterschied von W303 und $\Delta atm1$ /MDL1 Mitochondrien..... | 114 |
| Freier, nicht-hämgebundener Eisengehalt in Abhängigkeit zur ATM1-Expression .. | 115 |
| Isolierung des MDL1-Proteinkomplexen durch BN-PAGE | 116 |
| Vergleich der Mitochondrien-Morphologie versch. Hefestämme | 118 |
| Amplifikation mitochondrial kodierter Genfragmente | 119 |
| <i>In vivo</i> Komplementation mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern..... | 121 |
| <i>In vivo</i> Komplementation MDL1, MDL2 und ATM1 Homologe aus <i>P. anserina</i> | 124 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| ABC-Proteine in <i>S. cerevisiae</i> | 12 |
| Primer zur Amplifikation mitochondrial kodierter Gene | 34 |
| Pipetierschema der <i>S. cerevisiae</i> Transformation | 39 |
| Primer zur Klonierung von <i>MDL1</i> | 43 |
| Primer für <i>MDL1</i> in pYES2.1/V5-His-TOPO® | 45 |
| Primer der Remutation L150F | 45 |
| Primer zur Generierung von <i>MDL1</i> (E599Q) und <i>MDL1</i> (H631A)..... | 46 |
| Primer der <i>MDL1</i> -Deletionskonstrukte..... | 47 |
| Primer der <i>MDL1</i> -Konstrukte in pMW142..... | 50 |
| Primer zur Klonierung mitochondrialer ABC-Transporter aus Säugern | 51 |
| Primer der MDL1-, MDL2- und ATM1-Homologen aus <i>P. anserina</i> | 52 |
| Primer zur homologen Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> | 54 |
| Peptide für Transportstudien | 69 |
| Zusammensetzung des SDS-PAGE (10%) | 70 |
| Gelzusammensetzung des Blau Nativ PAGE | 73 |
| Eingesetzte Verdünnungen der Primär-Antikörper | 75 |
| Eingesetzte Verdünnungen der Sekundär-Antikörper | 75 |
| Chemikalien..... | 77 |
| Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 79 |
| MDL1-Expressionsrate innerhalb verschiedener Organismen..... | 81 |
| MTS-Vorhersage mittels verschiedener Computerprogramme..... | 93 |
| Erhaltene MDL1-Konzentrationen | 100 |
| MDL1-Alignierung gegen humane mitochondriale ABC-Transporter..... | 120 |
| Sequenzalignierung von <i>P. anserina</i> Proteinen gegen MDL1, MDL2 und ATM1 ... | 122 |
| Hergestellte MDL1-Plasmide | 166 |
| In dieser Arbeit generierte Hefestämme | 167 |

10. Anhang

10.1. Liste der verwendeten und generierten Plasmide

| Plasmid | Kassette des MDL 1-Gens, Bemerkungen | Vektor | Literatur |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| pBad-HisB-MDL 1(-mt)Kl.4 | - | pBad | (Janas, 2002) |
| p426-MDL 1-strep | - | p426-GPD | (Janas, 2002) |
| p426-GPD | (2.1.18.6) | - | (Janas, 2002) |
| pCR [®] 4-TOPO [®] | (2.1.18.5) | - | invitrogen™ |
| pCR-MDL 1(I) | I | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pCR-MDL 1(II) | II | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pCR-MDL 1(III) | III | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pCR-MDL 1(III)-H ₈ | III, C-term H ₈ -Tag | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pCR-MDL 1(I,Δ68) | I, ab As 69 | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pCR-MDL 1-H ₈ | komplett, C-term H ₈ -Tag (2.1.18.14) | pCR [®] 4-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pET302 | - | - | (van der Does <i>et al.</i> , 1998) |
| pET302-H ₁₀ -MDL 1(Δ68) | MDL 1(69-695), N-term. H ₁₀ -Tag | pET302 | diese Arbeit |
| pET401 | - | - | (van der Sluis <i>et al.</i> , 2002) |
| pET401-MDL 1(I-II) | I-II | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL 1(I-II,L150F) | I-II, Mutation L 150F | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL 1(I-II,C257S) | I-II, C257S | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL 1(II) | II | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL 1(II-III) | II-III | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL 1(II-III)-H ₈ | II-III, C-term. H ₈ -Tag | pET401 | diese Arbeit |

