



Die Rolle von Oxa1 bei der Biogenese mitochondrialer *Carrier*

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl. Biol. **Markus Hildenbeutel**
aus Laudenschbach

(D386)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:
08. Juli 2011

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Kins
Gutachter: 1. Prof. Dr. Johannes M. Herrmann
2. Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Kaiserslautern, den

Unterschrift

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Der TOM-Komplex — Das Tor zu den Mitochondrien	2
1.2 Proteininsertion in die mitochondrialen Innenmembran	3
1.2.1 Der TIM23-vermittelte Proteinimport	3
1.2.2 Der TIM22-Komplex und seine Funktion bei der Insertion mitochondrialer <i>Carrier</i>	5
1.2.3 Die mitochondriale <i>Carrier</i> -Familie.	7
1.2.4 Die Rolle von Oxa1 bei der Proteininsertion	8
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Genetische Methoden	13
2.1.1 Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	13
2.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	13
2.1.3 Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	13
2.1.4 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	14
2.1.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	15
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	16
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.2.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	16

2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-DNA	17
2.2.6	Analytische und präparative Gelelektrophorese	17
2.2.7	Herstellung hitzeschockkompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.2.8	Plasmidtransformation durch Hitzeschock	18
2.2.9	Verwendete Plasmide und klonierte Konstrukte	18
2.3	Proteinbiochemische Methoden	20
2.3.1	Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	20
2.3.2	SDS-Gelelektrophorese	21
2.3.3	Coomassie-Blau-Färbung und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	22
2.3.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)	22
2.3.5	Autoradiographie und Densitometrie	22
2.3.6	Synthese von ³⁵ S-Methionin-markierten Proteinen <i>in vitro</i>	23
2.3.7	Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte <i>in organello</i>	23
2.3.8	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
2.3.9	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	24
2.3.10	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen durch Gel-filtration	24
2.3.11	Carbonatextraktion und Flotation von Membranproteinen	25
2.3.12	Oxidation von Cysteinen durch Kupferphenanthrolin	25
2.3.13	Quervernetzung mitochondrialer Proteine	25
2.3.14	Oxa1-Aufreinigung	26
2.3.15	Rekonstitution von His ₁₀ Oxa1 in Proteoliposomen	26
2.4	Zellbiologische Methoden	27
2.4.1	Isolierung von Mitochondrien aus Hefe	27

2.4.2	Erzeugung von Mitoplasten und Proteaseverdau	28
2.4.3	<i>In vitro</i> Import radioaktiv markierter Proteine in isolierte Mitochondrien .	28
2.4.4	Messungen des Membranpotentials	29
2.4.5	Messung der ADP-Aufnahmeaktivität	29
2.5	Immunologische Methoden	30
2.5.1	Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen	30
2.5.2	Verwendete Antikörper	30
2.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)	31
2.6	Nährmedien	31
2.7	Geräte	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Oxa1 und seine Rolle in der Biogenese von Aac2	34
3.1.1	In Abwesenheit von Oxa1 sind die Mengen verschiedener mitochondrial sowie kernkodierter Proteine stark reduziert	34
3.1.2	Mitochondrien, denen Oxa1 fehlt, haben ein deutlich verringertes Mem- branpotential	36
3.1.3	Der Austausch von Histidin 121 gegen Leucin bewirkt eine temperaturin- duzierbare Destabilisierung von Oxa1	38
3.1.4	Die <i>Oxa1ts</i> -Mutante erlaubt die Depletion von Oxa1 ohne dabei das Mem- branpotential herabzusetzen	38
3.1.5	Nach Depletion von <i>Oxa1ts</i> ist die Membraninsertion von Cox2 gestört .	41
3.1.6	Die Abwesenheit von <i>Oxa1ts</i> reduziert die Importeffizienz von Vertretern der mitochondrialen <i>Carrier</i> -Familie	42
3.1.7	Der gleichzeitige Import von F ₁ β und <i>Carrier</i> -Proteinen verdeutlicht den spezifischen Effekt von Oxa1 auf den Import der <i>Carrier</i>	45

3.1.8	Die Membraninsertion von <i>Carrier</i> -Proteinen ist Oxa1-unabhängig	46
3.1.9	Frisch importierter ADP/ATP- <i>Carrier</i> kann oxidiert werden	48
3.1.10	Die oxidierbare Übergangsform des ADP/ATP- <i>Carriers</i> ist membraninsertiert	50
3.1.11	In Anwesenheit von Oxa1 werden Mitglieder der mitochondrialen <i>Carrier</i> -Familie effizienter assembliert	51
3.1.12	Der ADP/ATP- <i>Carrier</i> aus <i>N. crassa</i> wird ebenfalls über eine Übergangsform assembliert	53
3.2	Aufreinigung und Rekonstitution von <i>S. cerevisiae</i> Oxa1	55
3.2.1	Aufreinigung von rekombinantem Oxa1 aus Bakterien	55
3.2.2	Rekombinates Oxa1 liegt als Homooligomer vor	57
3.2.3	His ₁₀ Oxa1 kann erfolgreich in Liposomen rekonstituiert werden	58
3.2.4	Das Innenmembranprotein Atp8 wird Oxa1-abhängig in rekonstituierte Liposomen inseriert	60
4	Diskussion	62
4.1	Die Rolle von Oxa1 bei der Biogenese mitochondrialer Innenmembranproteine	62
4.2	Oxa1 spielt eine bisher unbeschriebene Rolle bei der Biogenese mitochondrialer <i>Carrier</i>	63
4.2.1	Die Beteiligung von Oxa1 am Import der <i>Carrier</i> in Mitochondrien	63
4.2.2	Die Rolle von Oxa1 bei der Freisetzung von <i>Carrier</i> -Proteinen aus der TIM22-Translokase	64
4.2.3	Die Rolle von Oxa1 bei der Dimerisierung mitochondrialer <i>Carrier</i>	65
4.2.4	Die Rolle von Oxa1 als Chaperon für mitochondriale <i>Carrier</i>	67
4.2.5	Die Rolle von Oxa1 bei der <i>Carrier</i> -Biogenese – ein Modell	68
4.3	Einblicke in die Oxa1-vermittelte Proteininsertion	69
5	Zusammenfassung	72

6 Literaturverzeichnis	89
Lebenslauf	90
Danksagung	92

Abkürzungsverzeichnis

Aac	ADP/ATP-Carrier
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Atp6/8/9	Untereinheit 6/8/9 des F ₀ - Teils der F ₁ F ₀ -ATPase
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonyl-cyanid 3-chlorphenylhydrazon
Cox1/2/3	Untereinheit 1/2/3 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
Cytb/c ₁	Cytochrom <i>b/c</i> ₁
DHFR	Dihydrofolatreduktase
Dic1	Dicarboxylatcarrier
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E _{xyz}	Extinktion bei xyz nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F ₁ β	F ₁ β -Untereinheit der F ₁ F ₀ -ATPase
FG	Feuchtgewicht
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MBS	<i>m</i> -Maleimid-Benzoyl- <i>N</i> -Hydoxylsuccinimid-Ester
min	Minute
MOPS	n-Morpholinoethansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
mRNA	Boten-RNA
mt	mitochondrial
NADH	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid
<i>N. crassa</i> / <i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD _{xyz}	Optische Dichte bei xyz nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pic2	Phosphatcarrier

PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Su9	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATPase von <i>N. crassa</i>
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
ts	temperatursensitiv
U	Einheiten
wt	Wildtyp
$\Delta\psi$	Membranpotential

1 Einleitung

Ein Meilenstein der Evolution und Entstehung eukaryotischer Zellen war die Kompartimentierung durch Organellen. Damit wurden voneinander getrennte Reaktionsräume geschaffen, in denen jeweils ein einzigartiges chemisches Milieu herrscht. Die Kompartimentierung erlaubt es, dass unterschiedliche metabolische Prozesse parallel in der gleichen Zelle ablaufen und unabhängig voneinander reguliert werden können. Ungeachtet dieser Vorteile bringt diese Organisation jedoch auch große logistische Herausforderungen für die Zelle mit sich, denn nahezu alle Proteine und Enzyme der Organellen werden im Zytosol synthetisiert und müssen anschließend zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden.

Zu diesen Organellen gehören Mitochondrien, die nicht nur eine zentrale Rolle für den Stoffwechsel eukaryotischer Zellen spielen, sondern auch eine einzigartige Ultrastruktur besitzen. Diese wird durch ein System aus zwei Lipiddoppelmembranen aufrecht erhalten, wodurch sich Mitochondrien in vier Unterkompartimente – die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix – unterteilen lassen. Die Innenmembran umschließt die Matrix, welche neben einer eigenen mitochondrialen DNA auch mit einem eigenständigen Proteinsyntheseapparat ausgestattet ist. Darüber hinaus beherbergt sie die Enzyme des Krebszyklus und der β -Oxidation und ist somit für die Energiegewinnung von fundamentaler Bedeutung (Bartlett & Eaton, 2004). Die Innenmembran ist mehrfach in die Matrix hineingefaltet, wodurch die sogenannten Cristae ausgebildet werden, in denen die Atmungskettenkomplexe lokalisiert sind. Da die Innenmembran eine undurchlässige Barriere zwischen Matrix und Intermembranraum darstellt, kann die Atmungskette einen Protonengradienten über der Innenmembran aufbauen. Dies geschieht, indem die Atmungskettenkomplexe Protonen von der Matrixseite auf die Intermembranraumseite der Innenmembran transportieren. Dieser Protonengradient wird im Anschluß durch die F_1F_0 -ATPase zur Synthese von ATP genutzt (Hatefi, 1985).

Neben der Energiesynthese finden in Mitochondrien eine Reihe weiterer essentieller Stoffwechselprozesse statt. So sind diese Organellen unter anderem am Aminosäure- und dem Eisenstoffwechsel beteiligt, spielen eine wichtige Rolle für den Kalziumhaushalt der Zelle und sind ein Schlüsselement in der Regulation des kontrollierten Zelltots, der Apoptose. Bei diesen Stoffwechselwegen sind neben Matrixproteinen auch Proteine anderer mitochondrialer Kompartimente von entscheidender Bedeutung. (Ernster & Schatz, 1981; Pozzan & Rizzuto, 2000; Orrenius *et al.*, 2003; Danial & Korsmeyer, 2004; Lill, 2009).

Die mitochondriale Außen- und Innenmembran unterscheiden sich stark in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. Im Gegensatz zur impermeablen Innenmembran zeichnet sich die Außenmembran zum Beispiel durch das Vorhandensein von Porinen aus, die die Diffusion kleiner Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von fünf Kilodalton (kDa) ermöglichen (Benz, 1989). Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Membranen auch in ihrem Gehalt an Cardiolipin, einem für Mitochondrien charakteristischen Phospholipid, das in keiner sonstigen Membran eu-

karyotischer Zellen vorkommt (van Meer *et al.*, 2008). Dieses Lipid spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der strukturellen Organisation der Atmungskettenkomplexe und ist für die Funktion einer Reihe weiterer Proteine wie dem ADP/ATP-*Carrier* von entscheidender Bedeutung (Schägger & Pfeiffer, 2000; Claypool *et al.*, 2008).

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind etwa 1000 verschiedene mitochondriale Proteine bekannt (Sickmann *et al.*, 2003). Von diesen spielt ein Teil eine Rolle bei den zuvor erwähnten Stoffwechselwegen. Ein anderer Teil der Proteine übernimmt wichtige Funktionen zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Biogenese und Homöostase, wie zum Beispiel bei der Replikation der mitochondrialen DNA, der Synthese mitochondrial kodierter Proteine oder der Verschmelzung und Teilung der Mitochondrien.

Mitochondrien entstanden der Endosymbionten-Theorie zufolge aus einem ursprünglich freilebenden α -Proteobakterium, das durch ein Archaeobakterium aufgenommen wurde (Gray *et al.*, 1999, 2001; Embley & Martin, 2006). Im Laufe der Evolution wurden etwa 98% aller Gene für mitochondriale Proteine in den Zellkern transferiert (Borst & Grivell, 1978; Andersson *et al.*, 1998). Dieser Transfer machte die Entwicklung effizienter Importmechanismen notwendig, die die kernkodierten Proteine nach ihrer Synthese im Zytosol post-translational zu ihren Zielorten innerhalb der Mitochondrien transportieren und in die richtigen Subkompartimente sortieren (Herrmann, 2003; Dolezal *et al.*, 2006; Kutik *et al.*, 2009). Bis heute wurden fünf unterschiedliche Proteinkomplexe – der TOM-, TOB-, TIM22-, TIM23- und der OXA1-Komplex – beschrieben, die den Import verschiedener Proteine in die Mitochondrien vermitteln (Dukanovic & Rapaport, 2011; Rehling *et al.*, 2004; Marom *et al.*, 2011; Neupert & Herrmann, 2007; Hildenbeutel *et al.*, 2008).

Im Folgenden soll der Proteinimport in Mitochondrien genauer beschrieben werden. Der Fokus liegt hierbei auf der Insertion integraler Proteine in die mitochondriale Innenmembran.

1.1 Der TOM-Komplex — Das Tor zu den Mitochondrien

Proteine, welche in die Mitochondrien importiert werden sollen, müssen zunächst die Außenmembran passieren. Dieser Transport wird durch die Translokase der Außenmembran (*translocase of the outer membrane*, TOM-Komplex) vermittelt. Die eigentliche Importpore des TOM-Komplexes besteht aus zwei oder drei Kanälen, die von je einer Tom40-Untereinheit gebildet werden. Jede Tom40-Untereinheit durchspannt die Membran in Form eines β -barrels (Künkele *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1998; Ahting *et al.*, 2001). Für die Regulation und Assemblierung des TOM-Komplexes sowie dessen strukturelle Stabilität sind die kleinen Tom-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 von besonderer Bedeutung (Alconada *et al.*, 1995; Dembowski *et al.*, 2001; Wiedemann *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2005; Sherman *et al.*, 2005). Darüber hinaus stellt Tom5 eine Verbindung zwischen dem TOM-Kanal und den drei Rezeptoren Tom20, Tom70 und Tom22 her (Dietmeier *et al.*, 1997). Die Rezeptoren sind durch jeweils eine Transmembrandomäne in der Außenmembran verankert und besitzen je eine große zytosolische Domäne zur Erkennung der zu importierenden

Proteine. Tom20 und Tom22 haben eine ähnliche Substratspezifität und erkennen vorwiegend Proteine mit Präsequenz, aber auch einige Proteine mit interner Zielinformation wie β -barrel-Proteine (Pfanner, 2000; Saitoh *et al.*, 2007; Yamano *et al.*, 2008). Der Rezeptor Tom70 ist dagegen spezifisch an der Erkennung polytooper Innenmembranproteine wie den Mitgliedern der mitochondrialen *Carrier*-Familie (MCF) beteiligt, deren Import später im Detail beschrieben wird (Söllner *et al.*, 1990; Hines *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu Tom20 und Tom70 hat Tom22 eine zusätzliche Domäne im Intermembranraum, die, wie später beschrieben, von wichtiger Bedeutung für die Translokation der Proteine ist. Darüber hinaus spielt die Transmembrandomäne von Tom22 eine wichtige strukturelle Rolle für die Komplexbildung der TOM-Translokase (Mayer *et al.*, 1995; Schleiff *et al.*, 1999; Krimmer *et al.*, 2001; Yamano *et al.*, 2008). Mitochondriale Vorläuferproteine werden zunächst im Zytosol synthetisiert und durch Chaperone wie Hsp70 in einem ungefalteten, importkompetenten Zustand gehalten (Abbildung 1.1). Anschließend werden sie substratspezifisch durch einen der drei TOM-Rezeptoren erkannt. Tom70 erkennt darüber hinaus auch Präsequenz-bindende Chaperone wie Hsp70 und – in Säugern – Hsp90 (Young *et al.*, 2003). Auf der Intermembranraumseite bindet das Vorläuferprotein an die sogenannte *trans*-Seite des TOM-Komplexes, die durch die Proteine Tom40, Tom7 und die Intermembranraumdomäne von Tom22 gebildet wird. Die *trans*-Seite bindet Präsequenzen mit höherer Affinität als die *cis*-Seite und gewährleistet damit eine nach innen gerichtete Importbewegung (Rapaport *et al.*, 1997; Moczko *et al.*, 1997; Kanamori *et al.*, 1999; Model *et al.*, 2002).

1.2 Proteininsertion in die mitochondrialen Innenmembran

In der inneren mitochondrialen Membran sind die beiden Translokasen TIM23 und TIM22 sowie der OXA1-Komplex lokalisiert. TIM23 ist essentiell für den Import kernkodierter Matrixproteine und verantwortlich für die Insertion kernkodierter Membranproteine, die typischerweise nur eine Transmembrandomäne besitzen. Polytope Membranproteine werden dagegen vor allem durch den TIM22-Komplex von Seiten des Intermembranraums oder durch den OXA1-Komplex von Seiten der Matrix in die Innenmembran inseriert. Darüber hinaus übernimmt Oxa1 eine Schlüsselfunktion bei der ko-translationalen Insertion mitochondrial kodierter Proteine.

Die unterschiedlichen Insertions- und Translokationssysteme werden im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1 Der TIM23-vermittelte Proteinimport

Der TIM23-Komplex (*translocase of the inner membrane*) ist für den Import aller Proteine zuständig, die eine N-terminale Matrix-Zielsequenz besitzen, unabhängig davon ob sie in die Membran inseriert werden oder für den Import in die Matrix bestimmt sind. Diese Proteine werden zunächst im Zytosol synthetisiert, durch Tom20 und Tom22 erkannt und anschließend durch

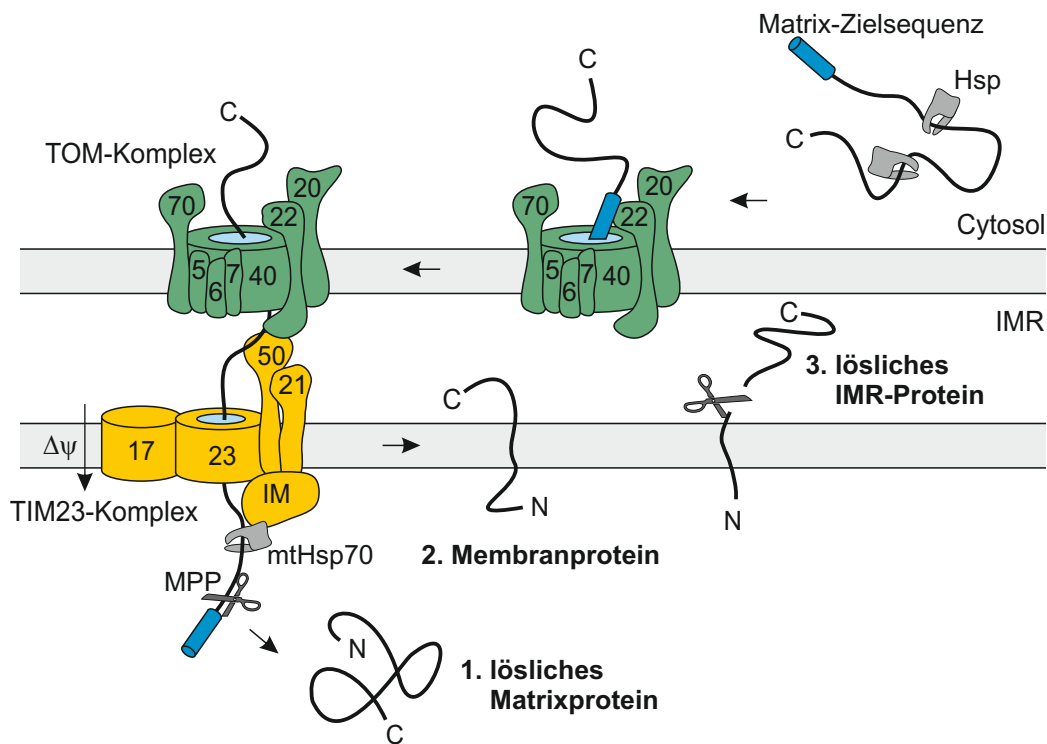


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des durch TOM und TIM23 vermittelten Imports von Proteinen in Mitochondrien. Proteine mit einer Matrix-Zielsequenz werden zunächst im Zytosol translatiert und durch die Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt. Anschließend erfolgt, vermittelt durch den TOM- und den TIM23-Komplex, der Import in die Organellen. Über diesen TIM23-vermittelten Importweg werden neben Matrixproteinen auch Innenmembranproteine und lösliche Proteine des Intermembranraum (IMR) importiert. MPP = mitochondriale Prozessierungspeptidase, IM = Import Motor.

den TOM-Komplex transloziert. Im Intermembranraum wird die Zielsequenz durch den TIM23-Komplex erkannt und das Protein noch während der Translokation durch den TOM-Komplex an den TIM23-Komplex weitergeleitet (Abbildung 1.1). Der TIM23-Komplex kann in zwei funktionell verschiedene Einheiten unterteilt werden, a) einen membranständigen Kernbereich und b) einen Motorkomplex, der die Kraft in Form von ATP für den Import der Proteine liefert.

Der Kernbereich besteht aus den vier Untereinheiten Tim23, Tim17, Tim50 und Tim21 (Emtage & Jensen, 1993; Maarse *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2002; Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003). Tim23 ist ein integrales Membranprotein aus vier Transmembrandomänen, die die eigentliche Translokationspore bilden (Lohret *et al.*, 1997; Martinez-Caballero *et al.*, 2007; Alder *et al.*, 2008), und einer großen N-terminalen Domäne im Intermembranraum, die in zwei Bereiche unterteilt werden kann. Der N-Terminus dieser Domäne steht in Verbindung mit der Außenmembran und lokalisiert so den TIM23-Komplex an den Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran (Donzeau *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2006). Der C-terminale Bereich der Intermembranraumdomäne ist dagegen unter anderem für die Erkennung von Matrix-Zielsequenzen durch den TIM23-Komplex mitverantwortlich (Bauer *et al.*, 1996). Tim17, Tim50 und Tim21 sind unter anderem an der Regulation des TIM23-Komplexes und der Erkennung von Präsequenzen beteiligt, sollen aber an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden.

Bei Matrix-Zielsequenzen handelt es sich um amphipatische Helices mit einer positiven und einer hydrophoben Halbseite (Hurt *et al.*, 1984; Horwich *et al.*, 1985). Aufgrund des über der Innenmembran aufgebauten Membranpotentials werden sie in einer Art elektrophoretischer Bewegung durch den TIM23-Komplex bewegt (Ungermann *et al.*, 1996). Die Zielsequenz des importierten Proteins interagiert auf der Matrixseite mit dem mitochondrialen Hsp70-Homolog, mtHsp70, das eine zentrale Komponente des Motorkomplexes ist (Kang *et al.*, 1990; Scherer *et al.*, 1990; Manning-Krieg *et al.*, 1991). Das durch mtHsp70 gebundene Vorläuferprotein ist nun auf der Matrixseite fixiert und kann nicht mehr zurück in den Intermembranraum rutschen. Im Folgenden geht man davon aus, dass sich, durch die Brownsche Molekularbewegung bedingt, das Vorläuferprotein immer wieder ein kleines Stück in die Matrix hineinbewegt. Die hierbei exponierten Bereiche des Proteins werden immer wieder durch mtHsp70 gebunden und so am Zurückrutschen in den Intermembranraum gehindert. Hierdurch kommt es zu einer nach innen gerichteten Bewegung des Vorläuferproteins (Okamoto *et al.*, 2002). Das Ablösen der mtHsp70-Moleküle von den importierten Substraten verbraucht ATP und ATP-Depletion stoppt daher den Proteinimport (Schneider *et al.*, 1994; Ungermann *et al.*, 1994, 1996; Geissler *et al.*, 2001). Die Matrix-Zielsequenz der importierten Proteine wird noch während des Imports durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) geschnitten (Taylor *et al.*, 2001; Gakh *et al.*, 2002; Vögtle *et al.*, 2009).

Neben löslichen Matrix-Proteinen, die über diesen Mechanismus vollständig in die Matrix importiert werden, ist der TIM23-Komplex ebenfalls für die Insertion einer Vielzahl verschiedener Membranproteine verantwortlich. Diese Proteine haben typischerweise nur eine hydrophobe Transmembrandomäne, die gleichzeitig als Stopp-Transfersignal dient, welches eine Verlangsamung der Translokation und die damit verbundene laterale Freisetzung der Transmembrandomäne in die Innenmembran zur Folge hat (Abbildung 1.1) (van Loon & Schatz, 1987; Glaser *et al.*, 1988, 1990; Meier *et al.*, 2005).