| Plasmid | Kassette des MDL1-Gens, Bemerkungen | Vektor | Literatur |
|---|---|---------------|-----------------------------|
| pET401-MDL1(III) | III | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III,C464/531/552S) | III, C464S, C531S, C552S | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.1)-His ₈ | III, C-term. His ₈ -Tag und EcoRI | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.1,E599Q)-His ₈ | III, C-term. His ₈ -Tag und EcoRI, E599Q | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.1,H631A)-His ₈ | III, C-term. His ₈ -Tag und EcoRI, H631A | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.2) | III | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.2,K473A) | III, Mutation K473A | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.2,E599Q) | III, Mutation E599Q | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(III.2,H631A) | III, Mutation H631A | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1 | komplett | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1-His ₈ | komplett, C-term His ₈ -Tag | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, L150F ^(2.1.18.11) | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1-Stop-Xa-His ₈ | komplett, C-term. Stop, 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, L150F ^(2.1.18.11) | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(I, Δ68) | I, ab As 69 | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(Δ68) | MDL1(69-695) | pET401 | diese Arbeit |
| pET401-MDL1(Δ68)-His ₈ | MDL1(69-695), C-term. His ₈ -Tag | pET401 | diese Arbeit |
| pFA6a-His3MX6 | ^(2.1.18.14) | - | (Wach <i>et al.</i> , 1994) |
| pFA6-His3MX6-pGAL1 | ^(2.1.18.14) Dr. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main | | |
| pFA-MDL1-His ₈ | komplett, C-term His ₈ -Tag ^(2.1.18.14) | pFA6a-His3MX6 | diese Arbeit |

| Plasmid | Kassette des MDL 1-Gens, Bemerkungen | Vektor | Literatur |
|--|---|-------------|-----------------------------|
| pGPD-MDL1 | komplett | p426-GPD | diese Arbeit |
| pGPD-MDL1-His ₈ | komplett, C-term His ₈ -Tag | p426-GPD | diese Arbeit |
| pGPD-MDL1(Δ68) | MDL1(69-695) | p426-GPD | diese Arbeit |
| pGPD-MDL1(Δ68)-His ₈ | MDL1(69-695), C-term. His ₈ -Tag | p426-GPD | diese Arbeit |
| pRS424 | - | - | (Christianson et al., 1992) |
| pRS424::GAL1(a) | pRS424 inkl. GAL1; neue Schnittstellen Cpol und AscI | - | diese Arbeit |
| pRS424::GAL1(b) | pRS424 inkl. GAL1; neue Schnittstelle SalI | - | diese Arbeit |
| pRS424-GAL1-MDL1(L150F)-His ₈ | komplett, N-term. GAL1, C-term. Gly ₄ , Xa, His ₈ , L150F (2.1.18.11) | pRS424 | diese Arbeit |
| pRS424-GAL1-MDL1(H631A)-His ₈ | komplett, N-term. GAL1, C-term. Gly ₄ , Xa, His ₈ , H631A (2.1.18.11) | pRS424 | diese Arbeit |
| pRS424-ABCB6 | ABCB6 aus <i>Homo sapiens</i> (2.1.18.12) | pRS424-GAL1 | diese Arbeit |
| pRS424-ABCB7 | ABCB7 aus <i>Homo sapiens</i> (2.1.18.12) | pRS424-GAL1 | diese Arbeit |
| pRS424-ABCB8 | ABCB8 aus <i>Mus musculus</i> (2.1.18.12) | pRS424-GAL1 | diese Arbeit |
| pRS424-ABCB10 | ABCB10 aus <i>Homo sapiens</i> (2.1.18.12) | pRS424-GAL1 | diese Arbeit |
| pRS424-MDL1 | MDL1 aus <i>S. cerevisiae</i> (2.1.18.12) | pRS424-GAL1 | diese Arbeit |
| pPa-MDL1 | MDL1-Homolog aus <i>P. anserina</i> (2.1.18.13) | | |
| pPa-MDL2 | MDL2-Homolog aus <i>P. anserina</i> (2.1.18.13) | | |
| pPa-ATM1 | ATM1-Homolog aus <i>P. anserina</i> (2.1.18.13) | | |

| Plasmid | Kassette des MDL 1-Gens, Bemerkungen | Vektor | Literatur |
|---------------------------------------|---|----------------------------------|---------------------------|
| pMW142 | komplett (2.1.18.11) | YEplac 112 | (Chloupková et al., 2003) |
| pMW-MDL 1(III,C464/531/552S) | III, C464S, C531S, C552S (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(C257/464/531/552S) | III, C257S, C464S, C531S, C552S (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(K473A) | komplett, K473A (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(E599Q) | komplett, E599Q (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(H631A) | komplett, H631A (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(Cys-frei) | komplett, Cystein-frei (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, L150F (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1(60-695) | MDL 1(60-695) (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pMW-MDL 1-Stop-Xa-His ₈ | komplett, C-term. Stop, 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, L150F (2.1.18.11) | pMW142 | diese Arbeit |
| pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | (2.1.18.8) | - | invitrogen [™] |
| pYES-MDL 1-His ₈ | komplett, C-term. His ₈ -Tag | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-MDL 1-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-MDL 1(L150F)-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, L150F (2.1.18.11) | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-MDL 1(E599Q)-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, E599Q | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-MDL 1(H631A)-Xa-His ₈ | komplett, C-term. 4 Gly, Xa, His ₈ -Tag, H631A | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| | | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |

| Plasmid | Kassette des MDL 1-Gens, Bemerkungen | Vektor | Literatur |
|---|--|---------------------------------------|--------------|
| pYES-MDL 1(Δ 68) | MDL1(69-695) | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-His ₁₀ -MDL 1(Δ 68) | MDL1(69-695), N-term. His ₁₀ -Tag | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-MDL 1(Δ 59) | MDL1(60-695) | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES-His ₁₀ -MDL 1(Δ 59) | MDL1(60-695), N-term. His ₁₀ -Tag | pYES2.1/V5-His-TOPO [®] | diese Arbeit |
| pYES3 _{PA2} AAC2 | Glycerin induzierbarer Promotor (2.1.18.7) | (van der Giezen <i>et al.</i> , 2002) | |
| pYES3-MDL 1-His ₈ | komplett, C-term. His ₈ -Tag (2.1.18.7) | pYES3 _{PA2} | diese Arbeit |
| pYM9 | (2.1.18.14) Dr. Kötter, J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main | | |

Tabelle 25 Hergestellte MDL 1-Plasmiden

10.2. Generierte *S. cerevisiae* Stämme

| Generierter Hefestamm | Ausgangsstamm | Bemerkung |
|------------------------------|---------------|---|
| <i>GAL1::MDL1</i> | CEN.PK2 | <i>GAL1</i> Prom. N-term. von <i>MDL1</i> , <i>HIS3</i> -Selektionskassette (2.1.18.14) |
| <i>MDL1::His₇</i> | CEN.PK2 | <i>His₇-Tag</i> C-term. nach <i>MDL1</i> , KanMX-Selektionskassette (2.1.18.14) |
| <i>PDR5::MDL1</i> | YALF-A1 | <i>MDL1</i> kontrolliert durch den intrinsischen <i>PDR5</i> -Promotor, <i>HIS3</i> -Selektionskassette (2.1.18.14) |