1.2.2 Der TIM22-Komplex und seine Funktion bei der Insertion mitochondrialer *Carrier*

Die Biogenese der mitochondrialen *Carrier*-Proteine wurde in den letzten Jahren ausführlich studiert und im Detail beschrieben. Der TIM22-Komplex nimmt dabei eine entscheidende Rolle ein, da er die Insertion der *Carrier* in die mitochondriale Innenmembran vermittelt. Der TIM22-Komplex besteht aus einem in die Membran eingebetteten Teil sowie einem peripheren, im Intermembranraum lokalisierten Bereich. Letzterer wird durch die kleinen Tim-Proteine Tim9, Tim10 und Tim12 gebildet (Koehler *et al.*, 1998a; Sirrenberg *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 1998b; Adam *et al.*, 1999). Die kleinen Tim-Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen acht und zwölf Kilodalton und ihre Termini bilden α -Helices aus. Die zwei α -helicalen Bereiche sind durch einen

kurzen flexiblen Bereich miteinander verbunden, sodass die kleinen Tim-Proteine eine V-ähnliche Konformation einnehmen. Der Großteil der Tim9- und Tim10-Moleküle formt lösliche hexamere Komplexe bestehend aus jeweils drei Tim9- und drei Tim10-Untereinheiten, deren flexible Bereiche in einer ringartigen Struktur zusammengelagert sind. Dieser Ring ist von den zwölf α -Helices umgeben und verleiht so den Tim9/10-Komplexen ein quallenähnliches Aussehen (Lu *et al.*, 2004; Vergnolle *et al.*, 2005a; Webb *et al.*, 2006). Tim9 und Tim10 formen nicht nur den löslichen Tim9/10-Komplex, sondern sind weiterhin in einem ähnlichen Komplex mit Tim12 zu finden. Tim12 ist seinerseits fest an den TIM22-Komplex gekoppelt (Adam *et al.*, 1999). Der membranständige Teil der Translokase umfasst die integralen Membranproteine Tim22, Tim54 und Tim18 (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997, 2000; Koehler *et al.*, 2000), wobei die Funktionen von Tim54 und Tim18 noch nicht ganz klar sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und elektrophysiologische Messungen zeigten jedoch, dass Tim22 die eigentliche Translokationspore ausbildet (Kovermann *et al.*, 2002; Rehling *et al.*, 2003). *In vivo* scheint jeder TIM22-Komplex aus zwei Tim22-Kanälen mit einem jeweiligen Durchmesser von etwa 1,6 nm zu bestehen. Jeder Kanal könnte somit theoretisch zwei α -helikale Transmembrandomänen gleichzeitig

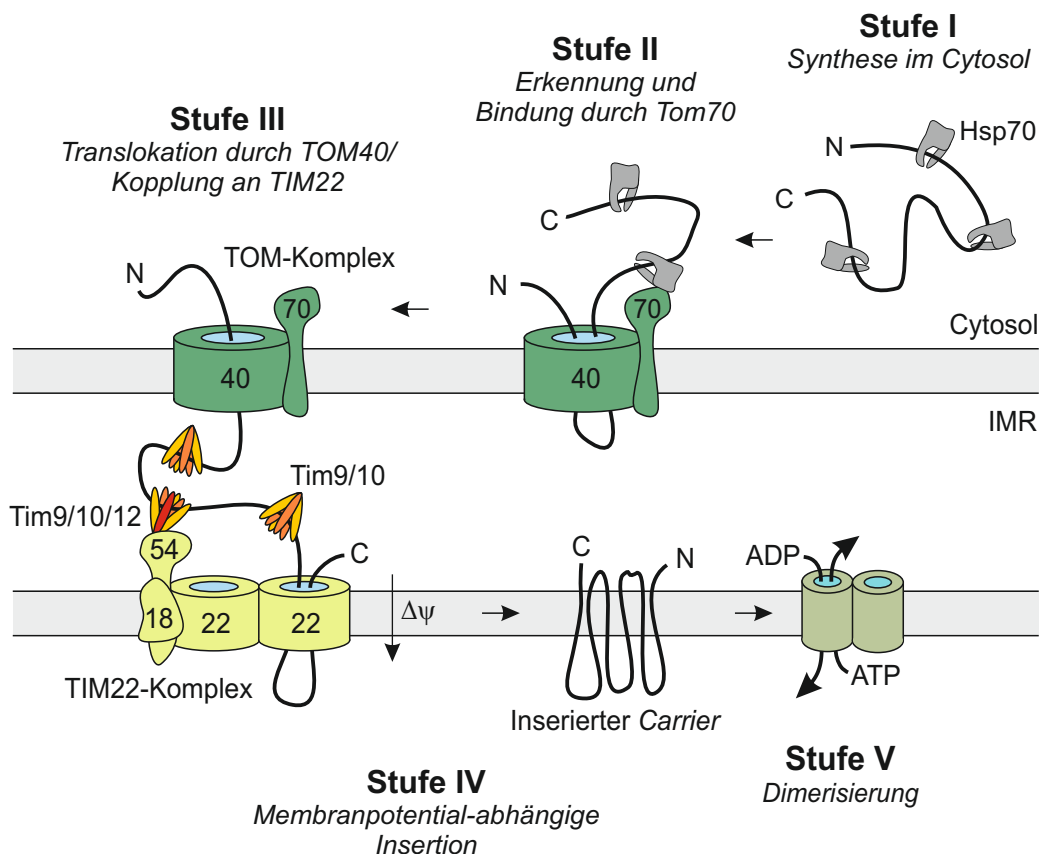


Abbildung 1.2: Modell des Imports mitochondrialer Carrier in die Mitochondrien. Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie werden zunächst im Zytosol synthetisiert. Anschließend werden sie in einem Prozess, der in fünf Stufen unterteilt wird, über den TOM-Komplex in den Intermembranraum (IMR) importiert und durch den TIM22-Komplex in die Innenmembran inseriert.

translozieren. Dies ist von zentraler Bedeutung, wenn man die einzelnen Schritte des *Carrier*-Imports genauer untersucht. Die Mitglieder der mitochondrialen *Carrier*-Familie werden im Zytosol synthetisiert und durch Hsp70 (in Hefe und Säugern) und Hsp90 (in Säugern) gebunden, wodurch die vorzeitige Faltung und Aggregation der *Carrier* verhindert wird (Abbildung 1.2, Stufe I) (Young *et al.*, 2003). Die Zielinformation der *Carrier* ist über die gesamte Polypeptidsequenz verteilt und wird spezifisch durch den Rezeptor Tom70 erkannt (Söllner *et al.*, 1990; Brix *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2003). Der Austausch von ADP gegen ATP induziert eine Konformationsänderung der gebundenen Hsp70- oder Hsp90-Moleküle, die zur Freisetzung des *Carriers* führt, welcher dann in einer schleifenartigen Konformation durch den TOM-Komplex importiert wird (Stufe II). Auf der Intermembranraumseite wird er zunächst von Tom22 gebunden, durch die anschließende Wechselwirkung mit dem Tim9/10-Komplex von diesem Rezeptor dann wieder abgelöst und durch den Intermembranraum geleitet. Die flexiblen α -helikalen Bereiche eines Tim9/10-Komplexes binden hierbei vermutlich die hydrophoben Bereiche eines *Carrier*-Moleküls und verhindern so die Aggregation der *Carrier* im Intermembranraum (Webb *et al.*, 2006). Durch die Interaktion des Tim9/10-Komplexes mit dem TIM22-assoziierten Tim12 wird der *Carrier* an die TIM22-Translokase gebunden (Stufe III) (Endres *et al.*, 1999; Truscott *et al.*, 2002; Brandner *et al.*, 2005). Die anschließende membranpotentialabhängige Insertion der *Carrier* durch den TIM22-Komplex (Stufe IV) ist bisher nur teilweise verstanden: Je zwei aufeinanderfolgende Transmembrandomänen der *Carrier* scheinen dabei positiv geladene Schleifen zu formen, die, ähnlich der Matrix-Zielsequenzen, getrieben durch das Membranpotential elektrophoretisch durch den TIM22-Kanal über die Membran bewegt werden (Nelson *et al.*, 1998; Rehling *et al.*, 2004). Interessant ist hierbei, dass im Gegensatz zum TIM23-vermittelten Import die eigentliche Membraninsertion der *Carrier* durch die TIM22-Translokase nur vom Membranpotential, nicht aber von ATP abhängig ist. Im Anschluß an die Insertion und die laterale Freisetzung in die Innenmembran werden die *Carrier* in ihre funktionelle dimere Form überführt (Stufe V). Wie genau dies vonstatten geht oder ob zusätzliche Faktoren an der Assemblierung beteiligt sind, ist bisher noch unklar.

Neben Mitgliedern der mitochondrialen *Carrier*-Familie werden Tim17, Tim23 und Tim22 durch die TIM22-Translokase in die Innenmembran inseriert (Sirrenberg *et al.*, 1996; Káldi *et al.*, 1998; Kurz *et al.*, 1999; Leuenberger *et al.*, 1999).

1.2.3 Die mitochondriale *Carrier*-Familie.

In Mitochondrien finden eine Vielzahl chemischer Reaktionen statt, deren Verlauf entscheidend von einem effizienten Austausch verschiedener Metabolite zwischen Zytosol und Mitochondrien abhängt. Im Gegensatz zur permeablen Außenmembran ist die Innenmembran selbst für kleinste Metabolite undurchlässig. Der Austausch dieser Metabolite zwischen Intermembranraum und Matrix wird vor allem durch die mitochondrialen *Carrier*-Proteine vermittelt. In der Bäckerhefe gibt

es 35 mögliche *Carrier*-Proteine, von denen jedoch nur eine kleine Zahl bisher im Detail charakterisiert wurde (Palmieri *et al.*, 2000). Alle *Carrier* haben eine ähnliche Struktur. Sie sind etwa 300 Aminosäuren lang und umfassen sechs Transmembrandomänen, die in drei aufeinanderfolgende repetitive Module aus je zwei Transmembrandomänen gegliedert sind. Auf der Matrixseite werden die zwei Transmembrandomänen eines jeden Moduls durch eine große hydrophile Schleife miteinander verbunden, während die einzelnen Module durch kurze hydrophile Bereiche im Intermembranraum verbunden sind (Walker & Runswick, 1993; Palmieri, 1994). Die Kristallstruktur des bovinen ADP/ATP-*Carriers* zeigt, dass die sechs α -helikalen Transmembrandomänen zylinderartig um eine zentrale Pore herum angeordnet sind (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; Nury *et al.*, 2005). Obwohl jedes *Carrier*-Molekül für sich alleine funktionsfähig zu sein scheint, deuten die Kristallstruktur des ADP/ATP-*Carriers* und eine Reihe weiterer experimenteller Befunde darauf hin, dass *Carrier* funktionelle Dimere ausbilden.

1.2.4 Die Rolle von Oxa1 bei der Proteininsertion

Die Membraninsertion mitochondrial kodierter Proteine. Trotz des ausgeprägten Transfers von Genen in den Zellkern im Laufe der Evolution, sind einige Gene im mitochondrialen Genom zurückgeblieben und werden durch die mitochondriale Translationsmaschinerie synthetisiert. Nahezu alle mitochondrial kodierten Proteine sind von zentraler Bedeutung, da sie Teile der Reaktionszentren der Atmungskettenkomplexe der Innenmembran darstellen. In der Hefe *S. cerevisiae* sind sieben Membranproteine mitochondrial kodiert: Cytochrom *b* (*Cytb*) der Cytochrom *c*-Reduktase (Komplex III), Cox1, Cox2 und Cox3 der Cytochrom *c*-Oxidase (Komplex IV) und Atp6, Atp8 und Atp9 der F₁F₀-ATPase (Komplex V). Darüber hinaus ist auch das ribosomale Protein Var1 im mitochondrialen Genom kodiert. Warum die Gene für diese wenigen Proteine nicht auch in den Zellkern transferiert wurden, ist nicht ganz klar. Zum einen deuten verschiedene Daten darauf hin, dass, mit Ausnahme von Var1, diese Proteine zu hydrophob für einen Import in die Organellen sind und, um ihre Aggregation zu verhindern, direkt in die Innenmembran inseriert werden müssen (Claros *et al.*, 1995). Zum anderen erlaubt die Kopplung von Proteinsynthese und Assemblierung in die Atmungskettenkomplexe eine exakte Regulation der Genexpression. Eine von der Assemblierung abhängige Genregulation mitochondrial kodierter Atmungskettenkomplexuntereinheiten wurde bereits für Cox1 beschrieben, existiert aber ebenfalls für Atp6, auch wenn die Details dieses regulatorischen Systems noch nicht hinreichend geklärt sind (Perez-Martinez *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2004; Mick *et al.*, 2007; Pierrel *et al.*, 2007; Goyon *et al.*, 2008). Zur Synthese dieser im mitochondrialen Genom kodierten Proteine besitzen Mitochondrien ein eigenes Translationssystem, dessen zentrale Komponente die mitochondrialen Ribosomen darstellen (Popot & de Vitry, 1990). Ähnlich dem Insertionsmechanismus von Proteinen in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder in die bakterielle Innenmembran werden die mitochondrial kodierten Proteine ko-translational in die Membran inseriert und folgen der sogenannten *positive-inside*-Regel (von Heijne, 1989). Dieser zufolge haben Domänen, die

über die Membran hinweg transloziert werden, eine negative Nettoladung, während die im Zytosol verbleibenden Bereiche positiv geladen sind (Rojo *et al.*, 1999; White & von Heijne, 2004; Higy *et al.*, 2004). Im Bezug auf die Ladungsverteilung mitochondrial kodierter Proteine bedeutet dies, dass Domänen mit einer negativen Nettoladung über die Innenmembran transportiert werden, während positiv geladene Domänen tendenziell in der Matrix lokalisiert sind (Gavel & von Heijne, 1992). Im Gegensatz zum Sec-Translokon des Endoplasmatischen Retikulums und der Bakterien wird die ko-translationale Insertion mitochondrial kodierter Proteine durch Oxa1, einer vergleichsweise einfachen Insertase, katalysiert.

Oxa1 wurde 1994 in zwei unabhängigen genetischen Studien identifiziert, in der Mutanten analysiert wurden, die Defekte bei der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase aufwiesen (Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994). Wenig später wurde gezeigt, dass Oxa1 (für *Oxidase assembly*) maßgeblich an der Insertion des N-Terminus der Untereinheit zwei der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox2) in die mitochondriale Innenmembran beteiligt ist (He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Oxa1 nicht nur die Insertion von Cox2 vermittelt, sondern eine wesentlich allgemeinere Rolle bei der Membraninsertion und wahrscheinlich der Assemblierung mitochondrial kodierter Proteine spielt (Altamura *et al.*, 1996; Hell *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2007). Oxa1 ist in Eukaryoten und Prokaryoten hoch konserviert und findet sich in Mitochondrien, Chloroplasten (Alb3) und Bakterien (YidC) (Bonnefoy *et al.*, 1994; Sundberg *et al.*, 1997; Yen *et al.*, 2001). Sowohl YidC als auch Alb3 spielen, ähnlich wie Oxa1, eine wichtige Rolle

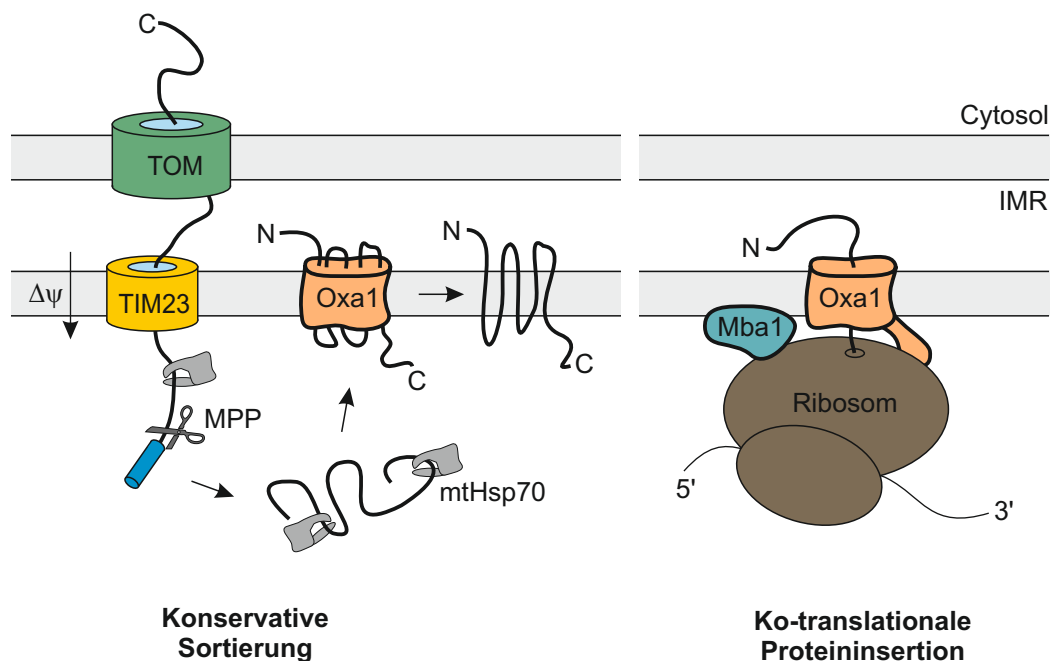


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Oxa1-vermittelten post-translationalen sowie ko-translationalen Proteininsertion. Oxa1 ist von zentraler Bedeutung bei der ko-translationalen Membraninsertion mitochondrial kodierter Proteine sowie der konservativen Sortierung kernkodierter Membranproteine. Letztere werden zunächst durch eine Matrix-Zielsequenz in die Mitochondrien importiert und in einem anschließenden Schritt durch Oxa1 von der Matrixseite aus in die Innenmembran inseriert. IMR = Intermembranraum, MPP = mitochondriale Prozessierungspeptidase.

bei der Membraninsertion verschiedener Proteine und bilden zusammen mit Oxa1 die sogenannte YidC/Oxa1/Alb3-Familie. Oxa1 selbst ist ein integrales Protein der inneren mitochondrialen Membran und durchspannt diese fünfmal. Die N-terminale Domäne von Oxa1 befindet sich im Intermembranraum, der C-Terminus in der Matrix, wo er die Bindung mitochondrialer Ribosomen vermittelt (Herrmann *et al.*, 1997; Szyrach *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2003).

Mba1 ist ein weiteres Protein, das mitochondriale Ribosomen bindet. Zusammen mit Oxa1 erlaubt es eine Positionierung der Ribosomen an der Innenmembran, die eine effiziente ko-translationale Membraninsertion gewährleistet (Abbildung 1.3) (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006). Die Bedeutung dieser beiden Proteine zeigt sich vor allem darin, dass sowohl Oxa1 als auch Mba1 bereits sehr früh während der Translation naszierende Polypeptidketten kontaktieren (Hell *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2001). Deletiert man Oxa1, akkumulieren mitochondriale Translationsprodukte in der Matrix und werden dort abgebaut (He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997, 2001; Fiumera *et al.*, 2007). Eine Insertasefunktion von Mitgliedern der YidC/Oxa1/Alb3-Familie wird auch durch Studien mit aufgereinigtem YidC verdeutlicht (Serek *et al.*, 2004; van der Laan *et al.*, 2004a). In Proteoliposomen rekonstituiert war rekombinantes YidC in der Lage, einfache Substratproteine wie zum Beispiel die F_0c Untereinheit der F_1F_0 -ATPase in die Membran zu inserieren. Der molekulare Mechanismus der YidC/Oxa1/Alb3-vermittelten Proteininsertion ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt.

Oxa1-abhängige Assemblierung von Membranproteinen. Neben der Funktion als Insertase scheint Oxa1 auch an der Faltung und/oder Assemblierung mitochondrial kodierter Proteine beteiligt zu sein. Beispielsweise assoziiert Oxa1 mit dem mitochondrial kodierten Protein Atp9 und stimuliert dessen erfolgreichen Einbau in den F_0 -Teil der F_1F_0 -ATPase (Jia *et al.*, 2007). Daten, die mit menschlichen Mitochondrien gesammelt wurden, deuten weiterhin auf eine dauerhafte Assoziierung von Oxa1 mit der F_1F_0 -ATPase hin (Stiburek *et al.*, 2007). Für eine mögliche Beteiligung von Oxa1 an der Faltung und/oder Assemblierung verschiedener Proteine sprechen auch Daten des bakteriellen Oxa1-Homologs YidC, das eine zentrale Rolle bei der Faltung und Topogenese der Laktose-Permease (LacY) spielt (Nagamori *et al.*, 2004). Die genaue Funktion und der Mechanismus der Oxa1-vermittelten Proteinfaltung und/oder Assemblierung ist bisher jedoch ebenfalls völlig unklar.

Die Membraninsertion konservativ sortierter Proteine. Neben seiner tragenden Rolle bei der ko-translationalen Proteininsertion mitochondrial kodierter Proteine, ist Oxa1 auch an der Insertion einiger kernkodierter Proteine beteiligt. Diese Proteine, darunter Oxa1 selbst, Cox18/Oxa2 oder Untereinheit 9 der F_1F_0 -ATPase (Su9) in *Neurospora crassa*, verfügen über eine Matrix-Zielsequenz und werden zunächst über den TOM- und TIM23-Komplex in die Matrix transloziert. Hier werden sie durch mtHsp70 gebunden, wodurch ihre Aggregation in der Matrix verhindert wird, und anschließend in einem Oxa1-vermittelten Schritt in die Innenmembran inse-

riert (Rojo *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 1997; Funes *et al.*, 2004). Die eigentliche Membraninsertion dieser Proteine scheint membranpotentialabhängig zu sein und ähnlich der TIM22-abhängigen Proteininsertion zu funktionieren. So tragen Domänen, die von der Matrixseite aus in den Intermembranraum transportiert werden, eine negative Nettoladung, durch die sie vermutlich elektrophoretisch über die Membran hinweg bewegt werden (Herrmann *et al.*, 1995, 1997; Herrmann & Bonnefoy, 2004). Dieser zweistufige Prozess der Membraninsertion kernkodierter Proteine ist vermutlich ein Relikt des bakteriellen Ursprungs der Mitochondrien. So spiegelt die Insertion dieser kernkodierten Proteine von Seiten der Matrix in die Innenmembran deren ursprüngliche Insertionsweise, ausgehend vom Zytosol der Proteobakterien in deren Innenmembran, wider und wird als konservativer Sortierungsweg bezeichnet (Hartl *et al.*, 1986). Die genaue Funktion, die Oxa1 bei der Insertion konservativ sortierter Proteine übernimmt, ist allerdings unklar.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Bedeutung von Oxa1 für die Insertion von kern- und mitochondrial kodierten Proteinen in die mitochondriale Innenmembran ist gut dokumentiert, der molekulare Mechanismus der Oxa1-vermittelten Proteininsertion dagegen völlig unklar. Darüber hinaus ist die Rolle von Oxa1 bei der Insertion kernkodierter Proteine nur an wenigen Beispielen untersucht worden. Die Basis für diese Arbeit war der Befund, dass die Deletion von Oxa1 in *Saccharomyces cerevisiae* eine starke Reduktion der Menge des mitochondrialen ADP/ATP-*Carrier*s hervorruft. Sowohl der Import als auch die Insertion von Vertretern der mitochondrialen *Carrier*-Familie in die Innenmembran ist bisher detailliert charakterisiert, eine Beteiligung von Oxa1 wurde hierbei jedoch bisher nicht beschrieben. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war daher die Aufklärung der Funktion von Oxa1 bei der Insertion mitochondrialer *Carrier*. Hierzu sollte nicht nur eine mögliche Rolle von Oxa1 bei der Insertion verschiedener *Carrier* untersucht, sondern auch die Frage beantwortet werden, ob Oxa1 eine Rolle bei späteren Biogenese-Schritten wie der Assemblierung übernimmt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein System etabliert werden, um den molekularen Mechanismus der Oxa1-vermittelten Proteininsertion unabhängig von der komplexen Proteinzusammensetzung der mitochondrialen Innenmembran untersuchen zu können. Zu diesem Zweck sollte zunächst die effiziente Aufreinigung von rekombinantem Oxa1 aus *Escherichia coli* etabliert und dieses dann in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Mittels dieser Oxa1-Proteoliposomen lassen sich nun verschiedene Aspekte der ko-translationalen Oxa1-vermittelten Proteininsertion *in vitro* untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Für die Amplifikation von Plasmiden während der Klonierungsprozesse wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Φ 80, *lacZ* Δ M15 Δ [*lacZYA-argF*] U196, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r⁻ m⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*) verwendet.

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte mittels des Stamms BL21(DE3) (F⁻ ompT, gal, dcm, lon, *hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [*lacI*, *lacUV5-T7 gene 1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*])). Dieser Stamm besitzt eine chromosomale Kopie des IPTG-induzierbaren T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist deshalb zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors geeignet. Diesen Zellen fehlen außerdem die Proteasen Lon und OmpT, was zu einer Stabilisierung der überexprimierten Proteine führt.

2.1.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Kulturen wurden auf LB-Agar-Platten im Kühlschrank gelagert. Vor der Verwendung der Zellen wurden diese bei einer Temperatur von 37°C unter Schütteln in LB- oder TB-Medium angezogen. Zur Selektion auf transformierte Plasmide wurde das Nährmedium mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml Ampicillin oder Kanamycin versetzt. Die Zusammensetzung aller verwendeter Medien ist in Abschnitt 2.6 aufgelistet

2.1.3 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und generierten Stämme der Bäckerhefe sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Referenz
w303-1A	Mat a; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>can1-100</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i>	(Rothstein, 1983)
Δ Oxa1	Mat a; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>can1-100</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>OXA1::His3</i>	(Hell <i>et al.</i> , 1998)
Δ Oxa1 + <i>pOxa1ts</i>	Mat a; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>can1-100</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>OXA1::His3</i> , <i>Oxa1H121L</i>	Diese Arbeit
Δ Crd1	BY4742; Mat a; <i>his3D1</i> ; <i>leu2D0</i> ; <i>lys2D0</i> ; <i>ura3D0</i> ; <i>YDL142c::kanMX4</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)

Tabelle 2.1: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

2.1.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Für die Kultur von Hefezellen wurden verschiedene Voll- bzw. Selektivmedien verwendet, deren genaue Zusammensetzung in Abschnitt 2.6 aufgelistet ist.

Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* wurden von einer Agarplatte angeimpft und unter Schütteln in Erlenmeyerkolben bei 25°C (wenn nicht anders angegeben) in YP-Medium (supplementiert mit 2% einer fermentierbaren [Glukose, Galaktose] oder einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle [Glycerin]) oder auf Laktat-Medium angezogen. Durch wiederholtes Passagieren wurden die Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₅₉₅ 0,1-1,5) gehalten. Zur Isolation von Mitochondrien (siehe Abschnitt 2.4.1), wurde hierbei das Volumen stetig erhöht.

Zur Herstellung von Glycerin-Stammkulturen wurden mit einer Impföse Hefezellen von einer dicht bewachsenen Agarplatte in 1 ml 15%-iges Glycerin überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Anzucht aus Glycerin-Stammkulturen wurden diese auf einer Agar-Platte ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.1.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz & Woods, 2002).

Hierzu wurden 20 ml YPD-Medium mit dem gewünschten Hefestamm angeimpft und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 angezogen. Anschließend wurden 2 ml der Kultur durch Zentrifugation bei 16 000 · g für 30 Sekunden (RT) geerntet, in sterilem Wasser gewaschen und in 0.1 M sterilem Lithiumacetat für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch erneute Zentrifugation (16 000 · g, 30 s, RT) isoliert und in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurden die Hefen mit 240 µl 50% [w/v] Polyethylenglycol-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat,

5 μl hitzedenaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) und 5 μl DNA (500-1000 ng/ μl) versetzt. Nach kräftigem Mischen wurden die Proben für 45 Minuten bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Selektion positiver Transformanden wurden die Hefen zentrifugiert (16 000 · g, 2 min, RT), in 100 μl ddH₂O resuspendiert und auf Selektivmedium ausgestrichen. Die Platten wurden 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Die Identität der Klone wurde durch PCR (siehe Abschnitt 2.2.3) oder mittels Proteinextraktion und Immunoblots (siehe Abschnitte 2.3.1 und 2.5.3) bestätigt. Für die PCR-Reaktionen wurden einzelne auf einer Selektivplatte wachsende Kolonien in 2 μl Sphäroplastierlösung (5 mg/ml Zymolyase; 0,6 M Sorbitol; 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 30°C wurde dieser Ansatz direkt für die PCR Reaktion verwendet. Diese wurde mit einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C begonnen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder im großen (präparativ) oder im kleinen Maßstab (analytisch). Kleine Mengen DNA wurden durch alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979) gewonnen.

Hierzu wurden Einzelkolonien in 3 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1,5 ml Kultur wurden für eine Minute bei 10 000 · g (RT) sedimentiert und in 50 μl ddH₂O resuspendiert. Durch Zugabe von 300 μl Lösung A (0,1 N NaOH; 0,5% SDS; 1 mM EDTA) wurden die Bakterien bei Raumtemperatur lysiert. Nach 5 Minuten wurde die Lyse durch Zugabe von 150 μl Lösung B (3 M Natriumacetat, pH 4,5) gestoppt. Sowohl präzipitierte Proteine als auch chromosomale DNA wurden bei 16 000 · g für 10 Minuten bei 4°C abgetrennt. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit dem zweifachen Volumen Ethanol (96%) versetzt und die Plasmid-DNA für 15 Minuten bei -20°C gefällt. Diese wurde durch Zentrifugation bei 16 000 · g für 30 Minuten (4°C) isoliert. Nach Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die gefällte Plasmid-DNA in 50 μl sterilem ddH₂O aufgenommen.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden laut Herstellerangaben mittels des Pure-Yield™ Midi-prep Kit von Promega präpariert.

Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Extinktion gegen Wasser bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}) bestimmt. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger bzw. 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ einzelsträngiger DNA. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurde der gewünschte Hefe-Stamm in 20 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 · g, RT) geerntet, in 2 ml Lysepuffer (2% [v/v] Triton X-100; 1% [w/v] SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert und in Anwesenheit von Glaskügelchen (Durchmesser 2 mm) durch kräftiges Mischen auf einem *Vortex* mechanisch aufgeschlossen. Das Lysat wurde im Anschluss mit 2 ml Phenol gemischt und bei 5.000 · g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 1 ml Phenol und 1 ml Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert (5.000 · g, 10 min, RT). Die obere Phase wurde erneut abgenommen und die DNA nach Zugabe von 1 ml Chloroform durch Zentrifugation extrahiert. Erneut wurde die obere Phase abgenommen und die DNA durch Zugabe von 200 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 5 ml Ethanol (96%) für 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 19 000 · g für 30 Minuten bei 4°C sedimentiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet (etwa 5 min), in 250 µl ddH₂O aufgenommen und in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Einzelne Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden als DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Als Primer dienten hierbei Oligodesoxynukleotide mit einer mindestens 18 Basen langen, zur Matrizen-DNA komplementären Sequenz. Eine Standard-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, enthielt 5 µl Reaktionspuffer (10 · Pwo Reaktionspuffer, Peqlab), 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) und 20 pmol von jedem Primer. Als Matrize dienten ca. 100 ng genomische Hefe-DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte durch 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Peqlab) in 25-30 Temperaturzyklen. Jeder Zyklus bestanden aus dem Schmelzen der DNA bei 95°C für 30 Sekunden, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide an die Matrizen-DNA bei 48-64°C (normalerweise 2°C unter T_m) für 90 Sekunden und Synthese der DNA bei 68°C für 1,5-2 Minuten pro 1000 Basenpaare. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 5- minütigen Nachinkubation bei 68°C die DNA-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNA Fragmente wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde gemäß der folgenden Formel berechnet: $(\frac{G}{C} \cdot 4 + \frac{A}{T} \cdot 2) - 4$

2.2.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide sowie die Identifizierung positiver Klone nach der Neukonstruktion von Plasmiden wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsen-

donukleasen verdaut.

Der Verdau zur Klonierung wurde im präparativen Maßstab in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Je 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme wurden zu dem vom Hersteller empfohlenen 10 · Puffer mit 2-5 µg DNA und sterilem Wasser gegeben. Die Reaktionen wurden zwischen 2 und 15 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

Der Verdau zur Identifizierung positiver Klone erfolgte im analytischen Maßstab und erfolgte mit je 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 500-1000 ng DNA-Lösung in 20 µl Gesamtvolumen. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur. Im Anschluss an die Restriktion wurden die Ansätze der präparativen bzw. analytischen Gelelektrophorese unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.6).

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-DNA

Für die Neukonstruktion von Plasmiden wurden die durch Verdau mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft.

Die Reaktion wurde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 50-200 ng DNA des durch Restriktionsverdau linearisierten Vektors mit dem fünffachen Überschuss an verdautem DNA-Fragment gemischt und bei einer Temperatur von 12°C über Nacht inkubiert.

2.2.6 Analytische und präparative Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von PCR-Fragmenten und linearisierter Plasmid-DNA durchgeführt.

Abhängig der erwarteten Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit 1-1,5% Agarose in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 40 mM Tris/Acetate, pH 7,5) verwendet. Die Agaroselösung wurde vor dem Gießen der Gele mit ca. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit 10 · Auftragspuffer (30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen geladen. Falls die Proben störende RNA enthielten, wurde ein 5 · Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml Rnase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 10 V/cm² durchgeführt. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Aufreinigung präparativ verdauter DNA-Fragmente bzw. amplifizierter DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel) nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

Die Konzentration der DNA wurde bei 260 nm, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, bestimmt.

2.2.7 Herstellung hitzeschockkompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung hitzeschockkompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₅₉₅ von 0,6 wurde die Kultur bei 1000 · g (4°C) für 10 Minuten sedimentiert, in 40 ml eisgekühltem Tfb1 (30 mM Kaliumacetat; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂; 12% (w/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000 · g, 4°C, 10 min) re-isoliert, in 4 ml Tfb2 (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 12% (w/v) Glycerin) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die hitzeschockkompetenten *E. coli* Zellen wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Plasmidtransformation durch Hitzeschock

Zur Transformation hitzeschockkompetenter Bakterien wurden ca. 50 µl Zellen mit 1 µl gereinigter Plasmid-DNA bzw. mit 10 µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt 2.2.5) versetzt und zur Anlagerung der DNA an die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 Minuten bei 42°C hitzegeschockt, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und zur Selektion positiver Transformanden auf LB-Platten mit geeignetem Selektionsmarker (üblicherweise Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.9 Verwendete Plasmide und klonierte Konstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine wurden die Vektoren pGem3 und pGem4 (Promega) verwendet. Hierzu wurden die jeweiligen Leserahmen (*open reading frame*) der Gene so in die Vektoren ligiert, dass sie unter die Kontrolle des SP6-Promotors exprimiert werden. Die Expression von Genen in *S. cerevisiae* erfolgte mittels des Plasmids pRS314 (Invitrogen). Die Gene wurden so kloniert, dass sie unter Kontrolle der endogenen Promotor- und Terminatorsequenz stehen. Rekombinates Oxa1 wurde mittels des Vektors pEH1 exprimiert (Backert *et al.*, 1998).

Die Strategien für die in dieser Arbeit klonierten Plasmide sind weiter unten näher erläutert.

Plasmid	Kodiertes Protein	Vektor	Referenz
pOxa1	Oxa1 <i>S. cerevisiae</i>	pRS314	Soledad Funes
pOxa1ts	Oxa1ts <i>S. cerevisiae</i>	pRS314	Diese Arbeit
pAac2-Sc	Aac2 <i>S. cerevisiae</i>	pGem3	Diese Arbeit
pAac2-Nc	Aac2 <i>N. crassa</i>	pGem4	AG Neupert (München)
pDic1	Dic1 <i>S. cerevisiae</i>	pGem3	Diese Arbeit
pPic2	Pic2 <i>S. cerevisiae</i>	pGem3	Diese Arbeit
pF ₁ β	F ₁ β <i>S. cerevisiae</i>	pGem4	(Cyr <i>et al.</i> , 1993)
pSu9 ¹⁻⁶⁹ - DHFR	Su9 ¹⁻⁶⁹ <i>N. crassa</i> fusioniert mit <i>Mus musculus</i> Dihydrofolatreduktase	pGem4	AG Neupert (München)
pEH-Oxa1	His ₁₀ -TEV-Oxa1 ⁴³⁻⁴⁰² <i>S. cerevisiae</i>	pEH1	Diese Arbeit

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide

Klonierung von pOxa1ts. Die Mutation H121L wurde durch punktbezogene Mutagenese (*site directed mutagenesis*) in Oxa1 eingeführt. Hierzu wurde mit den Primern MH-64 und MH-65 eine PCR-Reaktion (siehe Abschnitt 2.2.3) auf das Plasmid pOxa1 gemacht. Die PCR-Reaktion wurde mit DpnI (NEB) verdaut und im Anschluss direkt in hitzekompetente *E. coli* DH5α transformiert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt.

MH-64: 5'-caa cac gtc ttg gag gcc gtt CTG gtt tac tct ggg ttg cct tgg

MH-65: 5'-cca agg caa ccc aga gta aac CAG aac ggc ctc caa gac gtg ttg

Klonierung von pAac2-Sc. Das Gen, welches den ADP/ATP-Carrier Aac2 kodiert, wurde durch PCR mittels der Primer MH-133 und MH-134 aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment wurde nach Restriktionsverdau mit den Enzymen KpnI und Sall in den Vektor pGem3 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Aus einzelnen Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und die erfolgreiche Klonierung von pAac2 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

MH-133: 5'-ccc ggt acc gcc aga tta gac tta ttt gaa c

MH-134: 5'-ggg gtc gac cca tgt ctt cca acg ccc

Klonierung von pDic1 und pPic2. Die Gene für die *Carrier*-Proteine Dic1 und Pic2 wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert. Für Dic1 wurden die Primer MH-128 und MH-129 und für Pic2 das Primerpaar MH-124 und MH-125 verwendet. Die PCR-Fragmente und der Vektor pGem3 wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und KpnI verdaut und anschließend ligiert. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsverdau sowie Sequenzierung geprüft.

MH-124: 5'-ggg aag ctt cag ttg taa agc atg gag tc

MH-125: 5'-ccc ggt acc cga tca gct aac cgg tgg

MH-128: 5'-ggg aag ctt gct gga cgg cat gtc aac c

MH-129: 5'-ccc ggt acc ctg cct agt tgt ctt cc

Klonierung von pEH-Oxa1. Der Vektor pEH-Oxa1 wurde in drei Schritten kloniert. Zunächst wurde ein His₆-Tag gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle in die *multiple cloning site* inseriert. Hierzu wurden die Primer MH-57 und MH-58 aneinander angelagert und so zu doppelsträngiger DNA komplementiert. Das hierbei entstandene Fragment mit NcoI und XbaI Überhängen wurde durch die T4 Polynukleotid Kinase phosphoryliert und in den Vektor pEH1 kloniert. Anschließend wurde Oxa1 durch PCR mittels der Primer MH-34 und MH-59 vom Plasmid pOxa1 amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und in den Vektor pEH1-His₆-TEV ligiert. Da His₆-TEV-Oxa1 nicht an Nickel-*beads* gebunden werden konnte, wurde der Tag von Sebastian Falk (AG Sinning, BZH, Heidelberg) durch PCR auf 10 Histidin-Reste aufgefüllt. Im Restriktionsverdau als positiv identifizierte Klone wurden durch Sequenzierung bestätigt.

MH-57: 5'-c atg gca cac cat cac cat cat cat gga tcc ggg aag ctt ggg t

MH-58: 5'-c tag acc caa gct tcc cgg atc cat gat gat ggt gat ggt gtg c

MH-59: 5'-ggg ggt acc gag aat ctc tac ttc caa tct aat tgc acg ggc cca aat gc

MH-34: 5'-ggg gag ctc tca ttt ttt gtt att aat gaa gtt tg

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Die quantitative Isolation der Gesamtproteinfraktion aus *S. cerevisiae* erfolgte durch alkalische Extraktion. Hierzu wurden 2 ml einer Übernachtskultur mit einer OD₅₉₅ von 0,5 geerntet und in ddH₂O einmal gewaschen. Das Zellpellet wurde in 250 µl ddH₂O aufgenommen und durch Zugabe von 50 µl Lysepuffer (1,85 M NaOH; 1058 mM β-Mercaptoethanol; 100 mM PMSF) für 15

Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 75 μ l 72% TCA für 20 Minuten auf Eis gefällt und durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 25 000 \cdot g sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Aceton gewaschen und erneut für 15 Minuten bei 25 000 \cdot g zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine wurden in 100 μ l Laemmli-Ladepuffer durch kräftiges Schütteln bei 70°C für 10 Minuten gelöst. Zur Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE wurden 20-30 μ l Probe verwendet.

Die schnellere, nicht-quantitative, Isolierung des Gesamtproteins aus Hefe erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kushnirov *et al.* (Kushnirov, 2000). Hierzu wurde 1 ml Zellen einer Übernachtskultur mit einer OD₅₉₅ von 1 durch Zentrifugation (16 000 \cdot g, 30 s, RT) geerntet und in 25 μ l Laemmli-Ladepuffer resuspendiert. Durch Zugabe einer Spatelspitze Glaskügelchen (0,5 mm Durchmesser) und einminütigem kräftigem Schütteln mittels eines *Vortex* wurden die Zellen durch mechanische Scherkräfte geöffnet und die Proteine freigesetzt. Im Anschluss wurden die Proben 2 Minuten bei 95°C gekocht und durch weitere 75 μ l Laemmli-Ladepuffer auf ein Endvolumen von 100 μ l eingestellt. Zur Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE wurden 20-30 μ l Probe verwendet.

2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden mittels vertikaler, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Gele, bestehend aus Sammelgel, Trenngel und Bodengel, wurden zwischen zwei Glasplatten von 160 \cdot 180 mm (durch Abstandshalter von 1 mm Dicke getrennt) gegossen. Die verschiedenen Gellösungen setzten sich wie folgt zusammen:

- **Sammelgel:** 5% Acrylamid; 0,03% Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,1% TEMED)
- **Trenngel (12%/0.8%):** 12% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)
- **Trenngel (16%/0.2%):** 16% Acrylamid; 0,2% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)
- **Bodengel:** 12% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben in 1 \cdot Laemmli-Ladepuffer (60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% DTT; 10% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen. Der Gellauf und die Trennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1% SDS) bei 25 mA für 2-3 Stunden. Als Molekulargewichtsstandard diente ein Größenmarker der Firma Peqlab. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Proteine

entweder auf Nitrocellulose (siehe Abschnitt 2.3.4) überführt oder die Gele mittels Coomassie (siehe Abschnitt 2.3.3) gefärbt.

2.3.3 Coomassie-Blau-Färbung und Trocknen von Polyacrylamid-Gelelen

Der Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen im SDS-Gel erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Blau in essigsaurer Methanollösung. Dazu wurde das Trenngel mindestens 60 Minuten in Färbelösung (30% Methanol; 10% Eisessig; 0,1% Coomassie-Blau-R) gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gespült und in Entfärbelösung (30% Methanol; 10% Eisessig) entfärbt. Das Gel wurde auf ein Whatman-Papier überführt und mittels einer Geltrockenapparatur bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)

Für den immunologischen Nachweis bzw. zur Detektion radioaktiv markierter, im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (siehe Abschnitt 2.3.2), wurden die SDS-Polyacrylamidgele nach der sogenannten *Semi-Dry*-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden 2 Whatmanpapiere, die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und 2 weitere Whatmanpapiere mit Blotpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol) durchtränkt, in dieser Reihenfolge aufeinander gestapelt und in die *Semi-Dry*-Blotkammer (BioRad) eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 Stunden bei 1,33 mA/cm² Gel. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden durch Färbung in Ponceau-Lösung (0,2% Ponceau; 3% Trichloressigsäure (TCA)) sichtbar gemacht. Zur Detektion von Radioaktivsignalen wurde die Membran getrocknet und die Proteine mittels Autoradiographie detektiert (siehe Abschnitt 2.3.5). Für die immunologische Detektion von Proteinen wurde die Membran in Wasser entfärbt und wie im Abschnitt 2.5.3 näher erläutert behandelt.

2.3.5 Autoradiographie und Densitometrie

Nitrozellulose-Membranen mit radioaktiv markierten Proteinen wurden nach Trocknen unter Schutzlicht auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte, je nach Signalstärke, nach einer Exposition von 16 Stunden bis 3 Wochen. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mittels eines *Scanners* (Epson) digitalisiert. Zur Quantifizierung der Radioaktivsignalstärke einzelner Banden wurde das Programm ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) verwendet.

2.3.6 Synthese von ³⁵S-Methionin-markierten Proteinen *in vitro*

Um ³⁵S-markierte Proteine *in vitro* zu synthetisieren, wurden in pGEM3 oder pGEM4 klonierte Gene mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert (Pelham & Jackson, 1976).

Die Transkription wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt und enthielt 10 µl 5 · Transkriptionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 8.0; 60 mM MgCl₂; 10 mM Spermidin), 10 µl DTT (100 mM), 16 µl m⁷G(5')ppp(5')G (800 mM), 20 µl Ribonukleotide (jeweils 10 mM), 1 µl RNasin (40 U/µl), 5-10 ng Plasmid-DNA und 2 µl SP6-RNA-Polymerase (50 U/µl, Biozym). Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 40°C inkubiert und die RNA im Anschluss durch Zusatz von 10 µl Lithiumchlorid (10 M) und 300 µl Ethanol (96%) durch Zentrifugation (30 min, 30 000 · g, 4°C) gefällt. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl ddH₂O mit 2 µl RNasin gelöst.

Um Proteine *in vitro* zu translatieren, wurden 15 µl der *in vitro* synthetisierten mRNA, 10 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 200 µM) und 4 µl ³⁵S-Methionin (Perkin Elmer) mit 71 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat gemischt. Die Reaktion wurde 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl nicht radioaktives Methionin (200 mM) zugeben und für weitere 5 Minuten inkubiert, um naszierende Polypeptidketten fertig zu synthetisieren. Die Reaktion wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.7 Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte *in organello*

Mitochondrial kodierte Proteine wurden wie folgt in isolierten Mitochondrien (siehe Abschnitt 2.4.1) in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem-Methionin *in organello* synthetisiert (Poyton *et al.*, 1996): Eine Standardreaktion enthielt 50 µg isolierte Mitochondrien und 40 µl 1,5 · Translationspuffer (0,9 M Sorbitol; 225 mM KCl; 22,5 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 19,5 mM MgSO₄; 6 mM ATP; 0,75 mM GTP; 7,5 mM α-Ketoglutarat; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat; 225 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin; 30 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 µg/ml Pyruvatkinase). Der Ansatz wurde 2 Minuten vorinkubiert und nach Zugabe von ³⁵S-Methionin (10 µCi) bei 16°C für 15-60 Minuten weiterkubiert. Die *in organello*-Translation wurde durch Zugabe von 3 µl Methionin (200 mM) und 3 µl Puromycin (1 mg/ml) gestoppt, die Mitochondrien in 1 ml SH-Puffer gewaschen und in 25 µl 1 · Laemmli-Ladepuffer resuspendiert. Für die anschließende Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden 16%/0.2%ige Gele verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2). Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben für 10 Minuten bei 37°C geschüttelt, jedoch nicht bei 96°C gekocht, um die Aggregation der synthetisierten, vorwiegend hydrophoben Membranproteine zu vermeiden.

2.3.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem BioRad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers. Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit einem vorgefertigten Proteinstandard (Immunglobulin G [0; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml], BioRad) erstellt. Alle Proben wurden mit einer 1:5 Verdünnung des Bradford-Reagenz versetzt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktionen bei 595 nm gemessen. Anhand der Eichgerade lässt sich die Proteinkonzentration der Probe relativ zu ihrem Extinktionswert berechnen.

2.3.9 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Um Proteine denaturierend zu fällen wurde die Proteinlösung auf 14% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde im Anschluss für 30 Minuten bei 25 000 · g und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 1 ml Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (15 min bei 25 000 · g und 4°C) für 5 Minuten bei 37°C getrocknet. Die Proteine wurden zunächst durch Zugabe von SDS-Ladepuffer für 10 Minuten unter kräftigem Schütteln bei 70°C resuspendiert und anschließend kurz bei 96°C aufgeköcht.

2.3.10 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen durch Gelfiltration

Die molekulare Größe nativer Proteinkomplexe wurde durch Gelfiltrations-Chromatographie bestimmt. Hierzu wurde entweder gereinigtes Protein in Lysepuffer (1% DDM; 150 mM KCl; 20 mM Hepes/KOH, pH 7,3; 1 mM PMSF) auf 200 µl verdünnt oder 1 mg der entsprechenden Mitochondrien wurde in Lysepuffer zu einer finalen Konzentration von 5 mg/ml resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C unter Schütteln lysiert. Unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation (100 000 · g, 2°C, 30 min) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer (0,1% DDM; 150 mM KCl; 20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 1 mM PMSF) äquilibrierte Superose12-Gelfiltrationssäule (GE-Healthcare) aufgebracht. Alle Läufe wurden mit einem ÄKTA-System (GE-Healthcare) bei 4°C und einer Flussrate von 0,3-0,5 ml/min durchgeführt. Die Lauflänge betrug jeweils 1,5 Säulenvolumen. Es wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt und die Proteine mit TCA gefällt (siehe Abschnitt 2.3.9). Alle Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert (siehe Abschnitte 2.3.2 und 2.3.4). Das Molekulargewicht der Proteinkomplexe wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die mit folgenden Proteinen ermittelt wurde: Thyroglobulin G (669 kDa), Apoferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (75 kDa), Ovalbumin (44 kDa).

2.3.11 Carbonatextraktion und Flotation von Membranproteinen

Um Membranproteine von membranassoziierten oder löslichen Proteinen zu trennen, wurden isolierte Mitochondrien (siehe Abschnitt 2.4.1) oder Proteoliposomen in Extraktionspuffer aufgenommen (0,1 M Natriumcarbonat; 1 M Harnstoff) und anschließend durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 12°C wurden die Proben auf 1,6 M Saccharose eingestellt und mit einer 1,2 M sowie einer 0,5 M Saccharoselösung überschichtet. Im Anschluss wurden die Membranen durch Zentrifugation für 16 Stunden bei 160 000 · g und 4°C in einem SW 65 Ti-Rotor (Beckman-Coulter) floriert. Danach wurde der Stufengradient fraktioniert und die Proteine der acht Fraktionen mit 14% TCA gefällt (siehe Abschnitt 2.3.9) oder direkt mit 4 · Ladepuffer versetzt. Proteinaggregate am Boden des Zentrifugenröhrchens wurden in SDS-Ladepuffer resuspendiert.

2.3.12 Oxidation von Cysteinen durch Kupferphenanthrolin

Mittels einer Mischung aus Kupfer-II-Sulfat und 1,10-Phenanthrolin (Cu(OP)_2) können Thiole benachbarter Cysteine in *steady state*- oder frisch importierten, radioaktiv markierten Proteinen oxidiert werden. Die Reaktion wurde nach einem modifizierten Protokoll von Majima *et al.* durchgeführt (Majima *et al.*, 1995). Hierzu wurden Mitochondrien 1:100 oder Importreaktionen 1:10 in SH-Puffer oder 20 mM Hepes/KOH, pH 7.4 zur Mitoplastierung verdünnt und mit Cu(OP)_2 auf eine finale Konzentration von 200 μM eingestellt. Das hierfür verwendete Cu(OP)_2 werde erst kurz vor Verwendung durch Mischen einer frischen Kupfer-II-Sulfat-Lösung (25 mM) und einer 1,10-Phenanthrolin-Lösung (50 mM) hergestellt. Die Oxidationsreaktion wurde zunächst für 15 Minuten auf Eis inkubiert und durch Zugabe von 5 mM N-Ethylmaleimid und 5 mM EDTA und einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten gestoppt. Im Fall einer vorangegangenen Importreaktion wurde die Proteinase K-Behandlung (siehe Abschnitt 2.4.2) parallel zur Oxidationsreaktion durchgeführt. Die Mitochondrien wurden re-isoliert, in SH-KCl gewaschen und in Laemmli-Ladepuffer ohne DTT lysiert. Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Autoradiographie oder immunologisch nachgewiesen (siehe Abschnitte 2.3.2, 2.3.5 und 2.5.3).