Tabelle 26 In dieser Arbeit generierte Hefestämme

10.3. Sequenzalignierung von *MDL1* vs. humane ABCB Transporter

| | | |
|--------------------|---|-----|
| <i>MDL1/1-695</i> | 1 M I V R M I R L C K G F K L L R S Q F A S A S A L Y S T K 29 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 1 M V T V G N Y C E A E G P V G P A W M Q D G L S P C F F T L V P S T R M A L G T L A L V L A L P C R R R E R P A G A D S L S W G A G P R I S P Y V L Q L L L A T L Q A A L F L A G L A G R V 95 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 1 M A L L A M H S W R W A A A A A F E K R R H S A I L I R P L V S V S G S G P Q W R P H O L G A L 40 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 1 M L V H L F R V G I R G G P F P G R L L P P L R F Q T F S A V R Y S D G Y 37 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 1 M R G P P A W P L R L L E P P S P A E P G R L L P V A C V W A A A S R V P G S L 40 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 30 S L F K . . . P P M Y Q K A E I N L I I P H R K H F L R S I R L Q S D I A G G K 67 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 96 G T A R G A P L R S Y L L L A S V L E S L A G A C G L W L L V V E R S Q A R O R L A M G I W I K F R H S P G L L L L W T V A F A E N L A L V S W N S P Q W W A R 177 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 50 G T A R A Y Q Q I P E S L K S I T W Q R L G K G N S G O F L D A A K A L Q V W P L I E K R T C W H G H 100 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 38 R S S S L L R A V A H L R S Q L W A H L P R A P L A P R W P S A W C W V G S A L L G P M V L S K H P H L Q L V A L 95 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 41 S P F T G L R P A R L W G A G P A L L W G V G A A R R W R S G C R G G G P A S R G V L G L A R L L G L W A R G P G S C R C G A F A G P G A P R L P R A R F P G G P A A A W A G D E A W R R 135 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 68 K S T K F T L K L S N A N S K S S G F R D I K R L F V L S K P E S K Y I G L A L L I I 110 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 178 A D L G Q Q V Q F S L W V L R Y V V S G G L F V L G L W A P G L R P Q S Y T L Q V H E E D Q V E R S Q V R S A A Q Q S T W R D F G R K L R L L S G Y L W P R G S P A L Q L V L V L I C L G L M 272 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 101 A G G G L H T D P K E G L K D V D T R K I I K A M L S Y V W P K D R P D L R A R V A I S L G F L 148 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 96 C E A E E A P P A S T P H V V G S R F N W K L F W O F L H P H L L V L G V A V V L A 138 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 136 G P A A P P G D K G R L R P A A A G L P E A R K L L G L A Y P E R R L A A A V G L 178 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 111 L I S S V S M A V P S V I G K L L D L A S E S D G E D E E G S K S N K L Y G F T K K Q F T A L G A V F I G A V A N A S R I I L K V T G E R L V A R L R T R T M K A A L D D D A T F L D 205 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 273 G L E R A L N L V P I F Y R N I V N L L T E K A P W N S L A W T V T S Y V F L K F L Q G G G T G S T G F V S N L R T F L W I R V Q Q F T S R R V E L L I F S H L H E L S L R W H L 302 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 149 G A K A M N I V P P M F K Y A V D S L N Q M S G N M L N L S D A P N T V A T M A T A V L I G Y V S R A G A A F F E V R N A V F G K V A Q N S I R R I A K N V L H L H L D L G F H L 243 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 139 L G A A L V N Q I P L L L G Q L V K V V A K Y T R H V G S F M T E S