2.3.13 Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Chemische Quervernetzungsreagenzien können benachbarte Proteine kovalent verknüpfen, womit sich beispielsweise Wechselwirkungen zwischen Proteinen untersuchen lassen. Verwendet wurde das heterobifunktionale Quervernetzungsagens *m*-Maleimid-Benzoyl-*N*-Hydrosuccinimid-Ester (MBS, Pierce). Die Quervernetzung frisch importierter, radioaktiv markierter Proteine wurde nach Stoppen der Importreaktion und noch vor der Proteasebehandlung durchgeführt (siehe Abschnitt

2.4.3). Die Quervernetzung fand in Anwesenheit von 400 μM MBS (frisch in DMSO gelöst) auf Eis statt und wurde nach 30 Minuten durch Zugabe von 10 mM Cystein gestoppt. Im Anschluss wurden die Mitochondrien mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K auf Eis behandelt, der Verdau nach 30 Minuten durch 2 mM PMSF gestoppt, die Mitochondrien re-isoliert (10 min, 16 000 \cdot g, 4°C) und zweimal mit SH-KCl-PMSF (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl; 0,5 mM PMSF) gewaschen. Die Mitochondrien wurden in Laemmli-Puffer lysiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.3.14 Oxa1-Aufreinigung

Die Aufreinigung von rekombinatem His₁₀Oxa1 erfolgte aus BL21(DE3) *E. coli*-Zellen, die mit dem Plasmid pEH-Oxa1 durch Hitzeschock transformiert wurden. Die transformierten Zellen wurden in 200 ml TB_{Kan} über Nacht bei 37°C angezogen, morgens in 2 Litern TB_{Kan} auf eine OD₅₉₅ von 0,2-0,4 verdünnt und auf 30°C transferiert. Mit Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,8-0,9 wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und für 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 000 \cdot g, 5 min, RT), bei -20°C eingefroren und gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Zur Isolation von His₁₀Oxa1 wurden die Zellen in 50 ml Resuspensionspuffer (10 mM Tris, pH 7.0; 1 mM EDTA; 15% Glycerin; 1 mM PMSF) aufgenommen und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase 1, 1 mM PMSF und 1 \cdot Complete Protease Inhibitor Mix (Roche) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier) aufgebrochen, nicht geöffnete Zellen und Zelltrümmer bei 4000 \cdot g für 30 Minuten und 4°C sedimentiert und bakterielle Membranen durch Zentrifugation bei 100 000 \cdot g für 30 Minuten und 4°C in einem Typ70 Ti Rotor (Beckman-Coulter) isoliert. Die Bakterienmembranen wurden in 30 ml Lysepuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.9; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol, pH 7.9; 1% DDM; 1 mM PMSF; 1 \cdot Complete Protease Inhibitor Mix) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis lysiert. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation (100 000 \cdot g, 30 min, 4°C) geklärt und His₁₀Oxa1 mittels eines ÄKTA-Systems an eine Nickel-NTA-Säule (Quiagen) gebunden. Die Säule wurde mit 30 ml Waschpuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.9; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol, pH 7.9; 0,1% DDM) gewaschen und His₁₀Oxa1 mittels Elutionspuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.9; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol, pH 7.9; 0,1% DDM) von der Säule eluiert. Die Reinheit des aufgereinigten His₁₀Oxa1 wurde mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung des Gels (siehe Abschnitte 2.3.2 und 2.3.3) überprüft.

2.3.15 Rekonstitution von His₁₀Oxa1 in Proteoliposomen

His₁₀Oxa1 wurde nach einem modifizierten Protokoll nach van der Does (van der Does *et al.*, 2003) in Liposomen rekonstituiert. Hierzu wurden 200 μl *E. coli*-Lipide (*polar extract*, 20 mg/ml

in Chloroform, Avanti) in einen Rundkolben transferiert und unter Vakuum und Schütteln das Chloroform verdampft. Die getrockneten Lipide wurden anschließend in 200 µl ddH₂O resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Ultraschallbehandlung für 3 · 5 Sekunden Liposomen ausgebildet. Je 100 µl dieser Liposomen wurden entweder, um leere Liposomen zu generieren, mit 500 µl Elutionspuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.9; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol, pH 7.9; 0,1% DDM) oder, um Oxa1-Proteoliposomen zu erzeugen, mit 500 µl His₁₀Oxa1 (0.4-0.8 µg/µl, siehe Abschnitt 2.3.14) gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Einlagerung von Oxa1 in die Liposomen zu erzwingen, wurden die Proben und das darin enthaltene DDM mit 10 ml Verdünnungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM KCl) gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteoliposomen wurden durch Zentrifugation bei 125 000 · g für 30 Minuten bei 4°C sedimentiert, in Verdünnungspuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bevor die Proteoliposomen in Experimenten Verwendung fanden, wurden sie nach dem Auftauen kurz (3 · 5 s) mit Ultraschall behandelt um unilamellare Vesikel auszubilden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode (Gasser *et al.*, 1982). Hierzu wurden Zellen, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, bis zu einer OD₅₉₅ von 1,0-1,8 angezogen. Kulturen der *Oxa1ts*-Mutante, bei der *Oxa1ts* depletiert werden sollte wurden dann im Wasserbad auf 37°C erwärmt, mit 25 µM Cycloheximid versetzt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollkulturen wurden ebenfalls mit 25 µM Cycloheximid versetzt und bei 25°C für 3 Stunden weiterinkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2800 · g für 5 Minuten (RT) geerntet und einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in 2 ml pro Gramm Feuchtgewicht (FG) Isolationspuffer 1 (100 mM Tris; 10 mM DTT) resuspendiert und für 10 Minuten bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 2000 · g, 4°C), die Zellen in 1,2 M Sorbitol gewaschen und in 6,7 ml pro Gramm Feuchtgewicht Isolationspuffer 2 (1,2 M Sorbitol; 0,45 mg/ml Zymolyase; 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) resuspendiert. Die Zellwand wurde für 45-60 Minuten bei 30°C unter Schütteln verdaut. Die hieraus resultierenden Sphäroplasten wurden für 5 Minuten bei 2000 · g (4°C) geerntet und pro Gramm Feuchtgewicht in 13,4 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 0,2% BSA; 1 mM PMSF; 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Glas- oder Teflonhomogenisators durch 10 Stöße aufgeschlossen, die Zellen für 5 Minuten bei 2000 · g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Das Zellpellet wurde mit weiteren 6,7 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Feuchtgewicht versetzt und verbleibende, noch nicht geöffnete Zellen durch weitere 10 Stöße mit dem Glas- oder Teflonhomogenisator aufgeschlossen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Überstände

vereinigt und noch einmal für 5 Minuten bei $2000 \cdot g$ (4°C) zentrifugiert, um noch verbliebene intakte Zellen, Zellkerne und Membranen abzutrennen. Die Mitochondrien wurden im Anschluss durch Zentrifugation für 12 Minuten bei $16\,000 \cdot g$ und 4°C sedimentiert und in SH Puffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol) aufgenommen. Von dieser Suspension wurde die absolute Proteinmenge nach Bradford bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.8). Unter anderem wurde mit Δoxa1 -Mitochondrien gearbeitet, deren Innenmembranproteingehalt stark reduziert ist. Da sich hierdurch gleiche Proteinmengen dieser Mutante nur bedingt mit denen des Wildtyps vergleichen lassen, wurde zusätzlich die Optische Dichte der Suspension bei 595 nm bestimmt, und die Mitochondrien auf eine OD_{595} von 5 eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Erzeugung von Mitoplasten und Proteaseverdau

Mitochondrien, deren äußere Membran selektiv geöffnet wurde, werden als Mitoplasten bezeichnet. Der selektive Verdau der Proteine durch Proteinase K in intakten Mitochondrien sowie Mitoplasten ermöglicht die Bestimmung der submitochondrialen Lokalisation bestimmter Proteine. Mitoplasten wurden durch hypotones Schwellen der Mitochondrien erzeugt, wodurch die Außenmembran aufgebrochen wurde, die Innenmembran dagegen intakt blieb. Dazu wurden Mitochondrien 1:10 bis 1:20 in 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4 in Anwesenheit von $100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K verdünnt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Analog wurden Mitochondrien in SH-Puffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol) verdünnt und ebenfalls mit $100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K für 30 Minuten auf Eis behandelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt, die Mitochondrien/Mitoplasten in SH-KCl (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl) gewaschen und in SDS-Ladepuffer lysiert. Proteasebehandelte Mitochondrien und Mitoplasten wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe Abschnitte 2.3.2 und 2.3.4).

2.4.3 *In vitro* Import radioaktiv markierter Proteine in isolierte Mitochondrien

Importversuche *in vitro* synthetisierter Proteine in isolierte Mitochondrien wurden in Importpuffer (0,6 M Sorbitol; 50 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 80 mM KCl; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 1 mM MnCl_2) in einem Gesamtvolumen von $40 \mu\text{l}$ pro Reaktion durchgeführt. Typischerweise wurden 1-3 μl Proteine (in Retikulozytenlysat, siehe Abschnitt 2.3.6) in $40 \mu\text{g}$ isolierte Mitochondrien (siehe Abschnitt 2.4.1) in Anwesenheit von 2 mM NADH und 2 mM ATP bei 16°C importiert. Die Importreaktion wurde durch 1:10-Verdünnung in kaltem SH-Puffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol) oder 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 zum Schwellen der Außenmembran (siehe Abschnitt 2.4.2), gestoppt und zugängliche Proteine wurden für 30 Minuten auf Eis durch Zugabe von $100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K verdaut. Die Proteasebehandlung wurde durch

Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 Minuten bei $16\,000 \cdot g$ (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Mitochondrien zweimal in SH-KCl-PMSF (20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl; 0,5 mM PMSF) gewaschen. Sofern die Mitochondrien nicht weiter behandelt wurden (z.B. durch Quervernetzung (siehe Abschnitte 2.3.13 und 2.3.12), wurden sie in Laemmli-Ladepuffer aufgenommen und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.3.2).

2.4.4 Messungen des Membranpotentials

Zur Messung des Membranpotentials wurden frisch isolierte, nicht in flüssigem Stickstoff eingefrorene Mitochondrien in 400 μl Messpuffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7,0; 15 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0; 80 mM KCl; 0,6 M Sorbitol) auf eine OD_{595} von 0,25 eingestellt und bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM NADH wurde die Fluoreszenzmessung in einem Fluorospektrometer (JASCO) bei 30°C gestartet. Die Probe wurde bei 490 nm angeregt und die Emission bei 590 nm gemessen. Nach 30 Sekunden wurden 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 (in DMSO, Calbiochem) zugegeben und die Emissionsänderung verfolgt. Nach 330 Sekunden wurde das Membranpotential durch Zugabe von 25 μM CCCP aufgehoben und die Fluoreszenz für weitere 90 Sekunden gemessen.

2.4.5 Messung der ADP-Aufnahmeaktivität

Die Aufnahme von ADP wurde in Mitochondrien gemessen, die frisch isoliert und nicht in flüssigem Stickstoff eingefroren waren (siehe Abschnitt 2.4.1). Diese wurden mit Aufnahmepuffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7,0; 15 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0; 80 mM KCl; 0,6 M Sorbitol) auf eine OD_{595} von 1,5 eingestellt und in Anwesenheit von 25 μM CCCP für 1 Minute auf Eis inkubiert. Zum Starten der Aufnahmereaktion wurde die Mitochondriensuspension 1:2 mit Aufnahmepuffer verdünnt, der eine Mischung aus radioaktiv-markiertem ^{32}P - α -ADP und ADP enthält. Nach einer 5 sekündigen Inkubation auf Eis wurde die Aufnahmereaktion auf einen Nitrozellulosefilter transferiert, durch Vakuum der Aufnahmepuffer abgesaugt und so die Reaktion gestoppt. Die der Nitrozellulose anhaftenden Mitochondrien wurden 3 mal mit 2 ml Aufnahmepuffer gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität mittels eines Szintillationszählers (Beckman-Coulter) gemessen. Um die Menge unspezifisch aufgenommenen ADPs zu ermitteln, wurden Mitochondrien mit 50 μM Bongkrekssäure (BKA) und 250 μM Atractylosid (ATR) für fünf Minuten vorbehandelt um den ADP/ATP-Carrier zu hemmen. Anschließend wurde, wie zuvor beschrieben, die Aufnahme von radioaktivem ^{32}P - α -ADP bestimmt. Die so gemessene Hintergrund-Aufnahmeaktivität wurde von der Aufnahmeaktivität nicht gehemmter Mitochondrien subtrahiert. ^{32}P - α -ADP wurde enzymatisch durch eine Hexokinasebehandlung für 60 Minuten bei 30°C aus ^{32}P - α -ATP hergestellt (Tjaden *et al.*, 1998).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung spezifischer Antisera in Kaninchen

Polyklonale Antisera wurden aus dem Blut von Kaninchen gewonnen, die mit rekombinant hergestellten Proteinen immunisiert wurden. Für die Erstinjektion wurden 250-500 µg gereinigtes Protein in einem Volumen von 200 µl 1:1 mit TiterMax-Gold (Sigma) versetzt und kräftig gemischt. Die Emulsion wurde subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax-Gold unvollständiges Freundsches Adjuvans verwendet wurde. Beginnend mit der zweiten Injektion wurden 10-12 Tage nach jeder Immunisierung dem Kaninchen 15-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei Raumtemperatur (4-6 h) wurde das Serum durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 20 000 · g gewonnen und durch Erhitzen für 20 Minuten bei 56°C das Komplementsystem inaktiviert. Die Sera wurden bei -20°C gelagert.

2.5.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen/Beschreibung	Verdünnung
α-Oxa1-Volllänge	Gegen matures Oxa1, His ₁₀ -TEV-Oxa1 ⁴³⁻⁴⁰²	1:500
α-Oxa1-C-Terminus	Gegen Oxa1C-Terminus, GST-Oxa1 ³¹¹⁻⁴⁰¹	1:500
α-Mrp140	Gegen matures Mrp140 (Untereinheit des Ribosoms)	1:1000
α-Tom70	Gegen His ₆ -Tom70 ⁴⁰⁻⁶¹⁷	1:500
α-Tim23	Gegen Untereinheit 23 des TIM23-Komplexes	1:500
α-Tim22	Gegen Untereinheit 22 der TIM22-Komplexes	1:250
α-Phb2	Gegen Untereinheit 2 des Prohibitin-Komplexes	1:500
α-Yme1	Gegen die katalytische Untereinheit Yme1 der AAA-Protease des Intermembranraums	1:500
α-Atm1	Gegen den ABC-Transporter Atm1	1:500
α-Cor2	Gegen Cor2 der Cytochrom <i>c</i> -Reduktase	1:500
α-Rip1	Gegen das Rieske Protein der Cytochrom <i>c</i> -Reduktase	1:500
α-Shy1	Gegen den Assemblierungsfaktor Shy1 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	1:500
α-Cox2	Gegen Untereinheit 2 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	1:500
α-Aac2	Gegen den ADP/ATP-Carrier Aac2	1:500
α-His	Gegen Hexahistidinrest	1:500

Tabelle 2.3: Verwendete Antisera

2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Für den Nachweis spezifischer Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels polyklonaler Antikörper analysiert (siehe Abschnitte 2.3.2 und 2.3.4). Tabelle 2.3 gibt einen Überblick der verwendeten Antikörper.

Um unspezifische Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 Minuten in Blockpuffer (5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS) geschwenkt. Anschließend folgte die Immundekoration mit Antiserum (in 5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS) für mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach der Immundekoration mit dem Primärantikörper wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 5 Minuten in TBS gewaschen und für 45-60 Minuten mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen (bzw. Maus für monoklonale Antikörper) inkubiert (1:10000 in 5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS). Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten in TBS gewaschen und mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol; 0,2 mM Kumarinsäure; 0,25 mM H₂O₂; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) benetzt. Die Nitrozellulose wurde zwischen zwei transparente Folien gelegt und je nach Signalstärke für 5 Sekunden bis 10 Minuten auf Röntgenfilmen exponiert.

2.6 Nährmedien

- **Laktat-Medium:** 3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,5 g/l CaCl₂, 0,5 g/l NaCl, 0,6 g/l MgSO₄, 0,3 ml/l FeCl₃ (1%), 2% Laktat; Der pH wurde mit KOH auf 5,5 eingestellt.
- **LB-Medium:** *Lysogeny Broth*; 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
- **LB_{Amp}-Medium:** LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
- **LB_{Kan}-Medium:** LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin
- **LB-Platten:** 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 1,5% Agar
- **LB_{Amp}-Platten:** LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin
- **LB_{Amp}-Platten:** LB-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin
- **TB-Medium:** *Terrific Broth*; 12 g/l Bacto-Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 2,3 g/l KH₂PO₄, 12,5 g/l K₂HPO₄ (der Phosphatpuffer wird separat autoklaviert)
- **TB_{Kan}-Medium:** TB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin
- **Selektiv (S)-Medium:** 0,17% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5% (NH₄)₂SO₄, supplementiert mit 2% Glukose oder 2% Galaktose sowie den benötigten Auxotrophiemarkern.

- **Selektiv-Platten:** Selektiv-Medium mit 2% Agar
- **YP-Medium:** 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl
- **YP-Platten:** YP-Medium mit 2% Agar
- **YPD-Medium/Platten:** YP-Medium/Platten mit 2% Glukose
- **YPD-G418 Platten:** YPD-Platten mit 0,2 mg/ml G418
- **YPG-Medium/Platten:** YP-Medium/Platten mit 2% Glycerin
- **YPGal-Medium/Platten:** YP-Medium/Platten mit 2% Galaktose

2.7 Geräte

- **Amersham Biosciences, Freiburg:** Spannungsversorgung
- **Beckman Coulter, Krefeld:** Kühlzentrifugen (Avanti), Ultrazentrifugen (Optima und OptimaMax), Szintillationszähler
- **Bender und Hobein:** Vortex-Mischer
- **BioRad, Hercules, USA:** Semi-dry-Blotapparaturen
- **Branson, Danbury:** Branson Sonifier S250-A
- **Eppendorf, Hamburg:** Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen, Kühlzentrifugen, Gradienten-PCR-Maschine Mastercycler Gradient
- **Epson:** Flachbettscanner
- **GE-Healthcare, München:** Äkta-Chromatographiesystem und Säulen
- **Hielscher:** Sonifier der UP-Baureihe
- **Infors-HT, Bottmingen, Schweiz:** Schüttelinkubatoren
- **Thermo-Fischer (Heraeus):** Tischzentrifugen
- **Institutswerkstatt, München und Kaiserslautern:** Semidry-Blot-Apparaturen, Tank-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern (SDS-PAGE und Agarosegelelektrophorese), Rollmischer
- **Jouan:** Brutschränke
- **MS-Laborgeräte, Dielheim:** Entwicklermaschine Optimax Typ TR

-
- **Peqlab, Erlangen:** Quantum Geldokumentationsystem, Agarosegelelektrophorese-Kammern
 - **Sartorius, Goettingen:** Grob- und Feinwaage
 - **Schott-Instruments, Mainz:** pH-Meter

3 Ergebnisse

3.1 Oxa1 und seine Rolle in der Biogenese von Aac2

3.1.1 In Abwesenheit von Oxa1 sind die Mengen verschiedener mitochondrialer sowie kernkodierter Proteine stark reduziert

Die Bedeutung von Oxa1 für die Biogenese von Innenmembranproteinen wurde bislang nur für wenige Modellproteine untersucht. Um die Funktion und den Einfluss von Oxa1 auf mitochondriale Proteine besser zu verstehen, wurden die Mengen verschiedener Proteine im Wildtyp mit denen einer Oxa1-Deletionsmutante ($\Delta oxa1$) verglichen (Abbildung 3.1 A). Die Level der Proteine Tom70, einem Bestandteil der Außenmembran, Tim22, Tim23 und Phb2, Proteine der Innenmembran, sowie Mrpl40, einer Komponente des mitochondrialen Ribosoms, waren in beiden Stämmen nahezu vergleichbar. Im Gegensatz dazu waren die Mengen einiger anderer Innenmembranproteine in der $\Delta oxa1$ -Mutante reduziert. Während Yme1, Atm1 und Cor2 nur leicht betroffen waren, waren die Level von Rip1, Shy1, Cox2 und Aac2 in Abwesenheit von Oxa1 stark reduziert. Eine Beteiligung von Oxa1 an der Insertion des mitochondrial kodierten Cox2 in die Innenmembran ist seit langem bekannt (Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994; He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997). Nicht inseriertes prä-Cox2 ist instabil und fehlt daher in einer Mutante ohne Oxa1. Kernkodierte Atmungskettenproteine wie Rip1 und Cor2 als Bestandteile der Cytochrom *c*-Reduktase (Komplex III) waren ebenfalls durch die Deletion von Oxa1 betroffen, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 3.1). Cor2 war verhältnismäßig stabil in Abwesenheit von Oxa1, während Rip1 extrem instabil vorlag. Dies lässt sich dadurch begründen, dass während der Assemblierung von Komplex III Cor2 bereits früh mit Cor1 und Cyt_c1 einen relativ stabilen Komplex ausbildet, während Rip1 erst spät in den Komplex III eingebaut wird (Zara *et al.*, 2009). Die im Vergleich zu Cor2 stark verringerten Mengen von Rip1 deuten darauf hin, dass die Assemblierung der Cytochrom *c*-Reduktase gestört war, Rip1 nicht eingebaut werden konnte und abgebaut wurde. Neben den bereits beschriebenen Effekten auf die Atmungskettenproteine wurde erst kürzlich die Rolle von Oxa1 bei der Membraninsertion des ABC-Transporters Mdl1 beschrieben (Bohnert *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass mit Atm1 die Mengen eines anderen ABC-Transporters in Abwesenheit von Oxa1 ebenfalls reduziert waren und deuten auf eine grundsätzliche Funktion von Oxa1 bei der Insertion von ABC-Transportern hin. Im Gegensatz hierzu ist nicht klar, warum sich das Fehlen von Oxa1 negativ auf die Proteinlevel von Yme1, Shy1 oder Aac2 auswirkte. Überraschend und unerwartet war besonders der Effekt auf den ADP/ATP-Carrier Aac2, da der Importweg von Carrier-Proteinen gut charakterisiert ist und eine Beteiligung von Oxa1 bisher nicht beschrieben wurde. Im Folgenden sollte deshalb die Rolle von Oxa1 bei der Biogenese von Aac2 und anderen Mitgliedern der mitochondrialen Carrier-Familie genauer untersucht werden.

In der $\Delta oxa1$ -Mutante sind die Mengen des Carriers Aac2 stark reduziert. Ob das verbleibende

Aac2 funktionell ist, war unbekannt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Mitochondrien des Wildtyps und der $\Delta oxa1$ -Mutante frisch aus Hefezellen isoliert und anschließend die Aufnahme von radioaktiv markiertem ^{32}P - α -ADP in die Organellen gemessen (Abbildung 3.1 B). In Mitochondrien des Wildtyps wurde radioaktiv markiertes ADP effektiv aufgenommen. Im Gegensatz dazu war die ^{32}P - α -ADP-Aufnahme in Mitochondrien eines $\Delta oxa1$ -Stamms um nahezu 80% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Diese Reduktion der Aufnahmeaktivität spiegelt die reduzierten Aac2-Level in Abwesenheit von Oxa1 wider. Die Tatsache, dass dennoch 20% ADP aufgenommen werden konnten, deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil des verbleibenden ADP/ATP-Carriers funktionell ist.