Q N L S T H L L I L Y G V G L L T F G Y L V L L S H V G E R M A V D M R R A L F S S L L R Q N I T F F D 227 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 179 T M S S V I S M S A P F F L G K I I D V I Y T N P T V D S D N L T R L C L G L S A V F L C G A A N A I R V Y L M Q T S G R I V N R L R T S L F S S L L R L Y N P R 264 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 206 T H R V S D L I S R L S S D A S I V A K S V T Q N V S D G T R A I I D G F V G F G M M S F L S - W K L T C V M M I L A P P L G A M A L I Y G R K I R N L S R Q L Q T S V G L T K V A E E Q L 299 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 303 G R T G E V L R I A D R G T S S M T G L L S Y L V F N V I P T L A D I I I G I I Y F S M F N A W F G L I V F L C M S L Y L T L T I V V T E W R T K F R R A M N T Q E N A T R A R A V D S L 457 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 244 S R O T G A L S K A I D R G T R G I S F V L S A L V F N L L P I M F E V M L V S G V L Y Y K G G A Q F A L V T L G T L G T Y T A F T V A V T R W R T R F I E M N K A D N A G N A A I D S L 338 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 228 A N K T G Q L V S R L T T D V Q E F K S S F K L V I S G L R S C S Q V A G C L V S L S M L S - T R L T L L L M V A T P A L M G V G T L M G S G L R K L S R Q C E H I A R A M G V A D E A L 321 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 265 K T R T G E L I N R L S S D T A L L G R S V T E N L S D G L R A G A A S V G I S M M F F V S - P N L A T F V L S V V P P V S I I A V I Y G R Y L R K L T K V T Q D L A O A T Q L A E E R I 358 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 300 N A T R T I Q A Y G G E K N E V R R Y A K E V R N V F H I G L K E A V T S G L F F G S T G L V G N T A M L S L L L V G T S M I O S G S M T V G E L S S F M M Y A V Y T G S S L F G L S S F Y S 394 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 458 L N F E T V K Y Y N A E S Y E V E R Y R E A I K Y G G L E W K S S A S L V L L N O T O N L V I G L G L L A G S L L C A Y F V T E Q K L Q V G D Y V L F G T Y I I O L Y M P L N W F G T Y Y R 552 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 339 L N Y E T V K Y F N N E R Y E A Q R Y D G F L K T Y E T A S L K S T S T L A M L N F G G S A I F S V G L T A I M V L A S Q G I V A G T L T V G D L V M V N G L L F Q L S L P L N F L G T V Y R 433 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 322 G N V R T V R A L A M E Q R E E E R Y G A E L E A C R C R A E E L G R G I A L F O G L S N I A F N C M V L G T L F I G G S L V A G Q O L T G G D L M S F L V A S Q T V Q R S M A N L S V L F G 416 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 359 G N V R T V R A F G K E M T E I E K Y A S K V D H V M Q L A R K E A V A R A G F F G A T G L S G N L I V L S V L Y K G G L L M G S A H M T V G E L S S F L M Y A F W V G I S I G G L S S F Y S 463 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 395 E L M K G A G A A A R V F E L N D R K F L R - P T I G K D P - V S L A K P I V F K N V S F T Y R T R P K H O I F K D L N I T I K P G E H V C A V G P S G S G K S T I A S L L L R Y D V N 487 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 553 M I Q T N F I D M E N M F D L L K E E T E V K D L P G A G L R F Q - K G R I E F E N V H S Y A D - G R E T L Q D V S F T V M R G T L A L V G P S G A G K S T I L R L L F R F Y D I S 643 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 434 E T R O A L I D M N T L F T L L K V D T O I K D K V M A S P L Q I T P Q T A T V A F D N V H F E Y I E - G Q K V L S G I S F E V P A S K K V A I V G G S G S K S T I V R L L E R F