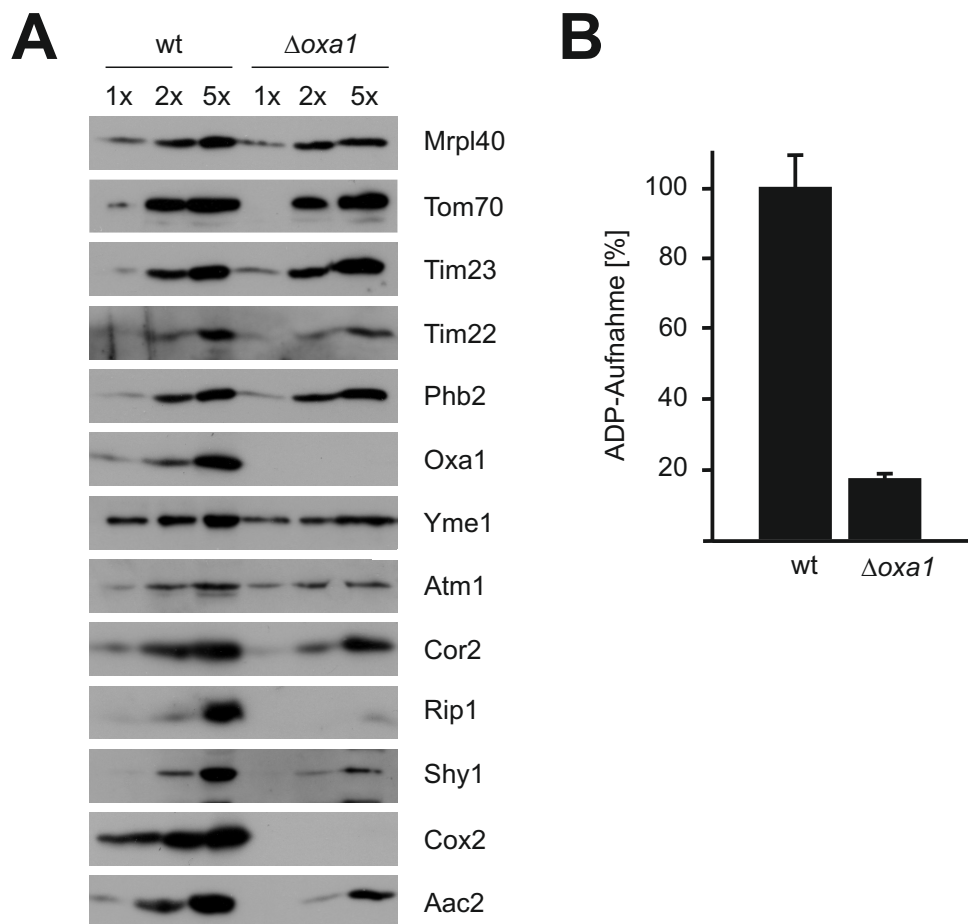


Abbildung 3.1: In Abwesenheit von Oxa1 ist die Proteinmenge und die Aufnahme von ADP durch den ADP/ATP-Carrier Aac2 drastisch reduziert. A) Mitochondrien wurden aus Wildtyp-Hefezellen und einer $\Delta oxa1$ -Mutante isoliert, in SDS-Ladepuffer lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels Western Blot detektiert. B) Frisch isolierte Mitochondrien der angegebene Stämme wurden eine Minute mit CCCP vorbehandelt. Anschließend wurden die Mitochondrien in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ^{32}P - α -ADP inkubiert. Nach fünf Sekunden wurde die ADP-Aufnahme gestoppt, indem die Mitochondrien auf eine Nitrozellulose-Membran überführt und nicht aufgenommenes ^{32}P - α -ADP durch Absaugen entfernt wurde. Die aufgenommene Menge an radioaktivem ^{32}P - α -ADP wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

3.1.2 Mitochondrien, denen Oxa1 fehlt, haben ein deutlich verringertes Membranpotential

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben sind die Mengen des ADP/ATP-Carriers Aac2 in Abwesenheit von Oxa1 drastisch reduziert. Dies könnte die Folge eines verschlechterten Imports von Aac2 in die Mitochondrien der Δ oxa1-Mutante sein. Um eine Beeinflussung des Imports von Carrier-Proteinen durch Oxa1 zu untersuchen, wurden die beiden Carrier Aac2 und Pic2 in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert und anschließend in isolierte Mitochondrien importiert. Der effiziente Import in die Mitochondrien sowie die erfolgreiche Membraninsertion wurden anschließend durch Proteaseverdau mit der Proteinase K untersucht. In intakten Mitochondrien sind importierte Proteine vor der Protease geschützt, während nicht importierte Proteine abgebaut werden. Zerstört man dagegen die Außenmembran durch osmotisches Schwellen und erzeugt so Mitoplasten, gelangt die Protease auch in den Intermembranraum, nicht aber in die Matrix der Mitochondrien. Dabei werden lösliche Proteine und Teile integraler Proteine der Innenmembran, die sich im Intermembranraum befinden, für die Protease zugänglich. In den meisten Fällen werden diese Transmembranproteine in einer Weise abgedaut, bei der charakteristische, im SDS-Gel schneller migrierende Fragmente entstehen, die auf eine erfolgreiche Membraninsertion hindeuten. Sowohl Aac2 als auch Pic2 wurden erfolgreich in Wildtyp-Mitochondrien importiert und konnten nach Proteinase K-Verdau noch nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden beide Proteine erfolgreich in die Innenmembran der Mitochondrien inseriert, was sich durch die Entstehung des schneller migrierenden Proteasefragments (PF) in Mitoplasten zeigte (Abbildung 3.2 A) (Rassow & Pfanner, 1991). Im Gegensatz hierzu konnten die Proteine nicht in Mitochondrien importiert werden, in denen das Membranpotential durch den Entkoppler Carbonyl-cyanid 3-chlorphenylhydrazon (CCCP) aufgehoben wurde. Dies zeigte sich dadurch, dass beide Proteine selbst in intakten Mitochondrien durch die Proteinase K verdaut werden konnten und verdeutlicht die Membranpotentialabhängigkeit der TIM22-vermittelten Proteininsertion. Beim Import der beiden Carrier Aac2 und Pic2 in Δ oxa1-Mitochondrien zeigte sich ein ähnliches Resultat wie im Fall der entkoppelten, mit CCCP behandelten Wildtyp-Mitochondrien. Dieser Befund lässt unterschiedliche Erklärungen zu. Zum einen fehlt Δ oxa1-Mitochondrien eine funktionelle Atmungskette (Abbildung 3.1 A). Somit wäre es möglich, dass in Δ oxa1-Mitochondrien kein ausreichend hohes Membranpotential aufgebaut werden kann, um eine effiziente Insertion von Carrier-Proteinen in die Innenmembran zu gewährleisten. Zum anderen könnte Oxa1 auch einen direkten Einfluss auf den Import mitochondrialer Carrier haben.

Um diese Möglichkeiten genauer zu untersuchen, wurde das Membranpotential frisch isolierter Mitochondrien des Wildtyps und der Δ oxa1-Mutante gemessen. Hierzu wurden die Mitochondrien zunächst in Anwesenheit von NADH energetisiert. Anschließend wurde die membranpotentialabhängige Aufnahme des lipophilen kationischen Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 verfolgt. JC-1 liegt in Lösung als Monomer vor und hat eine Emissionswellenlänge von 527 nm, wenn es bei 490 nm angeregt wird. Bei der Aufnahme von JC-1 in Mitochondrien, die über ein ausreichend

hohes Membranpotential verfügen, formen sich sogenannte J-Aggregate, deren Emissionswellenlänge bei 590 nm liegt. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 590 nm kann somit direkt mit dem Membranpotential korreliert werden (Reers *et al.*, 1991, 1995). Die Zugabe von JC-1 zu energietisierten Wildtyp-Mitochondrien führte zu einer schnellen Zunahme des Fluoreszenzsignals bei 590 nm. Nach Zugabe von CCCP und der damit verbundenen Aufhebung des Membranpotentials kam es dagegen zur sofortigen Abnahme der Emission bei 590 nm (Abbildung 3.2B, wt). Betrachtet man dagegen die Situation in Mitochondrien der $\Delta oxa1$ -Mutante, sieht man deutlich, dass direkt nach Zugabe von JC-1 eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 590 nm ausblieb (Abbildung 3.2 B, $\Delta oxa1$). Dieses Resultat zeigt, dass der monomere Farbstoff nicht in die $\Delta oxa1$ -Mitochondrien aufgenommen wurde und deutet auf ein stark vermindertes Membranpotential hin. Das erklärt, warum die Carrier Aac2 und Pic2 nicht in $\Delta oxa1$ -Mitochondrien importiert werden konnten (Abbildung 3.2A), denn die Membraninsertion mitochondrialer Carrier ist membranpotentialabhängig. Dennoch könnten die zuvor beschriebenen stark reduzierten Aac2-Level (Abbildung 3.1 A) nur indirekt durch das stark reduzierte Membranpotential verursacht worden sein. Es lässt sich daher in $\Delta oxa1$ -Mitochondrien nicht beurteilen, ob die reduzierten Carrier-Mengen indirekt durch das reduzierte Membranpotential oder direkt durch das fehlende Oxa1 verursacht werden.

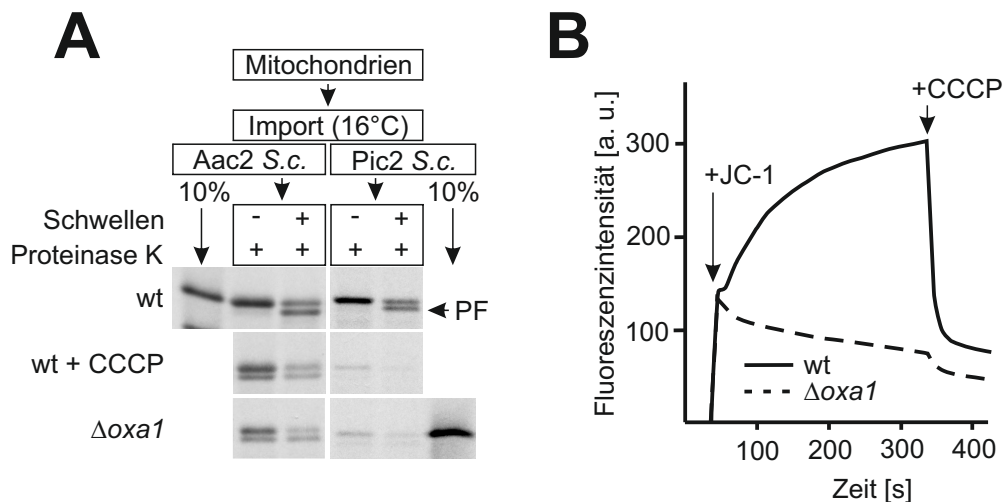


Abbildung 3.2: Mitochondrien, die aus einer $\Delta oxa1$ -Mutante isoliert wurden, scheitern am Import mitochondrialer Carrier und können kein messbares Membranpotential etablieren. A) Die im Zellkern kodierten Carrier-Proteine der mitochondrialen Innenmembran Aac2 und Pic2 aus *S. cerevisiae* wurden in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert. Diese radioaktiv markierten Proteine wurden zusammen mit isolierten Mitochondrien des Wildtyps und der $\Delta oxa1$ -Mutante bei 16°C für 15 Minuten inkubiert. Durch Behandlung mit CCCP wurde in Wildtyp-Mitochondrien das Membranpotential aufgehoben. Nicht importierte Proteine wurden anschließend durch Proteinase K-Behandlung in intakten Mitochondrien oder Mitoplasten, die durch Schwellen in hypotonischem Medium erzeugt wurden, entfernt. Mitochondrien oder Mitoplasten wurden reisoliert, in SDS-Ladepuffer lysiert, im Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie nachgewiesen. B) Zur direkten Messung des Membranpotentials wurden Mitochondrien aus Wildtyp-Hefezellen und einer $\Delta oxa1$ -Mutante frisch isoliert. Die Mitochondrien wurden zunächst mit NADH vorinkubiert, gefolgt von der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1. Dieser wurde bei 490 nm angeregt und die membranpotentialabhängige Aufnahme in Mitochondrien bei der Emissionswellenlänge von 590 nm verfolgt. Das Membranpotential wurde nach 330 Sekunden durch Zugabe von CCCP depletiert. Die Änderung der Fluoreszenzsignals wurde bei der Emissionswellenlänge von 590 nm über einen Gesamtzeitraum von 420 Sekunden verfolgt. (n=3)

3.1.3 Der Austausch von Histidin 121 gegen Leucin bewirkt eine temperaturinduzierbare Destabilisierung von Oxa1

Die Deletion von Oxa1 führt zur Depletion des Membranpotentials, welches eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Insertion von *Carrier*-Proteinen in die Innenmembran darstellt. Somit ist es nicht möglich, die Rolle von Oxa1 an der Biogenese mitochondrialer *Carrier* in einer Δ *oxa1*-Mutante zu untersuchen. Wie kann aber die Oxa1-Abhängigkeit dieses Prozesses vom Membranpotential unabhängig untersucht werden? Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist die Herstellung einer Mutante, in der Oxa1 funktionell exprimiert wird, durch einen äußeren Impuls aber gezielt inaktiviert oder degradiert werden kann. Um eine solche Mutante zu konstruieren, wurden zunächst die Oxa1-Sequenzen verschiedener Organismen miteinander verglichen (Abbildung 3.3 A). Dabei fiel auf, dass die erste Transmembrandomäne sehr hoch konserviert ist. Untersuchungen in *E. coli* zeigen ebenfalls eine besondere Bedeutung dieser Transmembrandomäne für die Struktur und Funktion von YidC (Jiang *et al.*, 2003). Da die erste Transmembrandomäne somit wahrscheinlich eine bedeutende Rolle für die Funktion von Oxa1 spielt, wurden Mutanten analysiert, in denen verschiedene Aminosäurereste im Bereich dieser Transmembrandomäne ausgetauscht worden waren. Unter anderem wurde auch der Histidinrest 121 durch Leucin ersetzt und die Stabilität des Proteins nach Transformation in eine Δ *oxa1*-Mutante genauer untersucht. Hierzu wurden Hefen des Wildtyps und solche, die das *Oxa1-H121L*-Allel exprimierten bei 25°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 25°C weiter inkubiert oder auf 37°C transferiert. Im Wildtyp war Oxa1 sowohl bei 25°C als auch bei 37°C stabil. Im Gegensatz hierzu war das mutierte *Oxa1-H121L* bei 37°C instabil, wodurch das Protein innerhalb einer Stunde abgebaut wurde (Abbildung 3.3 B). Diese Instabilität zeigte sich nicht nur in intakten Hefezellen, sondern auch in Mitochondrien, die aus diesem Hefestamm isoliert wurden. Inkubierte man diese bei 37°C, so wurde *Oxa1-H121L* im Gegensatz zu Wildtyp-Oxa1 innerhalb von 30 Minuten nahezu vollständig degradiert (Abbildung 3.3 C). Dieses Verhalten ist typisch für temperatursensitive (ts) Proteine, weswegen die *Oxa1*-Mutante *Oxa1-H121L* im Folgenden als *Oxa1ts* bezeichnet wird. In Abbildung 3.3 D ist diese Mutante schematisch dargestellt.

3.1.4 Die *Oxa1ts*-Mutante erlaubt die Depletion von Oxa1 ohne dabei das Membranpotential herabzusetzen

Die Deletion von Oxa1 hat starke Veränderungen der mitochondrialen Innenmembran zur Folge. So sind zum Beispiel die Level verschiedener Proteine reduziert und die Mitochondrien können kein messbares Membranpotential aufbauen (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, kann *Oxa1ts* bei 37°C innerhalb kurzer Zeit effektiv depletiert werden. Unklar ist allerdings, ob dennoch ähnliche Nebeneffekte, wie sie zuvor für die Δ *oxa1*-Mutante beschrieben wurden, auftreten. Um diese Frage zu adressieren, wurde die *Oxa1ts*-Mutante bei 25°C angezogen und somit unter Bedingungen bei denen Oxa1 stabil ist. Anschließend wurden die

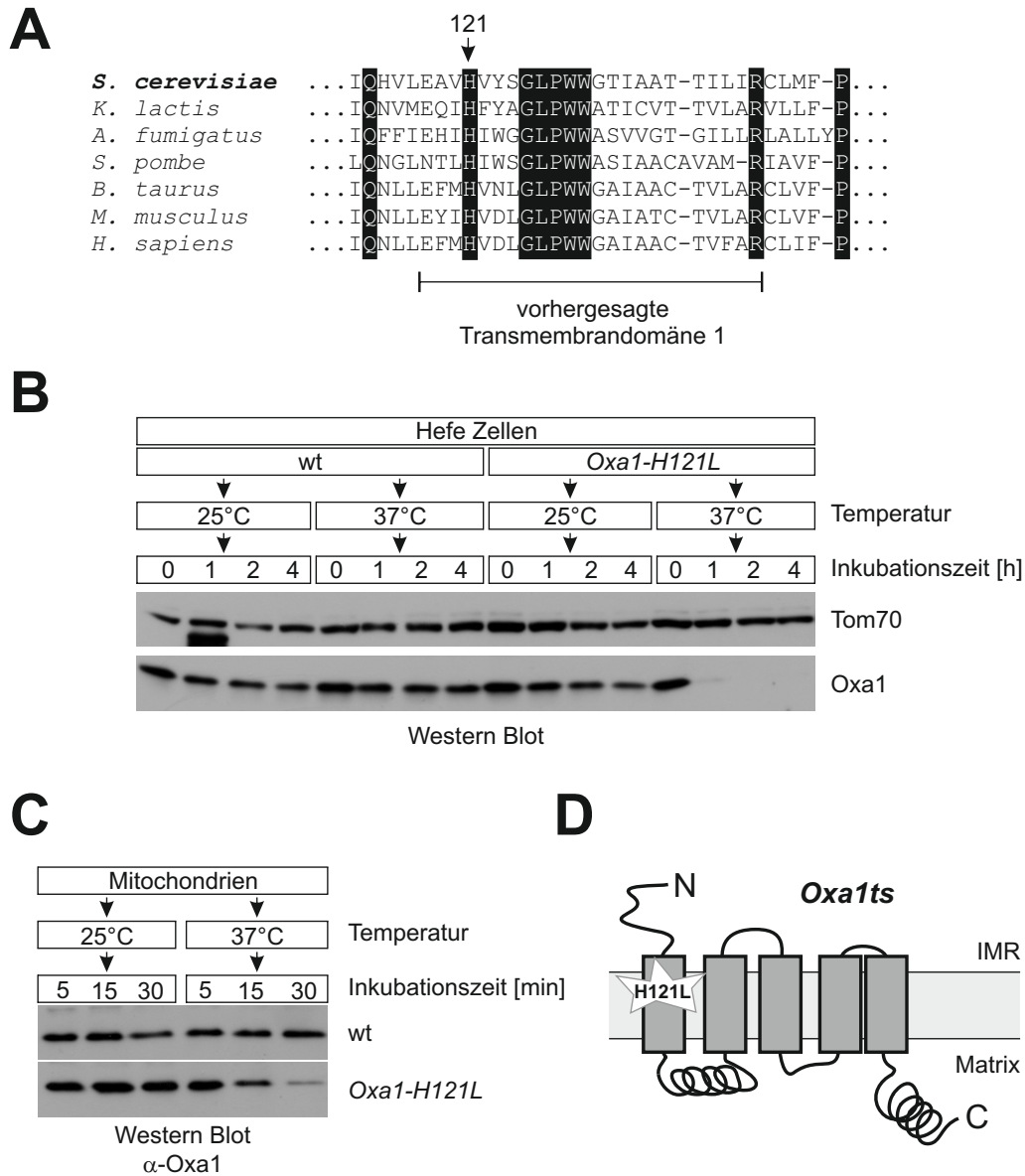


Abbildung 3.3: Die Mutation H121L in Oxa1 erlaubt eine temperaturinduzierbare Degradation des Proteins. A) Vergleich der Sequenz der ersten Transmembrandomäne verschiedener Oxa1-Homologe. Dieser Bereich weist besonders hoch konservierte Aminosäurereste auf. Die Position der Aminosäure 121 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. B) Hefezellen des Wildtyps oder der Mutante *Oxa1-H121L* wurden bei 25°C über Nacht in Laktat-Medium angezogen. Die sich noch im logarithmischen Wachstum befindlichen Zellen wurden verdünnt und anschließend bei 25°C oder 37°C inkubiert. Nach 0, 1, 2 und 4 Stunden wurden jeweils äquivalente Zellmengen geerntet, alkalisch lysiert, die Proteine durch TCA-Fällung isoliert und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt. Die angegebenen Proteine wurden mittels Western Blot und Immundekoration nachgewiesen. Das Protein Tom70 diente als Ladekontrolle. C) Mitochondrien wurden entweder aus Wildtyp-Zellen oder der *Oxa1-H121L*-Mutante isoliert und in Anwesenheit von 2 mM ATP bei 25°C oder 37°C inkubiert. Nach 5, 15 und 30 Minuten wurden jeweils äquivalente Proben geerntet, die Mitochondrien in SDS-Ladepuffer lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch getrennt und mittels Western Blot analysiert. D) Schematische Darstellung der temperaturinduzierbaren Mutante *Oxa1-H121L* (*Oxa1ts*).

Kulturen entweder bei 25°C weiter inkubiert um *Oxa1ts* zu erhalten oder auf 37°C transferiert um *Oxa1ts* zu degradieren. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurden die Mitochondrien isoliert und die Level verschiedener Proteine untersucht. Im Gegensatz zur $\Delta oxa1$ -Mutante, bei der die Mengen zahlreicher Proteine reduziert sind (Abbildung 3.1 A), waren die Proteinlevel der *Oxa1ts*-Mutante nahezu identisch, unabhängig davon ob *Oxa1ts* vorhanden war oder degradiert wurde (Abbildung 3.4 A). Das Vorhandensein der Proteine Cor2, Rip1 und Cox2 deutete außerdem auf eine intakte Atmungskette hin. Um dies zu testen wurde das Membranpotential frisch isolierter *Oxa1ts*-Mitochondrien, wie zuvor beschrieben, durch die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 gemessen (Abbildung 3.4 B). Unabhängig davon, ob *Oxa1ts* depletiert wurde oder

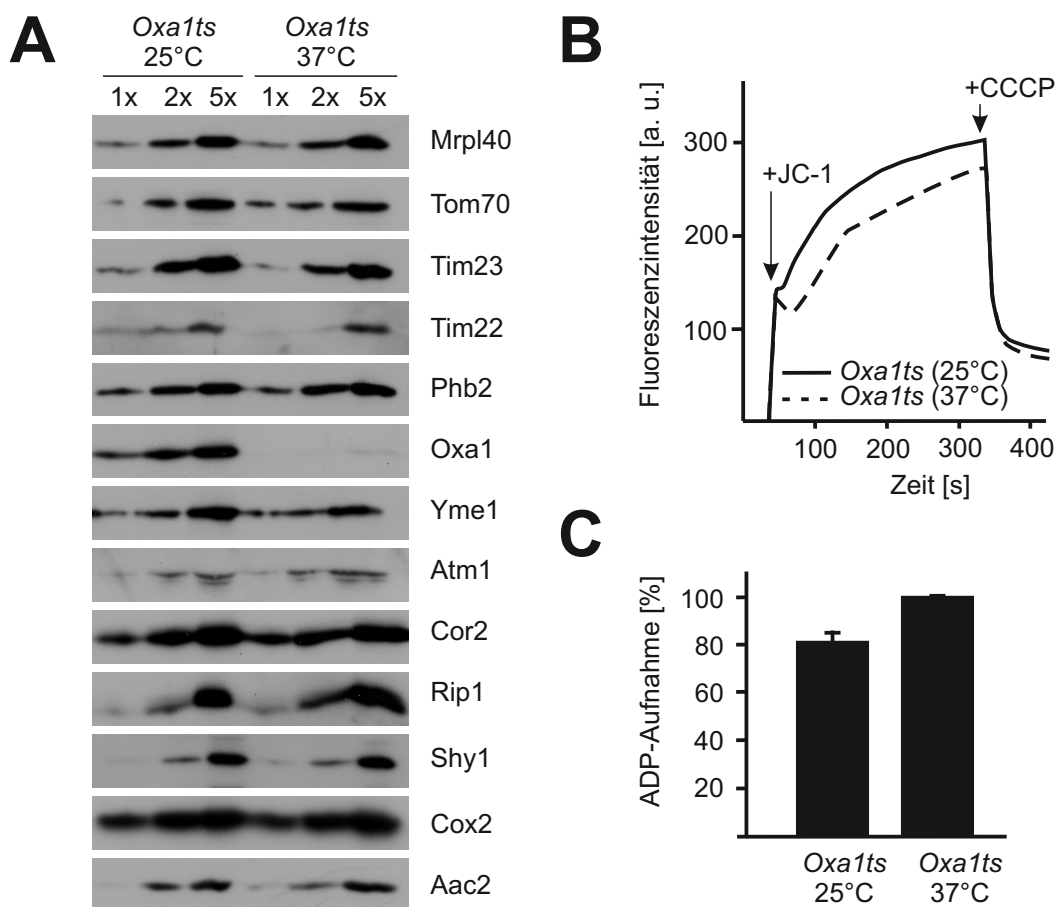


Abbildung 3.4: Die Depletion von *Oxa1ts* führt nicht zu Veränderungen der mitochondrialen Innenmembran. Kulturen der *Oxa1ts*-Mutante wurden über Nacht bei 25°C in Laktat-Medium angezogen. Anschließend wurden die Zellen für drei Stunden bei 25°C oder 37°C inkubiert und die Mitochondrien isoliert. A) Die so isolierten Mitochondrien wurden in SDS-Ladepuffer lysiert, die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot und den angegebenen Antikörpern analysiert. B) Zur Messung des Membranpotentials wurden frisch isolierte Mitochondrien in Anwesenheit von NADH inkubiert. Nach 30 Sekunden wurde der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 zugesetzt und seine membranpotentialabhängige Aufnahme in die Mitochondrien bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen. Durch Zugabe von CCCP wurde das Membranpotential aufgehoben und der Farbstoff JC-1 wieder freigesetzt. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 420 Sekunden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm. (n=3) C) Frisch isolierte Mitochondrien wurden zunächst mit CCCP für eine Minute vorbehandelt, bevor sie in Anwesenheit von radioaktivem ^{32}P - α -ADP auf Eis inkubiert wurden. Die ADP-Aufnahme wurde nach 5 Sekunden gestoppt und die Menge an aufgenommenem ADP mittels eines Szintillationszählers bestimmt. (n=3)

nicht, konnte der Farbstoff JC-1 ähnlich gut aufgenommen werden. Hieraus kann man schließen, dass ein Zeitraum von drei Stunden zur Depletion von *Oxa1ts* ausreichend kurz ist, um eine Schädigung der Innenmembran zu vermeiden.

In Abwesenheit von *Oxa1* ist nicht nur die Menge des ADP/ATP-*Carriers* reduziert, sondern auch seine Funktionalität weit herabgesetzt (Abbildung 3.1). Die Ursache hierfür könnten einerseits die geringen Mengen des *Carrier*-Proteins in der Δ *oxa1*-Mutante sein. Andererseits könnte *Oxa1* aber auch direkt an der Biogenese der *Carrier* oder deren Stabilisierung in der Innenmembran beteiligt sein. Letzteres sollte sich vor allem in einem Funktionalitätsverlust des ADP/ATP-*Carriers* in Abwesenheit von *Oxa1* zeigen. Um die Funktion des ADP/ATP-*Carriers* in Abwesenheit von *Oxa1ts* zu überprüfen, wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem ^{32}P - α -ADP in frisch isolierte Mitochondrien gemessen. Unabhängig davon, ob *Oxa1ts* vorhanden war oder depletiert wurde, war die ADP-Aufnahme nicht beeinflusst (Abbildung 3.4 C). Somit scheint *Oxa1* *per se* nicht essentiell zur Aufrechterhaltung von vollständig assembliertem *Aac2* auf *steady state*-Ebene zu sein.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich Mitochondrien, in denen *Oxa1ts* über einen Zeitraum von drei Stunden depletiert wurde, nicht von Mitochondrien mit *Oxa1ts* unterscheiden. Dies äußert sich vor allem darin, dass Proteine, deren Mengen in der Δ *oxa1*-Mutante stark reduziert sind, in dem temperatursensitiven Stamm nicht beeinflusst sind. Zudem können Mitochondrien ohne *Oxa1ts* ein ähnlich hohes Membranpotential etablieren wie Mitochondrien mit *Oxa1ts*. Somit bietet diese temperatursensitive Mutante eine elegante Möglichkeit, die Rolle von *Oxa1* während des Imports von *Carrier*-Proteinen im Kontext einer intakten inneren mitochondrialen Membran zu untersuchen.

3.1.5 Nach Depletion von *Oxa1ts* ist die Membraninsertion von *Cox2* gestört

Mitochondrien, die das *Oxa1*-Allel *Oxa1ts* exprimieren, sind temperatursensitiv. Die Depletion von *Oxa1ts* über einen Zeitraum von drei Stunden bei 37°C hatte, mit Ausnahme von *Oxa1ts* selbst, keine Auswirkung auf die *steady state*-Mengen der untersuchten Proteine (Abschnitt 3.1.4). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen ist die Inkubationszeit von drei Stunden bei 37°C sehr kurz und die Stabilität der meisten mitochondrialen Proteine über diesen Zeitraum daher nicht beeinträchtigt, sodass die Integrität der Atmungskette nicht gestört wird. Zum anderen ist denkbar, dass, obwohl *Oxa1ts* nicht mehr mittels Antikörpern detektierbar war (Abbildung 3.4 A), geringste, nicht degradierte Mengen an *Oxa1ts* für die Aufrechterhaltung der Integrität der Innenmembran ausreichen. Dies kann untersucht werden, indem die Funktionalität von *Oxa1ts* in den Mitochondrien überprüft wird. Hierzu wurden die mitochondrial kodierten Proteine isolierter Mitochondrien mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (Abbildung 3.5). In Anwesenheit von Wildtyp-*Oxa1* oder *Oxa1ts* wurde die Vorläuferform von *Cox2* (prä-*Cox2*) erwartungsgemäß in die Innenmembran inseriert und durch die *Imp1*-Protease zu maturem *Cox2* prozessiert (He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997). In *Oxa1ts*-depletierten Mitochondrien war dagegen die Menge an maturem *Cox2* stark reduziert. Der überwiegende Teil des Proteins lag hier in seiner Vorläufer-

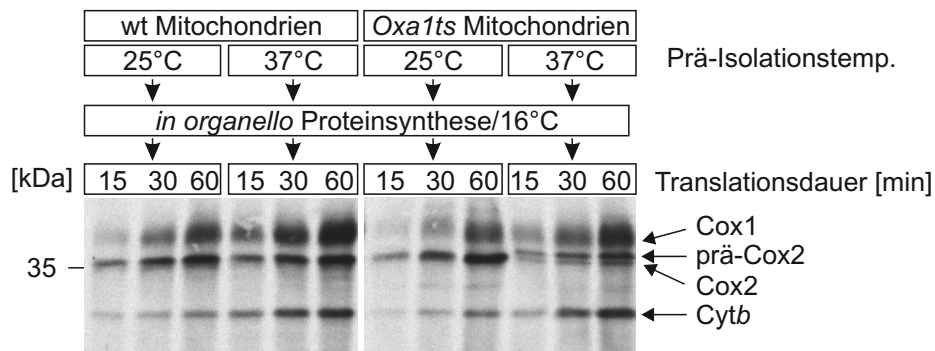


Abbildung 3.5: Die temperaturinduzierte Depletion von *Oxa1ts* führt zu einer fehlerhaften Membraninsertion von neusynthetisiertem Cox2. Translationsprodukte der angegebenen Mitochondrien wurden in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Methionin für 15, 30 oder 60 Minuten bei 16°C radioaktiv markiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in SDS-Ladepuffer lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Neusynthetisierte Translationsprodukte wurden durch Autoradiographie detektiert.

form (prä-Cox2) vor und wurde somit nicht in die Innenmembran inseriert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Depletion von *Oxa1ts* ausreichend effizient war, um die Insertasefunktion von Oxa1 auszuschalten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *Oxa1ts* über einen Zeitraum von drei Stunden effektiv depletiert werden kann, was sich in einem Defekt der ko-translationalen Membraninsertion von prä-Cox2 widerspiegelt. Obwohl dieser Funktionalitätsverlust vergleichbar mit einer Oxa1-Deletionsmutante ist, war die Integrität der Innenmembran nach Depletion von *Oxa1ts* nicht verändert. Somit stellt die temperatursensitive Mutante *Oxa1ts* ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der Funktion von Oxa1 unabhängig von Sekundäreffekten, wie sie für die Δoxa1 -Mutante beschrieben wurden, dar.

3.1.6 Die Abwesenheit von *Oxa1ts* reduziert die Importeffizienz von Vertretern der mitochondrialen Carrier-Familie

In der zuvor charakterisierten temperatursensitiven Oxa1-Mutante kann *Oxa1ts* über einen Zeitraum von drei Stunden depletiert werden, ohne die Innenmembran zu schädigen. Diese Mutante ermöglicht es somit, die Biogenese mitochondrialer Carrier in *Oxa1ts*-depletierten Mitochondrien zu untersuchen, die ein intaktes Membranpotential aufweisen. Hierzu wurde der ADP/ATP-Carrier Aac2, der Dicarboxylat-Carrier Dic1 und der Phosphat-Carrier Pic2 aus *S. cerevisiae* sowie Aac2 aus *N. crassa* zunächst *in vitro* synthetisiert und anschließend in Mitochondrien des Wildtyps und der *Oxa1ts*-Mutante, die bei 25°C oder 37°C isoliert wurden, importiert. Als Kontrolle dienten die in der Matrix lokalisierten Proteine F₁β und Su9¹⁻⁶⁹-DHFR, deren Import membranpotentialabhängig ist. Die hier gezeigten Mitochondrien des Wildtyps importierten sowohl die matrixlokalisierten als auch die Carrier-Proteine bis zu 25% weniger effizient, wenn die Hefestämme vor der Mitochondrienisolierung bei 37°C vorinkubiert wurden (Abbildung 3.6). Er-

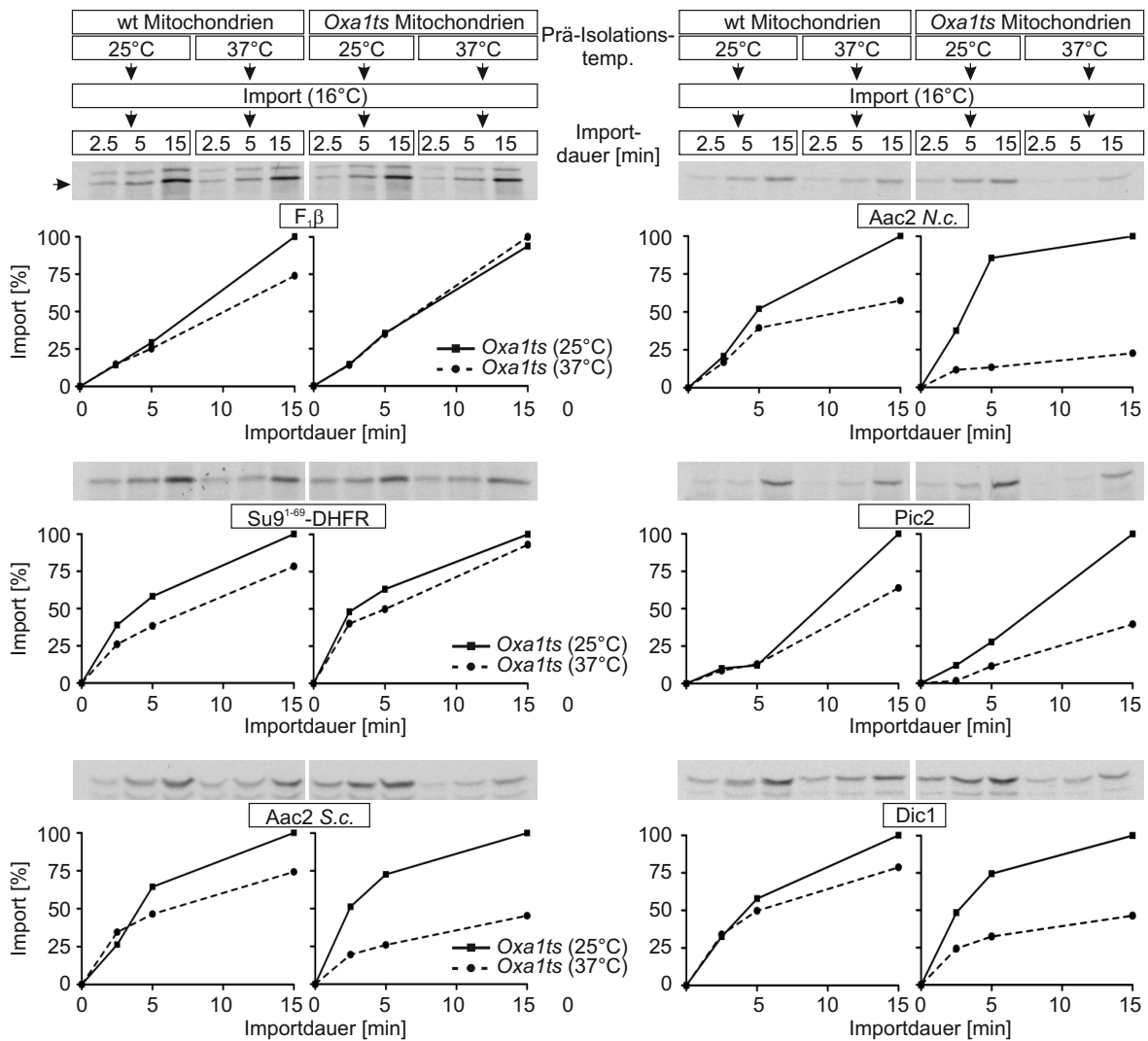


Abbildung 3.6: In Abwesenheit von Oxa1 ist der Import von mitochondrialen Carrier-Proteinen stark gehemmt, während Matrixproteine nicht betroffen sind. Die Matrixproteine Su9¹⁻⁶⁹-DHFR und $F_1\beta$ sowie die Carrier Dic1, Pic2 und Aac2 aus *S. cerevisiae* und Aac2 aus *N. crassa* wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* synthetisiert und anschließend bei 16°C in die angegebenen Mitochondrien importiert. Nicht importierte Proteine wurden durch Proteinase K-Verdau entfernt. Die Mitochondrien wurden in SDS-Ladepuffer lysiert, im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Radioaktivsignale der importierten Proteine aller gezeigten Reaktionen wurden densitometrisch quantifiziert und unter den jeweiligen Importreaktionen graphisch dargestellt.

wartungsgemäß wurden die Matrixproteine sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von *Oxa1ts* gleichermaßen effizient importiert. Der Import aller untersuchten Carrier-Proteine war dagegen in Abwesenheit von *Oxa1ts* um bis zu 75% vermindert. Diese stark verminderte Importeffizienz deutet darauf hin, dass Oxa1 eine wichtige Rolle beim Import von Carrier-Proteinen spielt.

Obwohl Mitochondrien, die nach Vorinkubation bei 25°C oder 37°C der Hefestämme isoliert wurden, ein ähnlich hohes Membranpotential etablieren konnten (Abbildung 3.4 B), waren dennoch gewisse Schwankungen in der Importeffizienz erkennbar (Abbildung 3.6).

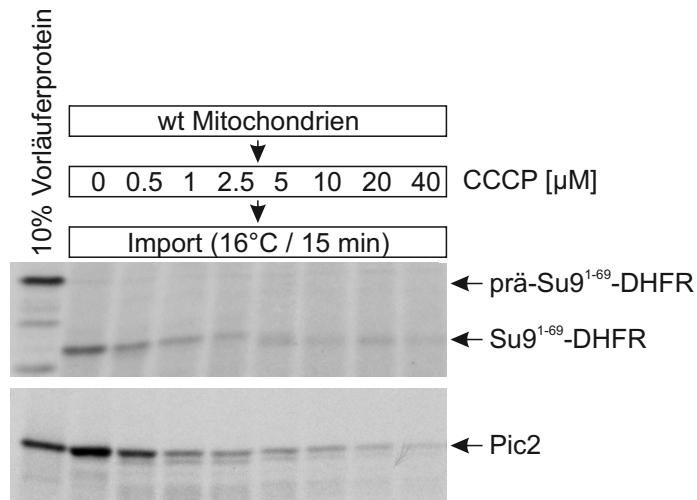


Abbildung 3.7: Die Herabsetzung des Membranpotentials beeinflusst den Import des Matrixproteins Su9¹⁻⁶⁹-DHFR und des Phosphat-Carriers Pic2 in gleicher Weise. Das Matrixprotein Su9¹⁻⁶⁹-DHFR und der Carrier Pic2 wurden *in vitro* synthetisiert und mittels ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Beide Proteine wurden in Wildtyp-Mitochondrien für 15 Minuten bei 16°C importiert, die mit steigender CCCP-Konzentration behandelt wurden. Durch Proteinase K-Verdau wurden nicht importierte Vorläuferproteine entfernt. Die Mitochondrien wurden in SDS-Ladepuffer lysiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und importierte Proteine mittels Autoradiographie detektiert. Die Vorläuferform von Su9¹⁻⁶⁹-DHFR (prä-Su9¹⁻⁶⁹-DHFR) wird beim Import in Mitochondrien durch die mitochondriale Prozessierungsprotease geschnitten, sodass die im SDS-Gel schneller migrierende, mature Form des Proteins erzeugt wird.

Matrixproteine werden mittels des TIM23-Komplexes in die Matrix importiert, während der TIM22-Komplex Carrier-Proteine in die Innenmembran inseriert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Importwege ist es theoretisch vorstellbar, dass der Import eines Matrixproteins insensitiver gegenüber leichten Membranpotentialschwankungen ist als der Import von Carriern. Somit stellt sich die Frage, ob die zuvor festgestellte, drastisch herabgesetzte Importeffizienz der Carrier das Ergebnis der Abwesenheit von *Oxa1ts* ist, oder ob nicht doch minimale Schwankungen des Membranpotentials hierfür verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit des Imports von Su9¹⁻⁶⁹-DHFR und Pic2 bei schrittweiser Herabsetzung des Membranpotentials durch zunehmende Konzentration von CCCP in Wildtyp-Mitochondrien analysiert. Abbildung 3.7 zeigt, dass für beide Proteine bereits geringste Mengen an CCCP den Import empfindlich störten. Darüber hinaus fällt auf, dass die Menge an importiertem Protein mit steigender CCCP-Konzentration in gleicher Weise für Su9¹⁻⁶⁹-DHFR und Pic2 abnahm. Somit wird der Import von Matrixproteinen und Carrier-Proteinen in gleicher Weise durch minimale Schwankungen des Membranpotentials beeinflusst.

Der zuvor beobachtete Carrier-spezifische Importdefekt in Abwesenheit von *Oxa1ts* (Abbildung 3.6) ist somit nicht mit einem minimal herabgesetzten Membranpotential zu erklären, sondern deutet auf eine unerwartete Rolle von *Oxa1* beim Import mitochondrialer Carrier hin.

3.1.7 Der gleichzeitige Import von $F_1\beta$ und *Carrier*-Proteinen verdeutlicht den spezifischen Effekt von *Oxa1* auf den Import der *Carrier*

Im Gegensatz zur *Oxa1ts*-Mutante werden im Wildtyp sowohl *Carrier* als auch Matrixproteine um etwa 25% schlechter importiert, wenn die Mitochondrien nach einer 37°C-Vorinkubation isoliert

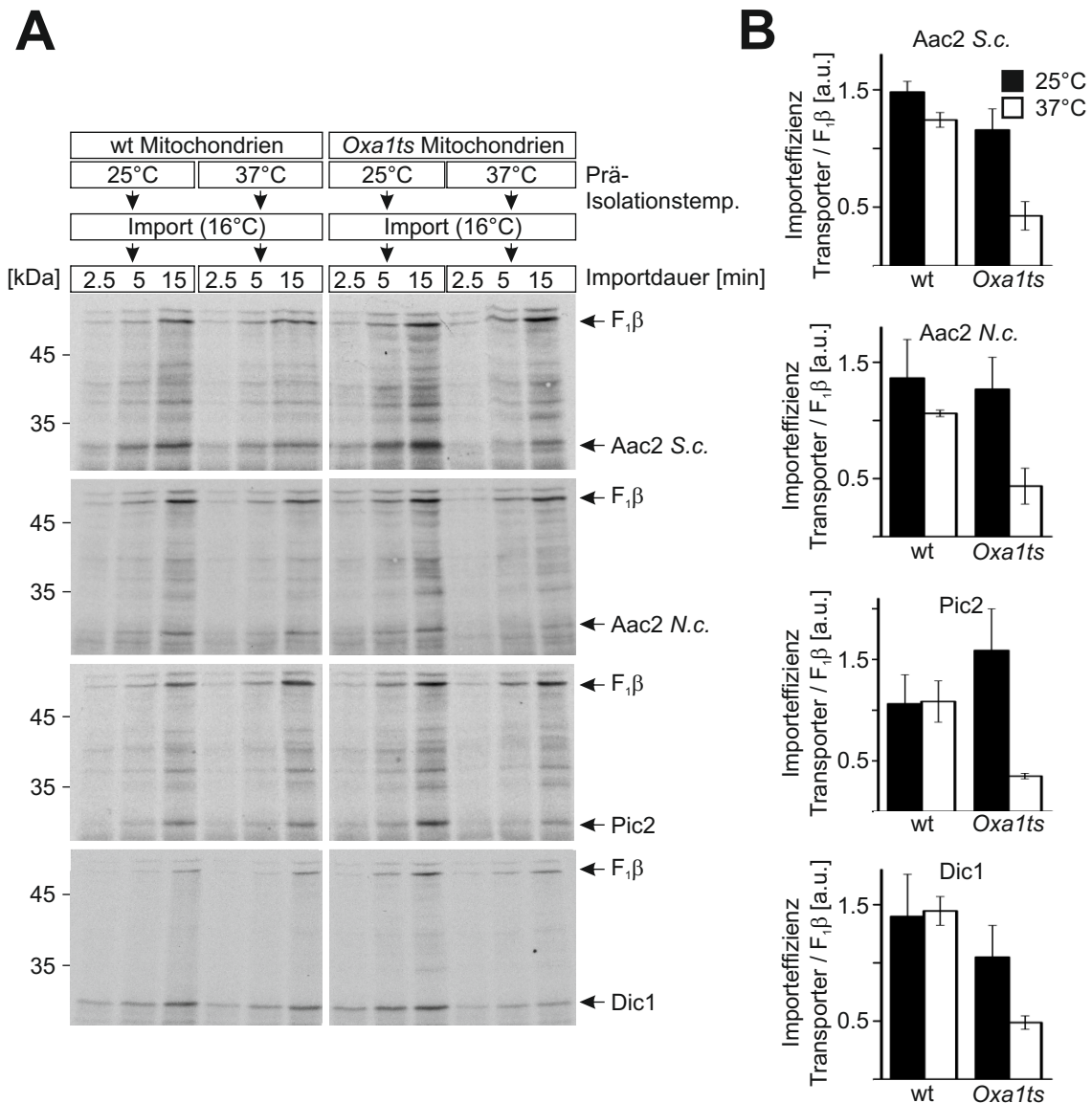


Abbildung 3.8: Der gleichzeitige Import eines *Carrier*s zusammen mit dem Matrixprotein $F_1\beta$ verdeutlicht, dass *Oxa1* für den effektiven Import der *Carrier* wichtig ist. A) Die *in vitro* synthetisierten *Carrier*-Proteine Dic1, Pic2 und Aac2 aus *S. cerevisiae* sowie Aac2 aus *N. crassa* wurden jeweils mit dem ebenfalls *in vitro* synthetisierten Matrixprotein $F_1\beta$ vermischt. Die mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markierten Proteingemische wurden bei 16°C für die angegebenen Zeiträume in Anwesenheit von *Oxa1/Oxa1ts* (wt 25°C und wt 37°C, *Oxa1ts* 25°C) oder in Abwesenheit von *Oxa1ts* (*Oxa1ts* 37°C) in Mitochondrien importiert. Im Anschluss an den Import wurde nicht importiertes Protein proteolytisch entfernt und die Mitochondrien in Ladepuffer lysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie nachgewiesen. B) Die Mengen der nach 15 Minuten importierten Proteine wurden densitometrisch bestimmt und die Importeffizienz der angegebenen *Carrier*-Proteine ermittelt. Hierzu wurde die importierte Menge von *Carrier* auf die importierte Menge an $F_1\beta$ durch Bildung des Quotienten aus aufgenommenem *Carrier*-Protein zu importiertem $F_1\beta$ normalisiert. (n=3)

wurden (Abbildung 3.6). Dies legt nahe, dass es möglicherweise Qualitätsschwankungen zwischen unterschiedlichen Mitochondrienisolationen gibt. Vor allem im Hinblick darauf, dass unterschiedliche Mitochondrientypen miteinander verglichen wurden, ist dies eine wichtige Beobachtung. Um den Import besser kontrollieren und vergleichen zu können, wurde deshalb ein Ko-Importprotokoll etabliert. Dabei wurden die zuvor beschriebenen *Carrier*-Proteine gleichzeitig mit dem Matrixprotein $F_1\beta$ in Mitochondrien importiert (Abbildung 3.8 A). Wieder erkennt man einen ähnlich guten Import von $F_1\beta$ sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von *Oxa1ts*. Im Gegensatz dazu war die Menge an importierten *Carrier*-Proteinen nach Degradation von *Oxa1ts* erneut stark reduziert. Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn man die Resultate unabhängig von den zuvor diskutierten Qualitätsunterschieden verschiedener Mitochondrientypen betrachtet. Hierzu wurden die Mengen der importierten *Carrier*-Proteine auf die Menge des importierten $F_1\beta$ normalisiert, indem der Quotient aus der Stärke des Radioaktivsignals von *Carrier* zu dem von $F_1\beta$ gebildet wurde (Abbildung 3.8 B). Die Balkendiagramme verdeutlichen, dass sowohl in Mitochondrien des Wildtyps als auch in Mitochondrien mit *Oxa1ts* die *Carrier*-Proteine effizient importiert wurden. Durch die Depletion von *Oxa1ts* wurde die Importeffizienz der *Carrier*-Proteine dagegen stark reduziert. Somit bestätigen die Resultate der Ko-Importversuche eine wichtige, wenn auch nicht essentielle Rolle von Oxa1 für den Import mitochondrialer *Carrier*. Worin die Funktion von Oxa1 in diesem Zusammenhang jedoch genau besteht, ist unklar und soll im Folgenden näher untersucht werden.

3.1.8 Die Membraninsertion von *Carrier*-Proteinen ist Oxa1-unabhängig

In Abwesenheit von Oxa1 ist der Import verschiedener *Carrier*-Proteine stark verlangsamt (Abbildung 3.6 und 3.8). Ungeachtet dessen stellt sich weiterhin die Frage, ob die in Abwesenheit von Oxa1 importierten *Carrier*-Proteine in die Membran inseriert werden oder ob sie im Intermembranraum akkumulieren. Um dies zu überprüfen, wurden radioaktiv markierte *Carrier*-Proteine aus *N. crassa* in Mitochondrien mit und ohne *Oxa1ts* über einen Zeitraum von 30 Minuten importiert, um auch in Abwesenheit von Oxa1 ähnliche Mengen *Carrier* wie im Wildtyp zu akkumulieren. Nach dem Import wurden mitochondriale Proteine mittels Carbonat extrahiert (Abbildung 3.9 A). Erwartungsgemäß konnte das integrale Innenmembranprotein Cox2 nicht extrahiert werden und sedimentierte mit den Membranen. Das membranassoziierte, ribosomale Protein Mrpl40 wurde dagegen durch Carbonat aus der Membranfraktion extrahiert und befand sich vorwiegend im Überstand. Der importierte *Carrier* Aac2 verhielt sich wie das Membranprotein Cox2. Dies deutet darauf hin, dass *Carrier* auch in Abwesenheit von Oxa1 in die Membran inseriert werden, wenn auch der Import *per se* stark vermindert ist.