Y F P 526 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 417 Q V V R G L S A G A R V F E Y M A L N P C I P - L S G G C C P K E Q L R G S V T F Q N V C F S Y P C R P G F E V L K D F T L T L P P G K I M A L V G Q S G G K T V A S L L E R F Y D P T 510 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 464 E L M K G L G A G R L W E L L E R E P K L P - F N E G V I L N E K S F D G A L E F K N V H A Y P A R P E V P I F O D F S L S I P S G S V T A L V G P S G S G K S T V L S L L R L Y N P A 547 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 488 S G S I E F G D E D I R N F N L R K Y R - R L I G Y V Q D E P L L F N G T I L D N I L Y C I P P E I A E Q D D R I R R A I G K A N C T K F L A N F P D G L Q T M V G A R G A D L S G G Q K R 681 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 644 S G C I R I D G Q D I S D V T Q A S L R - S H I G V V P Q D T V L F N D T I A D N I R Y G R V T A G - . . . N D E V E A A A Q A A G I H D A I M A F P E G Y R T Q V G E R G L K L S G G E K O R 734 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 527 K G S I Y L A G Q N I Q D V S L E S L R - R A V G V V P Q D A V L F H N T I Y Y N L L Y G N I S A S - . . . P E E V Y A V A K L A G L H D A I L R M P H G Y T Q V G E R G L K L S G G E K O R 617 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 511 A G V M L D G R D L R T L D P S W L R Q V V G F I S Q E P V L F G T T I M E N I R F G K L E A S - . . . D E E V Y T A A R E A N A H E F I T S F P E G Y N T V V G E R G T L S G G Q K R 602 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 548 S G T I S L D G H D I R Q L N P V W L R - S K I G T V S Q E P I L F S C S I A E N I A Y G A D D P S V T A E E I Q R V A E V A N A V A F I R N F P Q G F T V V G E K G V L L S G G Q K R 641 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 582 I A L A R A F L L D P A V L I L D E A T S A L D S Q S E E I V A K N L Q R R V E R G F T T I S I A H R L S T I K H S T R V I V L G K H G S V V E T S F R D L I A I P N S E L N A L L A E D Q 676 | |
| <i>ABC6/1-842</i> | 735 V A I A R T I L K A P G I L L D E A T S A L D T S N E R A I Q A S L A K V C A - N R T T I V A H R L S T V V N A D O I L V I K - D G C I V E R G R H E A L L S - R G G Y A D N W Q L Q 826 | |
| <i>ABC7/1-753</i> | 618 V A I A R A I L K D P P V I L Y D E A T S S L D S I T E E T I L G A M K D V Y K - H R T S I F I A H R L S T V D A D E I I V L D - D G K V A E R G T H H G L L A N F H S I Y S E M W H T Q S 710 | |
| <i>ABC8/1-718</i> | 603 L A I A R A L I K O P T V L I L D E A T S A L D A E S E R V Q E A L D R A S A - G R T V L V I A H R L S T V R G A H C I L V M A - D G R V W E A G T H E E L L K K - G G Y A E L I R R Q A 694 | |
| <i>ABC10/1-738</i> | 642 I A I A R A L L K N P K I L L L D E A T S A L D A E N E Y L V Q E A L D R L M D - G R T V L V I A H R L S T I K N A N M V A V L D - D G K I T E Y G K H E E L L S K P N G I Y R K L M N K Q S 734 | |
| | | |
| <i>MDL1/1-695</i> | 677 D E E G K G G V I D L D N S V A R E V | 695 |
| <i>ABC6/1-842</i> | 827 G O E E T S E D T K R O T M E R | 842 |
| <i>ABC7/1-753</i> | 711 S R V Q N H D N P K W E A K K E N I S K E E E R K K L Q E E I V N S V K G C G N C S C | 753 |
| <i>ABC8/1-718</i> | 695 L D A P R T A A P P K K P E G P R S H Q H K S | 718 |
| <i>ABC10/1-738</i> | 735 F I S A | 738 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé danke ich herzlich für die anspruchsvolle und interessante Promotionsthematik, seine stete Diskussionsbereitschaft, seine vielseitigen Hilfestellungen und sein reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dankeschön!