In einem zweiten Ansatz wurde der radioaktiv markierte *Carrier* Dic1 in Mitochondrien importiert und dessen submitochondriale Lokalisierung mittels Mitoplastierung und Proteasebehandlung (Abschnitt 3.1.2) untersucht (Abbildung 3.9 B). In Anwesenheit von *Oxa1ts* lag Dic1 erfolgreich in die Innenmembran inseriert vor. Die Protease konnte in Mitoplasten daher nur einen kleinen Teil

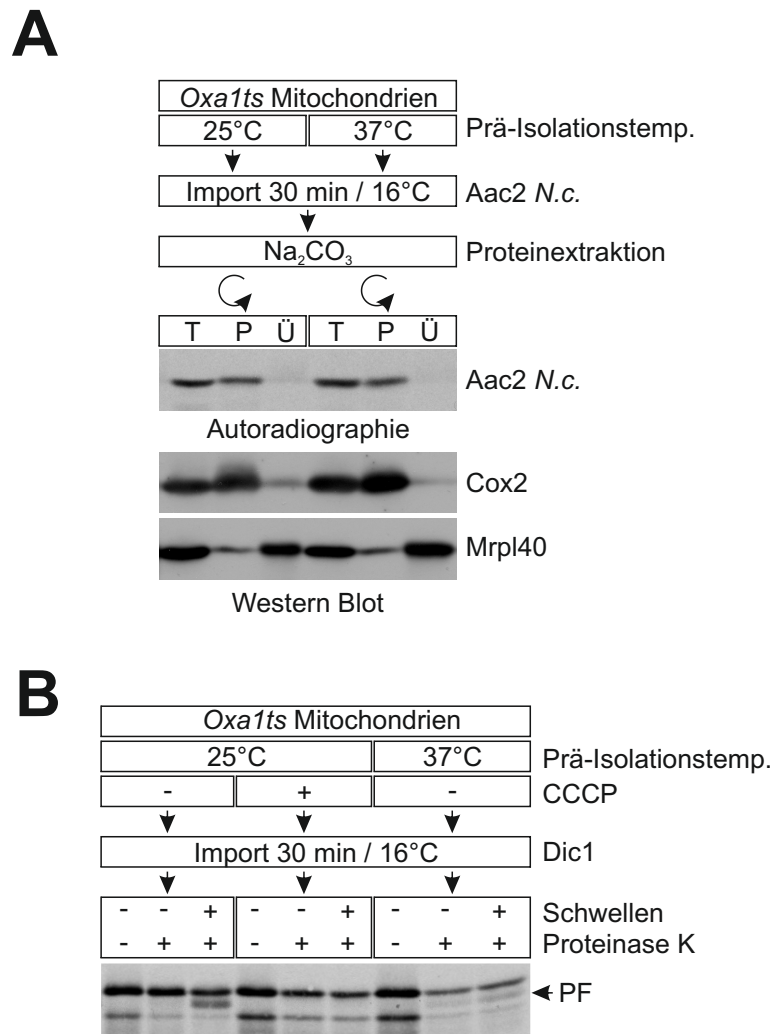


Abbildung 3.9: Carrier werden auch in Abwesenheit von Oxa1ts erfolgreich in die Innenmembran inseriert. Mitochondriale Carrier-Proteine wurden in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ³⁵S-Methionin *in vitro* synthetisiert und in isolierte Mitochondrien bei 16°C für 30 Minuten importiert. A) Nicht importiertes Aac2 aus *S. cerevisiae* wurde durch Proteasebehandlung entfernt und die Mitochondrien reisoliert. Durch 100 mM Carbonat und anschließende Ultrazentrifugation wurden lösliche Proteine von Membranproteinen getrennt. Die Membranfraktion (P) und der Überstand (Ü) wurden mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Autoradiographie analysiert. T = 100% Total. B) Zur Analyse der submitochondrialen Lokalisierung von Dic1 aus *S. cerevisiae* wurde nicht importiertes Protein durch Proteinase K-Behandlung in intakten Mitochondrien oder Mitoplasten, die durch Schwellen in hypotonischem Medium erzeugt wurden, entfernt. Mitochondrien oder Mitoplasten wurden reisoliert, in SDS-Ladepuffer lysiert und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine durch Autoradiographie detektiert. PF = Proteasefragment.

des Proteins verdauen, wodurch das Proteasefragment (PF) des Carriers erzeugt wurde. Durch Zugabe von CCCP und der damit verbundenen Aufhebung des Membranpotentials wurde die Insertion des Carriers in die Membran verhindert. Dic1 konnte somit nicht vollständig importiert werden, war frei zugänglich für die Protease und wurde verdaut. Es trat kein Proteasefragment auf. In Mitochondrien ohne Oxa1ts wurde der Carrier wie auch in Anwesenheit von Oxa1ts, erfolgreich in die Membran inseriert, was sich durch das Auftreten des Proteasefragments (PF) in Mitoplasten zeigte.

Zusammenfassend deuten die Daten der Carbonat-Extraktion und der Proteasebehandlung darauf

hin, dass *Carrier*-Proteine auch in Abwesenheit von Oxa1 erfolgreich in die Membran inseriert werden können.

3.1.9 Frisch importierter ADP/ATP-Carrier kann oxidiert werden

Die verminderte Importeffizienz verschiedener *Carrier*-Proteine in Abwesenheit von *Oxa1ts* zeigt deutlich, dass Oxa1 eine wichtige, wenn auch nicht essentielle Rolle während deren Biogenese einnimmt. Um die Funktion von Oxa1 während der *Carrier*-Biogenese besser zu verstehen sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubte verschiedene *Carrier*-Konformationen zu fixieren. Hierzu wurde zunächst die Sequenz des ADP/ATP-Carriers *in silico* analysiert. Abbildung 3.10 A zeigt, dass Aac2 über vier Cysteine verfügt, zwei davon in Transmembrandomäne fünf und sechs sowie zwei weitere in den hydrophilen Bereichen eins und drei, die die Transmembrandomänen auf der Matrixseite miteinander verbinden. Um zu testen ob es möglich ist, diese Cysteine innerhalb des gleichen Aac2-Moleküls (intramolekular) über Disulfidbrücken zu verbinden, wurde radioaktiv markiertes Aac2 aus *S. cerevisiae* in Wildtyp-Mitochondrien importiert (Abbildung 3.10 B). Durch anschließende Behandlung mit dem Oxidationsmittel Kupferphenanthrolin (Cu(OP)_2) entstand eine im Polyacrylamidgel schneller migrierende Aac2-Form. Dieses Verhalten ist durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken (S-S) zu erklären, durch die das Protein auch in Anwesenheit von SDS nicht vollständig entfaltet werden kann und sich so schneller durch die Poren des Gels bewegt als die nicht oxidierte Form des Proteins (-SH). Diese durch Kupfer-

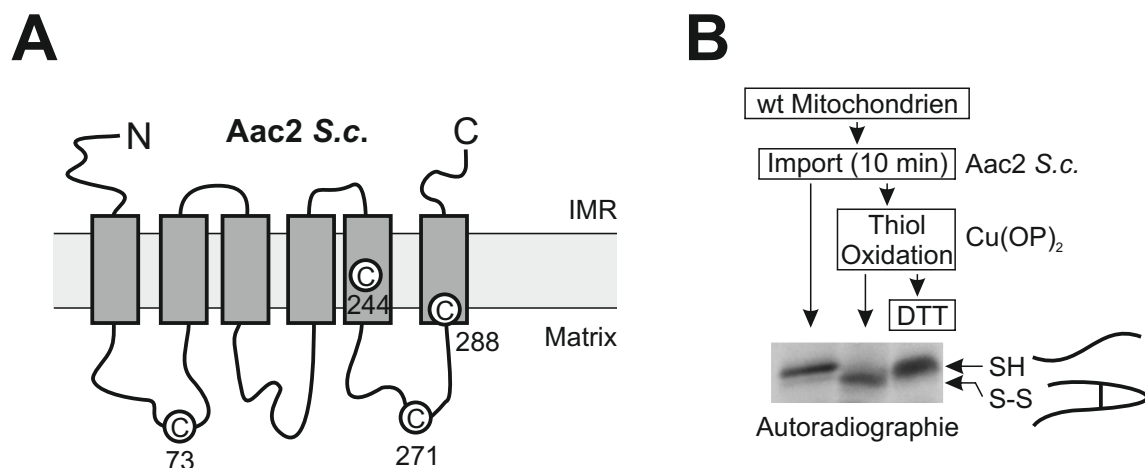


Abbildung 3.10: Frisch importierter ADP/ATP-Carrier kann durch Zugabe des Oxidationsmittels Kupferphenanthrolin zu einer schneller migrierenden Form oxidiert werden. A) Schematische Darstellung des ADP/ATP-Carriers aus *S. cerevisiae*. Die Cysteinreste und ihre Position wurden durch © angedeutet. Die Zahlen geben die Position dieser Cysteine in der Aminosäuresequenz an. B) Mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiertes Aac2 aus *S. cerevisiae* wurde in Wildtyp-Mitochondrien für 10 Minuten bei 16°C importiert. Anschließend wurde nicht importiertes Protein durch Proteinase K-Verdau entfernt und die Mitochondrien mit $100\ \mu\text{M}$ Kupferphenanthrolin (Cu(OP)_2) behandelt. Nicht oxidierte, freie Thiolgruppen wurden durch $5\ \text{mM}$ NEM fixiert. Wenn nicht anders angedeutet, wurden die Mitochondrien ohne Zugabe des Reduktionsmittels DTT lysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

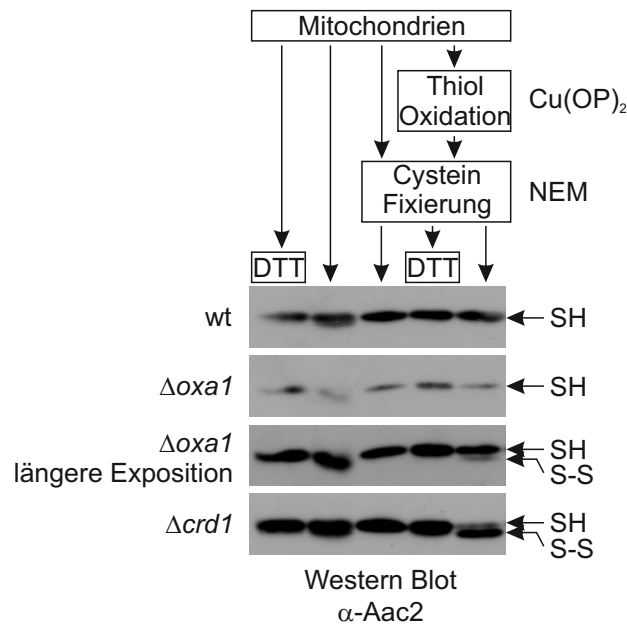


Abbildung 3.11: Der reife, vollständig assemblierte ADP/ATP-Carrier ist für Kupferphenanthrolin unzugänglich und kann nicht oxidiert werden. Mitochondrien des Wildtyps, der $\Delta oxa1$ und der $\Delta crd1$ -Mutante wurden für 15 Minuten mit 100 μ M Kupferphenanthrolin ($Cu(OP)_2$) oxidiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden freie, nicht oxidierte Thiolgruppen durch Zugabe von 5 mM NEM fixiert. Die Mitochondrien wurden entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von DTT in SDS-Ladepuffer lysiert und die Proteine gelelektrophoretisch getrennt. Mittels Western Blot wurden die *steady state*-Oxidationsstadien des *Carriers* Aac2 detektiert.

phenanthrolin künstlich hervorgerufene Oxidation konnte durch das Reduktionsmittel DTT wieder aufgehoben werden.

Wie zuvor gezeigt, kann Aac2 intramolekular durch Ausbildung von Disulfidbrücken oxidiert werden. Zu welchem Zeitpunkt während des Imports die oxidierbare Form auftritt, ist jedoch unklar. Einerseits kann es sich um eine oxidierbare Übergangsform oder um das reife, vollständig assemblierte Protein handeln. Um diese Frage zu klären, wurden isolierte Mitochondrien verschiedener Hefemutanten mit Kupferphenanthrolin behandelt. Anschließend wurden nicht oxidierte Cysteine durch die Behandlung mit N-Ethylmaleimid (NEM) fixiert, um die Oxidation zu einem späteren Zeitpunkt zu verhindern. Die Oxidierbarkeit des *steady state*-ADP/ATP-Carriers Aac2 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers untersucht. Im Wildtyp lag Aac2 auch nach Behandlung mit Kupferphenanthrolin in seiner nicht oxidierten Form vor (Abbildung 3.11, wt, -SH). Fehlt dagegen Oxa1, war zum einen, wie bereits zuvor beobachtet, die Menge an Aac2 drastisch reduziert (Abbildung 3.11, $\Delta oxa1$, SH). Zum anderen zeigte sich jedoch auch, dass eine kleine Menge Aac2 oxidiert werden konnte (S-S). Cardiolipin ist entscheidend für die Funktion und die erfolgreiche Assemblierung mitochondrialer *Carrier*-Proteine (Jiang *et al.*, 2000). In Hefe kodiert *crd1* die Cardiolipin-Synthase, ein essentielles Enzym der Cardiolipinsynthese (Schlame & Greenberg, 1997). Untersucht man die Oxidierbarkeit des *steady state*-Aac2 in einer Mutante, der dieses Gen fehlt ($\Delta crd1$), so fällt auf, dass Aac2 nahezu vollständig in seiner oxidierbaren Form vorlag (Abbildung 3.11). Es handelt sich daher bei dieser oxidierbaren Aac2-Form wahrscheinlich um eine

noch nicht vollständig assemblierte Übergangsform des Proteins. Das reife, vollständig assemblierte Protein, wie es im Wildtyp vorliegt, kann dagegen nicht mehr oxidiert werden.

3.1.10 Die oxidierbare Übergangsform des ADP/ATP-Carriers ist membraninsetiert

Beim Import von *in vitro* synthetisiertem Aac2 entsteht eine Übergangsform, die oxidiert werden kann. Ob diese Form jedoch bereits in frühen Schritten des Imports in den Intermembranraum oder erst später nach der Membraninsertion von Aac2 in die Innenmembran ausgebildet werden kann, ist unklar. Um dies zu untersuchen, wurde radioaktiv markiertes Aac2 in Wildtyp-Mitochondrien importiert und oxidiert. Anschließend wurden die mitochondrialen Membranproteine entweder durch Salz (KCl) oder durch eine Mischung aus Carbonat und Harnstoff extrahiert. Das membranassoziierte ribosomale Protein Mrpl40 konnte zum Teil bereits durch Salzextraktion von der Membran gelöst werden und befand sich nach Carbonat/Harnstoffextraktion vollständig im Überstand. Im Gegensatz hierzu ko-migrierte die oxidierte Aac2-Übergangsform sowohl nach Salz-, als auch nach Carbonat/Harnstoffextraktion zusammen mit dem Membranprotein Cox2 (Abbildung 3.12 A).

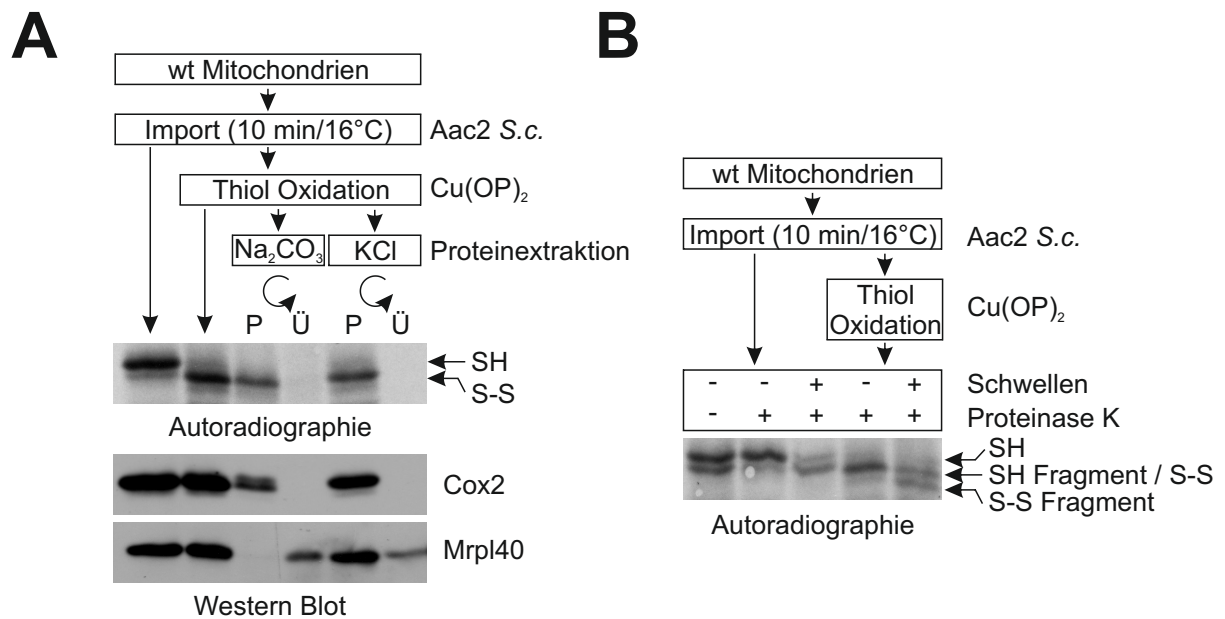


Abbildung 3.12: Die im Polyacrylamidgel schneller migrierende Aac2-Form ist membraninsetiert. Aac2 aus *S. cerevisiae* wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* synthetisiert und bei 16°C für 10 Minuten in Wildtyp-Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit 100 µM Cu(OP)₂ behandelt. A) Nicht importiertes Protein wurden durch Proteinase K-Verdau entfernt und mitochondriale Proteine durch 250 mM KCl oder eine Mischung aus 100 mM Na₂CO₃ und 1 M Harnstoff extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Proteine in gelöste (Überstand) und membranständige Proteine (Pellet) aufgetrennt. B) Der Proteinase K-Verdau erfolgte entweder in intakten Mitochondrien oder in Mitoplasten. Hierzu wurden Mitochondrien entweder in einer isotonischen Lösung aufgenommen oder in einem hypertonischem Medium geschwollen. Anschließend wurden die Mitochondrien reisoliert und in SDS-Ladepuffer ohne DTT lysiert. In A) und B) wurden die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie und Western Blot analysiert.

Die submitochondriale Lokalisierung der oxidierten Übergangsform wurde weiterhin durch Proteasebehandlung untersucht. Hierzu wurde erneut radioaktiv markiertes Aac2 in Mitochondrien importiert und oxidiert. Anschließend wurden die intakten Mitochondrien oder die durch osmotisches Schwellen erzeugten Mitoplasten mit Protease behandelt (Abbildung 3.12 B). In intakten Mitochondrien war der nicht oxidierte ADP/ATP-Carrier vollständig durch die mitochondriale Außenmembran gegen Proteaseverdau geschützt (SH). In Mitoplasten dagegen konnte ein kleiner Teil des Proteins durch die Protease entfernt werden, wodurch eine schneller migrierende Aac2-Form entstand (SH-Fragment). Für die oxidierte Übergangsform des Carriers zeigte sich ein ähnliches Muster. In intakten Mitochondrien war diese Form vor der Protease geschützt (S-S), während in Mitoplasten ebenfalls nur ein kleiner Teil durch die Protease verdaut werden konnte (S-S Fragment). Dieser Befund sowie die Carbonat/Harnstoffextraktion verdeutlichen, dass es sich bei der oxidierbaren Übergangsform des ADP/ATP-Carriers Aac2 aus *S. cerevisiae* um eine in die Membran inserierte Form handelt (Abbildung 3.12 B).

3.1.11 In Anwesenheit von Oxa1 werden Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie effizienter assembliert

Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie werden TIM22-abhängig in die Innenmembran inseriert. Aac2 aus *S. cerevisiae* liegt nach der Membraninsertion zunächst in einer durch Kupferphenanthrolin oxidierbaren Form vor. Diese Übergangsform verschwindet durch die weitere Assemblierung des Carriers und kann nicht mehr nachgewiesen werden. Um eine mögliche Beteiligung von Oxa1 bei diesem Assemblierungsprozess zu untersuchen, wurde *in vitro* synthetisiertes Aac2 in Mitochondrien importiert. Nach 15 Minuten wurde der Import unterbrochen und das Schicksal bereits importierter Carrier-Proteine für 10 Minuten weiter verfolgt. Um die verschiedenen Assemblierungsstadien von Aac2 unterscheiden zu können, wurden die Mitochondrien im Anschluß mit Kupferphenanthrolin behandelt. In Anwesenheit von Oxa1 oder *Oxa1ts* wurde zunächst ausschließlich die oxidierbare Übergangsform des ADP/ATP-Carriers angehäuft (S-S). Diese wurde sehr schnell in die nicht oxidierbare Form überführt (SH), was den oben beschriebenen Assemblierungsweg von Aac2 im Wildtyp reflektiert (Abbildung 3.13). Mitochondrien, denen *Oxa1ts* fehlt, importierten, wie zuvor beschrieben, Aac2 wesentlich langsamer als der Wildtyp (Abbildung 3.13 A). Interessanterweise war jedoch auch die Umwandlung des Carriers von der oxidierbaren Übergangsform in die nicht oxidierbare, assemblierte Form stark verlangsamt. Einen ähnlichen, wenngleich auch drastischeren, Phänotyp beobachtet man in der $\Delta crd1$ -Mutante. Da diese Mutante kein Cardiolipin synthetisieren kann, dieses aber entscheidend für die Dimerisierung von Aac2 ist (Hoffmann *et al.*, 1994; Claypool *et al.*, 2008), lag der Carrier wahrscheinlich ausschließlich in seiner monomeren, oxidierbaren Übergangsform vor und konnte nicht weiter assembliert werden (Abbildung 3.13 A, 3.11).