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Chris van der Does (*Moleculaire Microbiologie Groningen Biomolecular Science and Biotechn. Institut*), der mir während meiner Promotion mit vielerlei Rat zur Seite stand. Ich danke ihm für sein Interesse an meiner Arbeit und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft trotz der großen Entfernung.

Dank u wel Chris!

Bei Herrn Dr. Peter Kötter (J.W. Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main) möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung und das Interesse an der Thematik meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank ihm und Svenja Hempel für die hervorragende Einarbeitung in die Methoden der Hefegenetik, der Zellkultur und das Überlassen verschiedenster Plasmide und Hefestämme.

Vielen Dank!

Außerdem danke ich Frau Dr. Maja Chloupková und Herrn Prof. Dr. David Koeller (*Oregon Health and Science University, Portland, USA*) für die freundliche Bereitstellung der Hefestämme W303, $\Delta atm1/ATM1$ und $\Delta atm1/ATM1+MDL1$.

Danke!

Dr. Andrea Hamann und Prof. Dr. Heinz Osiewacz (Institut für Molekulare Biowissenschaften, J.W. Goethe Universität Frankfurt) danke ich für die Plasmid-Herstellung und Übergabe der benötigten *P. anserina* Gene.

Vielen Dank!

Für die vielen Gespräche, Anregungen und Hilfestellungen danke ich unseren ehemaligen und jetzigen Post-Docs, Juniorprofessoren und Professoren: Rupert Abele, Alexander Gottschalk, Joachim Koch, Jana Liewald, David Parcej, Jacob Piehler, Lutz Schmidt und Urte Scheele.

Dankeschön!

Meinen jetzigen und früheren Mitstreitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme, hilfsbereite und kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor danken. Allen Kollegen des Instituts für Biochemie gilt mein besonderer Dank für die vielen fachlichen und fachübergreifenden Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Dr. Hans Bäumert, Renate Guntrum, Christine Le Gal, Gudrun Illig, Eckhard Linker und Gerhard Spatz-Kümbel für die vielen selbstverständlich erledigten „Dinge“ bedanken.

Herzlichen Dank!

Bei Matthias Hofacker, Chiara Presenti, Katrin Schulze, Stephanie Dinkelaker, Ariane Zutz und Dominik Barthelme möchte ich mich für die gemeinsame Zeit im Labor und die daraus entstandenen Freundschaften ganz herzlich bedanken.

Grazie und vielen Dank Euch allen!

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die liebevolle, immerwährende Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Ebenso meinem Freund Tobias, der meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

Vielen, vielen lieben Dank!

Simone Gompf

Geburtsdatum 18. November 1974
Geburtsort Marburg, Deutschland

Adresse Neuer Weg 9
35080 Bad Endbach
Hartenrod

Telefon 01 77 – 20 20 01 9
Email Simone_Gompf@web.de
Familienstand ledig
Nationalität Deutsch



Naturwissenschaftliche Ausbildung

seit 01.06.2003 Promotion am Institut für Biochemie, Abteilung Zelluläre Biochemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Thema „Funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen ABC-Transportkomplexes MDL1 in *Saccharomyces cerevisiae*“

01.04.2003 Abschluss: Diplom-Biochemiker an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main

01.11.2002 - 01.04.2003 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Abteilung Zelluläre Biochemie der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Thema „Charakterisierung der Aktivität des mitochondrialen ABC-Peptidtransporters MDL1p“
Betreuer: Chris van der Does, Prof. Dr. Robert Tampé

09.10.2000 Vordiplom in Biochemie

25.08.1998 - 01.04.2003 Studium der Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main

Studienbegleitende Tätigkeit

01/03/2002 – 31/03/2002 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
 05/03/2001 – 14/04/2001 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
 07/08/2000 – 22/09/2000 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
 09/08/1999 – 24/09/1999 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
 05/07/1999 – 16/07/1999 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
 22/02/1999 – 26/03/1999 Werksstudent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg

Berufliche Tätigkeit

01.07.1997 – 30.09.1998 Biologielaborantin
 Dade Behring Marburg GmbH, Marburg

Berufliche Ausbildung

01.09.1994 – 30.06.1997 Ausbildung zur Biologielaborantin
 Behringwerke AG, Marburg

Schulische Ausbildung

14.06.1994 Abschluss: Abitur
 1987 - 1994 Freiherr-vom-Stein-Schule, Europaschule, Gladenbach
 1981 - 1987 Mittelpunktschule Bad Endbach-Hartenrod

Konferenzen

11. - 13.10.2006 Symposium „Membrane Proteins 2006“,
 SFB431, 372, 628, Wiesbaden-Naurod
 16. - 21.07.2005 FASEB *Summer Research* Konferenz zum Thema
 “*Transport ATPases: Genomics, Mechanisms, & Relevance to Diseases*“, Saxtons River, Vermont, USA
 (Posterbeitrag, Auszeichnung durch Möglichkeit zum
 Kurzvortrag „*Function of the mitochondrial ABC-transporter Mdl1p of S.cerevisiae*“)
 20. - 21.05.2005 5. Transportkolloquium, Ebsdorfergrund
 15. - 16.05.2003 4. Transportkolloquium, Ebsdorfergrund