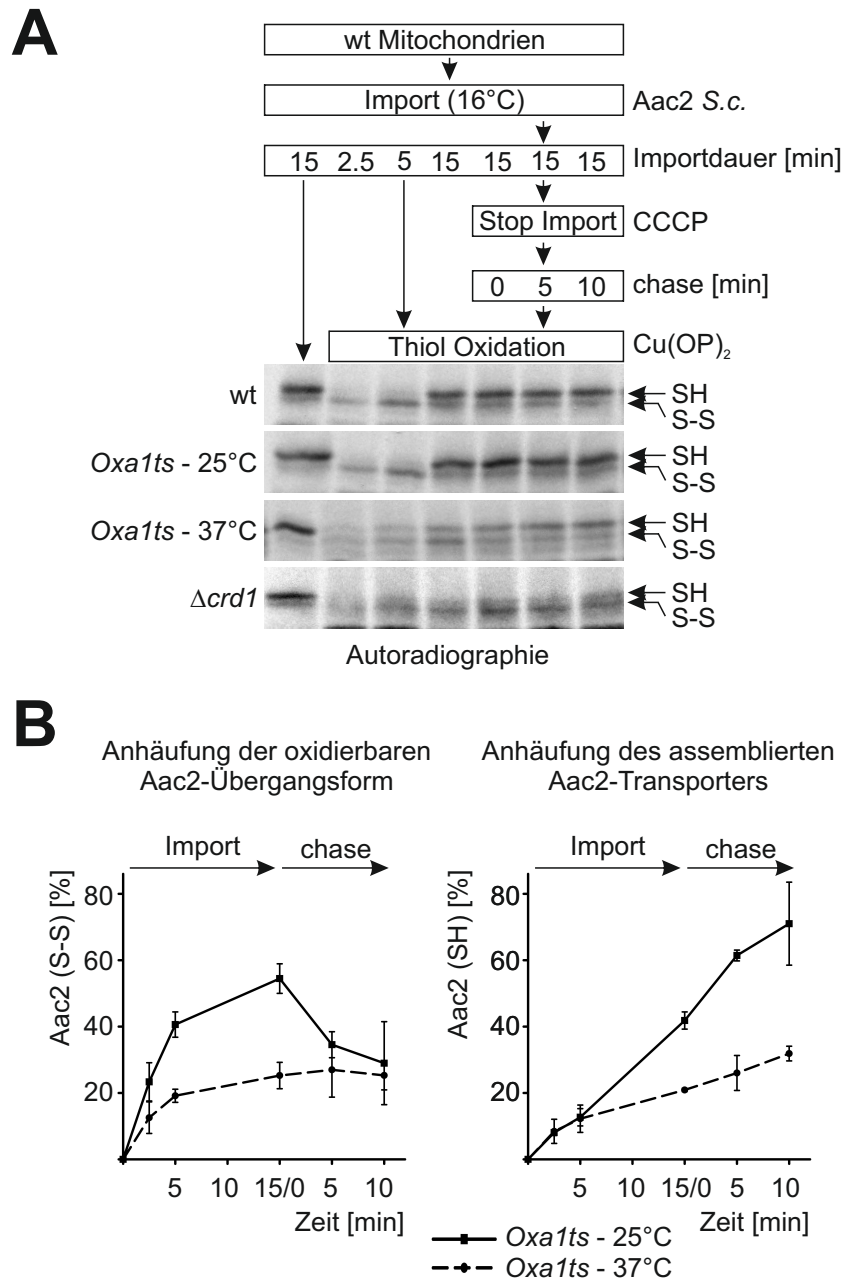
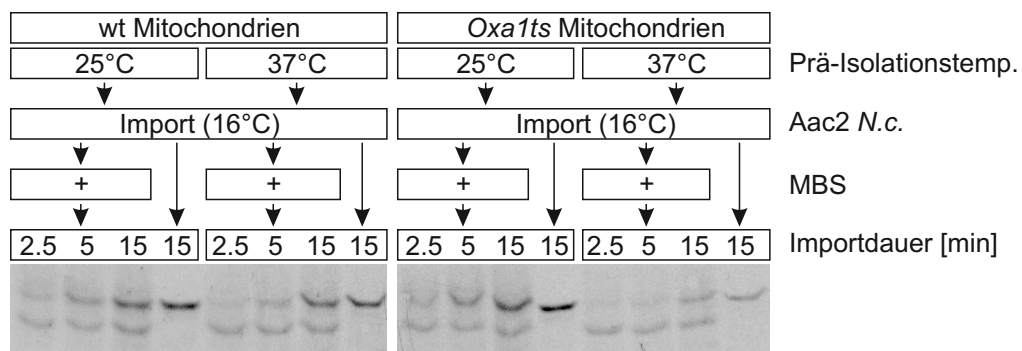


Abbildung 3.13: Oxa1 spielt eine wichtige, wenn auch nicht essentielle Rolle bei der Assemblierung von Aac2 aus *S. cerevisiae*. Radioaktiv markiertes Aac2 aus *S. cerevisiae* wurde für die angegebenen Zeitspannen bei 16°C in Mitochondrien des Wildtyps, einer Δ *crd1*-Mutante oder Mitochondrien mit und ohne *Oxa1ts* (*Oxa1ts*-25°C und *Oxa1ts*-37°C) importiert. Nach 15 Minuten wurde der Import durch Zugabe von 25 μ M CCCP unterbrochen und die Assemblierung des Carriers für 10 Minuten weiter verfolgt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Proben mit 100 μ M Kupferphenanthrolin (Cu(OP)₂) behandelt und nicht importierte Proteine durch Proteinase K-Verdau entfernt. A) Die Mitochondrien wurden in SDS-Ladepuffer lysiert, im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die importierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert. B) Die importierten Mengen der oxidierbaren Übergangsform, sowie der nicht oxidierbaren, vollständig assemblierten Form von Aac2 wurden für *Oxa1ts*-25°C und *Oxa1ts*-37°C densitometrisch quantifiziert. Die Anhäufung dieser beiden Formen wurde graphisch in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. (n=3)

3.1.12 Der ADP/ATP-Carrier aus *N. crassa* wird ebenfalls über eine Übergangsform assembliert

Wie bereits zuvor beschrieben, wird nicht nur Aac2 aus *S. cerevisiae* Oxa1-abhängig importiert, sondern auch weitere mitochondriale Carrier wie Dic1 und Pic2 aus Hefe oder Aac2 aus *N. crassa*. Vorversuche zeigten, dass Aac2 aus *N. crassa* durch den chemischen Quervernetzer *m*-Maleimid-Benzoyl-*N*-Hydroxylsuccinimid-Ester (MBS) intramolekular quervernetzt werden kann und dies

A



B

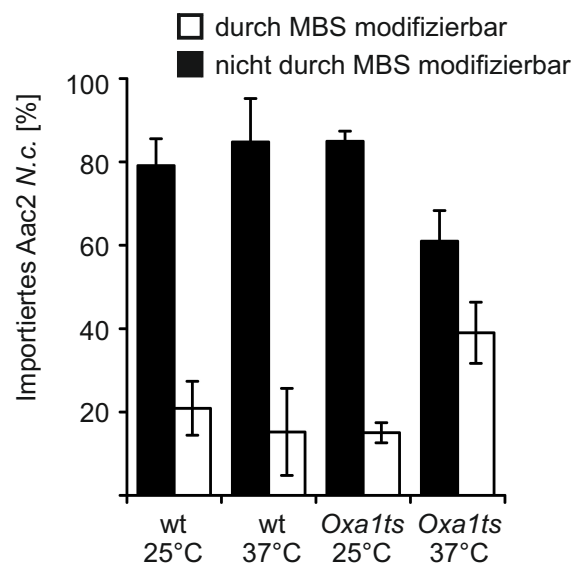


Abbildung 3.14: Aac2 aus *N. crassa* wird ebenfalls über eine Übergangsform assembliert. Aac2 aus *N. crassa* wurde in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert und bei 16°C für die angegebene Zeitspanne in die ange deuteten Wildtyp- und *Oxa1ts*-Mitochondrien importiert. Im Anschluss an den Proteinimport wurden die Mitochondrien mit $400\ \mu\text{M}$ MBS behandelt und nicht importiertes Protein durch Proteaseverdau entfernt. A) Die durch SDS-Ladepuffer gelösten mitochondrialen Proteine wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen. B) Die Radioaktivsignale der nach 15-minütigem Import durch MBS quervernetzten bzw. nicht quervernetzten Carrier-Form wurden densitometrisch quantifiziert und graphisch dargestellt. (n=3)

zu einer konformationsabhängigen Veränderung des Laufverhaltens führt. Diese Möglichkeit wurde daher genutzt, um den Einfluss von Oxa1 auf die Assemblierung von Aac2 aus *N. crassa* zu untersuchen. Hierzu wurde der *Carrier in vitro* synthetisiert, in Wildtyp- oder *Oxa1ts*-Mitochondrien importiert und anschließend mit MBS behandelt. In Anwesenheit von Oxa1 oder *Oxa1ts* trat zunächst eine schneller im Polyacrylamidgel migrierende Aac2-Form auf, bei der es sich um das durch MBS intramolekular quervernetzte Protein handelte (Abbildung 3.14 A). Mit zunehmender Importdauer wurde dieses Quervernetzungsprodukt zunehmend ineffizienter ausgebildet und es entstand eine nicht quervernetzbare Form. Während nach einer Importdauer von 2,5 Minuten die quervernetzte Bande überwog, kehrte sich in Anwesenheit von Oxa1 das Verhältnis nach 15 Minuten um, sodass 80-90% des importierten Proteins nicht mehr quervernetzt werden konnten. Wurde Aac2 aus *N. crassa* dagegen in Mitochondrien ohne *Oxa1ts* importiert, so fällt zunächst auf, dass die quervernetzbare Übergangsform stärker akkumulierte als in Anwesenheit von *Oxa1ts*. Weiterhin trat erst nach 15 Minuten die durch MBS nicht mehr quervernetzbare Form von Aac2 auf, wobei nur knapp 60% Aac2 in diese Form überführt wurden (Abbildung 3.14 A+B). Diese Resultate deuten ebenfalls darauf hin, dass Oxa1 eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des *Carriers* spielen könnte, da die Umwandlung der quervernetzbaren Aac2-Form in die nicht quervernetzbare Form in Anwesenheit von Oxa1 wesentlich effektiver verlief. Somit ist die zuvor beobachtete Übergangsform von Aac2 aus *S. cerevisiae* nicht spezifisch für dieses Protein. Vielmehr scheint während der Assemblierung mitochondrialer *Carrier* generell eine Übergangsform ausgebildet zu werden und Oxa1 könnte die weitere, effiziente Assemblierung gewährleisten. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine kritische Aufgabe von Oxa1 bei der Biogenese von *Carrier*-Proteinen in der mitochondrialen Innenmembran.

3.2 Aufreinigung und Rekonstitution von *S. cerevisiae* Oxa1

Die Multiproteinkomplexe der Atmungskette sind aus kernkodierten und einigen wenigen mitochondrial kodierten Proteinen zusammengesetzt. Letztere werden durch die Insertase Oxa1 in einem ko-translationalen Mechanismus in die Membran inseriert. Darüber hinaus ist Oxa1 auch an der Insertion verschiedener kernkodierter Innenmembranproteine beteiligt. Trotz dieser zentralen Rolle von Oxa1 während der Proteininsertion ist nur wenig über die Natur dieses Proteins bekannt. Weder ist im Moment die Kristallstruktur des Proteins gelöst, noch ist bekannt, wie Oxa1 die Insertion von sowohl kern- als auch mitochondrial kodierten Proteinen katalysiert. Verschiedene Daten deuten darauf hin, dass Oxa1 ein Oligomer bildet, eindeutige Daten zur Stöchiometrie fehlen aber (Preuss *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Szyrach *et al.*, 2003). Weiterhin bleibt zu klären, ob Oxa1 eine Pore in der Membran bildet, um hydrophile Domänen von Substratproteinen in den Intermembranraum zu transportieren.

Da in vielen dieser Experimente sauberes, hochkonzentriertes Protein eingesetzt werden muss, sollte zunächst ein Protokoll zur effizienten Aufreinigung von rekombinant exprimierten Oxa1 aus Bakterien etabliert werden.

3.2.1 Aufreinigung von rekombinantem Oxa1 aus Bakterien

Um sauberes Oxa1 zu gewinnen wurde ein Protokoll etabliert, um es rekombinant in Bakterien zu exprimieren und nativ aufzureinigen. Hierfür wurde zunächst Oxa1 ohne mitochondriale Präsenz in den Vektor pEH1 kloniert, der sich besonders zur Expression von Membranproteinen eignet (Backert *et al.*, 1998). Zur effizienten Aufreinigung wurde Oxa1 N-terminal mit 10 Histidinresten (His₁₀-Tag) versehen (His₁₀Oxa1), gefolgt von einer Schnittstelle für die TEV Protease, die die Abspaltung des His₁₀-Tags erlaubt (Abbildung 3.15 A). Das Konstrukt wurde im *E. coli*-Bakterienstamm BL21(DE3) nach Induktion mit Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) für vier Stunden bei 30°C exprimiert und wie in Abbildung 3.15 B schematisch dargestellt aufgereinigt. Zunächst wurde die bakterielle Zellwand durch Lysozym zerstört, die Zellen durch Ultraschallbehandlung geöffnet und nicht geöffnete Bakterienzellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (Abbildung 3.15 b und 3.16 A, Zelltrümmer). Als nächstes wurden die bakteriellen Membranen durch Ultrazentrifugation isoliert und mittels 1% *n*-Dodecyl- β -maltosid (DDM) lysiert (Abbildung 3.15 b und 3.16 A, Lysat). Unlösliche Membranbestandteile wurden durch erneute Ultrazentrifugation abgetrennt und verworfen, während das geklärte Lysat zur Bindung von His₁₀Oxa1 mit Nickel-NTA-Sepharose inkubiert wurde (NiNTA-Sepharose vor dem Waschen). Unspezifisch gebundene Proteine wurden nach der Inkubation durch mehrfaches Waschen der Sepharose entfernt (Waschfraktionen 1-5) und His₁₀Oxa1 wurde durch Zugabe eines Überschusses an Imidazol von der Nickel-NTA-Matrix eluiert. Eine Testexpression im kleinen Maßstab belegte, dass His₁₀Oxa1 nahezu verlustfrei an die Nickel-NTA-Matrix gebunden und von dieser eluiert werden kann (Abbildung 3.16 A, Elution).

Die Aufreinigung größerer Mengen His₁₀Oxa1 erfolgte aus 2,5 Litern Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von circa 1,0 nach dem eben beschriebenen Protokoll. Die Elutionsfraktionen einer solchen Aufreinigung sind in Abbildung 3.16 B dargestellt. Durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe wurde abgeschätzt, dass aus 2,5 Litern Bakterienkultur etwa 2,5 mg His₁₀Oxa1 aufgereinigt werden konnten.

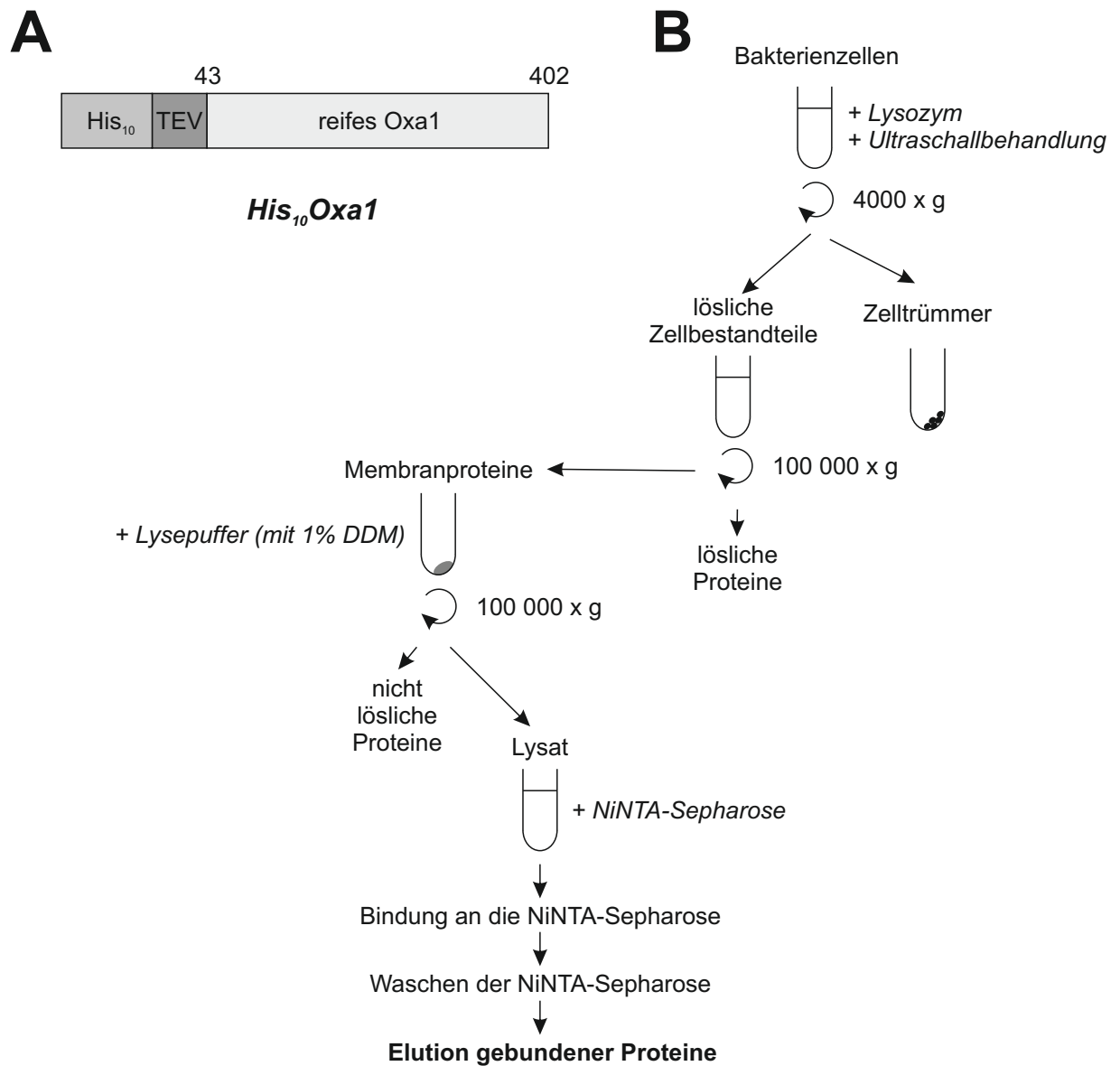


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung A) des His₁₀Oxa1-Konstrukts und B) des Aufreinigungsprotokolls von in Bakterien rekombinant exprimiertem His₁₀Oxa1.

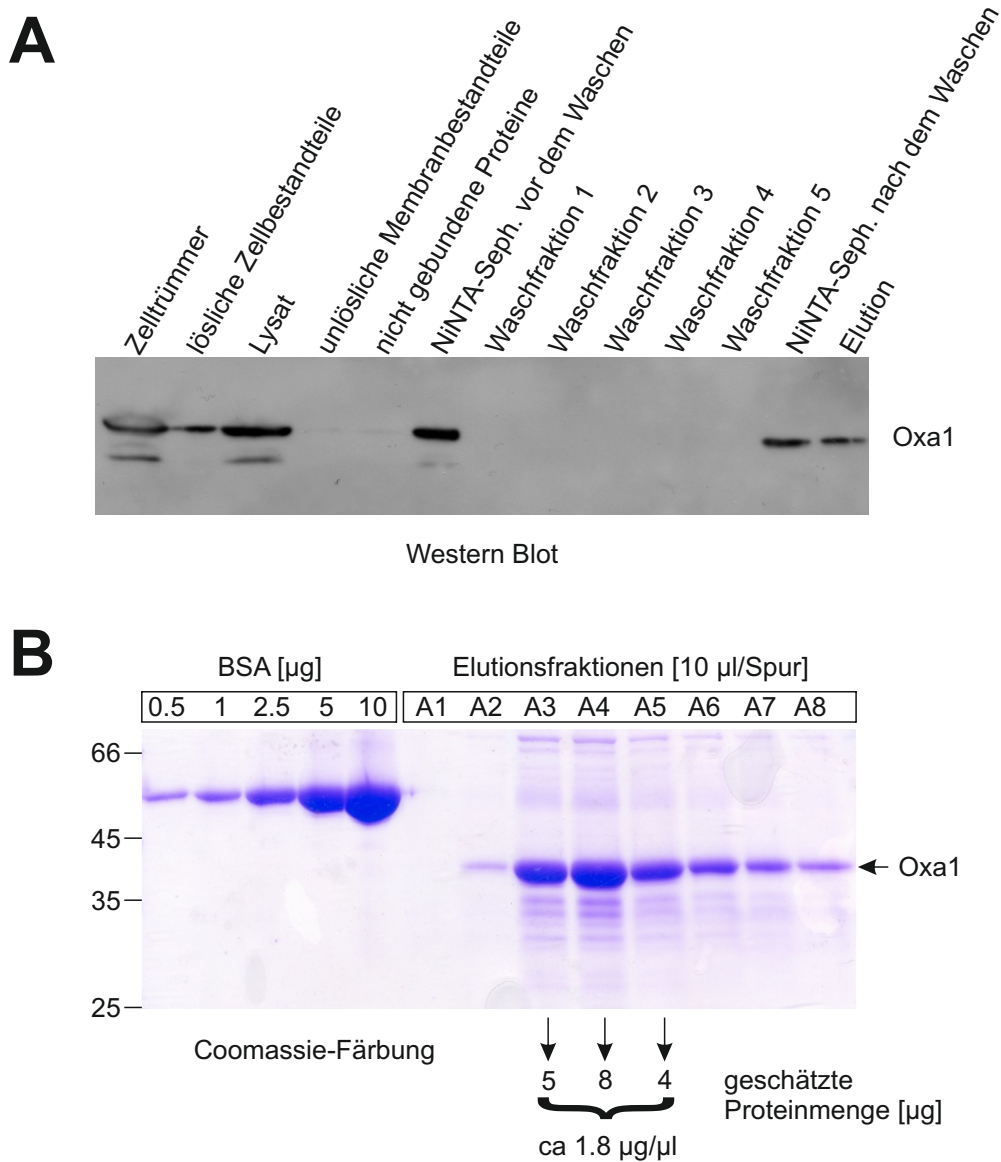


Abbildung 3.16: Rekombinant exprimiertes His₁₀Oxa1 kann nativ aus Bakterienzellen isoliert werden. His₁₀Oxa1 wurde wie im Text beschrieben und in Abb. 3.15 B graphisch dargestellt aus BL21(DE3)-Zellen aufgereinigt. A) Äquivalente Probenmengen verschiedener Aufreinigungsschritte einer Testaufreinigung wurden gesammelt und mit SDS-Ladepuffer versehen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Oxa1 wurde anschließend durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. B) His₁₀Oxa1 wurde im größeren Maßstab aus 2,5 Litern Bakterienkultur aufgereinigt. 10 μl jeder Elutionsfraktion wurde mit SDS-Ladepuffer versehen und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Abschätzung der Proteinlevel wurden zunehmende Mengen Rinderserumalbumin (BSA) geladen. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Seph. = Sepharose

3.2.2 Rekombinantes Oxa1 liegt als Homooligomer vor

Frühere Untersuchungen mit intakten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* oder aufgereinigtem Oxa1 aus *N. crassa* zeigten, dass Oxa1 als Oligomer vorliegt (Preuss *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Szyrach *et al.*, 2003). Da die Aufreinigung von His₁₀Oxa1 aus *E. coli* erfolgreich war, stellte sich nun die Frage, in welcher Form das aufgereinigte, rekombinante Oxa1 vorliegt. Um dies zu tes-

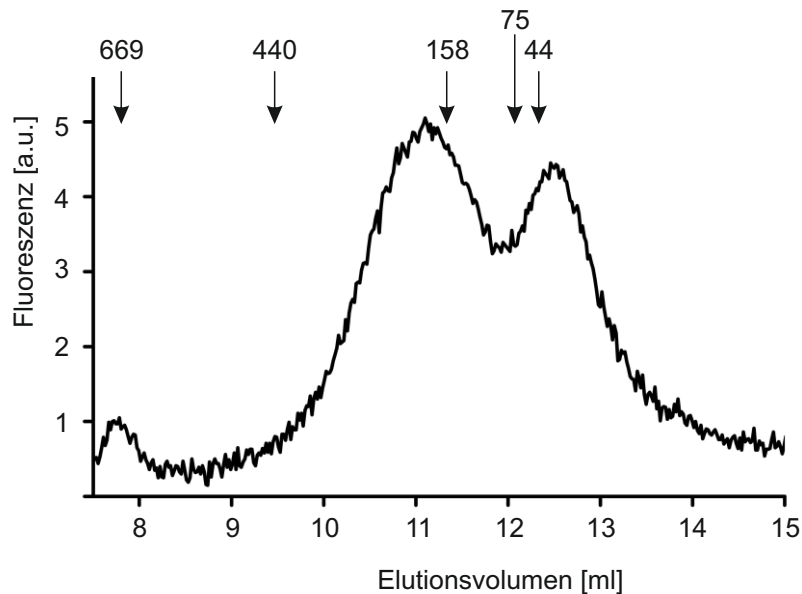


Abbildung 3.17: Aus Bakterien aufgereinigtes His₁₀Oxa1 formt einen etwa 200 kDa großen Komplex. His₁₀Oxa1 wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben nativ aufgereinigt. Anschließend wurde das gereinigte Protein in Anwesenheit von 0.1% DDM mittels einer Superose-12 Säule gelchromatographisch aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem Gesamtvolumen von 15 ml. Dargestellt ist die Veränderung des Fluoreszenzsignals bei 280 nm während des Gelfiltrationslaufs.

ten, wurde die Größe des nativ aufgereinigten His₁₀Oxa1 mittels Gelfiltrations-Chromatographie analysiert (Abbildung 3.17). Das Chromatogramm der Gelfiltration wies zwei Maxima auf. Eines dieser Maxima lag bei ca. 40 kDa was der apparenten Größe von Oxa1 im Polyacrylamidgel entspricht (Abbildung 3.16 B). Das andere Maximum lag bei etwa 200 kDa. Da in der Gelfiltration aufgereinigtes Protein aufgetrennt wurde, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Homooligomer aus vier bis fünf His₁₀Oxa1-Untereinheiten. Berücksichtigt man allerdings, dass die Größe von solubilisierten Membranproteinkomplexen durch assoziierte Detergenzmizellen verändert wird, kann auch ein His₁₀Oxa1-Dimer nicht ausgeschlossen werden (Møller & le Maire, 1993). Ungeachtet der genauen Größe des aufgereinigten OXA1-Komplexes, deuten diese Daten darauf hin, dass rekombinant exprimiertes Oxa1 erfolgreich in die Bakterienmembran inseriert und assembliert wurde und wahrscheinlich auch funktionell ist.

3.2.3 His₁₀Oxa1 kann erfolgreich in Liposomen rekonstituiert werden

Die Möglichkeit, rekombinantes His₁₀Oxa1 sauber und in seiner nativen Konformation aufzureinigen, erlaubt es, eine Reihe verschiedener Aspekte zur Funktion von Oxa1 genauer zu untersuchen. Hierzu gehören Projekte wie die Kristallisation von Oxa1 oder die elektrochemische Analyse der Poreneigenschaft von Oxa1 mittels *black lipid membranes*, die alle in Kollaboration mit anderen Gruppen initiiert wurden. Darüber hinaus ist die genaue Funktionsweise von Oxa1 auf molekularer Ebene noch immer nicht bekannt. Um diese Frage unabhängig von der komplizierten

Proteinzusammensetzung der mitochondrialen Innenmembran zu untersuchen, wurde His₁₀Oxa1 in Liposomen rekonstituiert. Der erfolgreiche Einbau des His₁₀Oxa1 in die Liposomen wurde durch die Flotation der Oxa1-Proteoliposomen in einem Zuckerstufengradient untersucht. Hierzu wurden die His₁₀Oxa1-Proteoliposomen zunächst mit Carbonat behandelt, um nur peripher assoziiertes Protein zu extrahieren. Anschließend wurden diese Liposomen in eine hochmolare Saccharoselösung aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Saccharoselösungen abnehmender Molarität überschichtet. Bei der nachfolgenden Ultrazentrifugation wanderten die Liposomen entsprechend ihrer Dichte in eine der niedermolekularen Schichten des Saccharosegradienten (Abbildung 3.18). Nach der Zentrifugation fand man einen Großteil des rekombinanten His₁₀Oxa1 in den oberen Fraktionen des Stufengradienten. Dies deutet darauf hin, dass His₁₀Oxa1 erfolgreich in die Liposomen eingebaut und zusammen mit diesen flotierte wurde. Allerdings aggregierte auch ein kleiner Teil des rekombinanten His₁₀Oxa1 und war nach der Flotation im Pellet zu finden. Ungeachtet dessen zeigen die erhaltenen Resultate, dass His₁₀Oxa1 erfolgreich in Liposomen rekonstituiert werden kann.

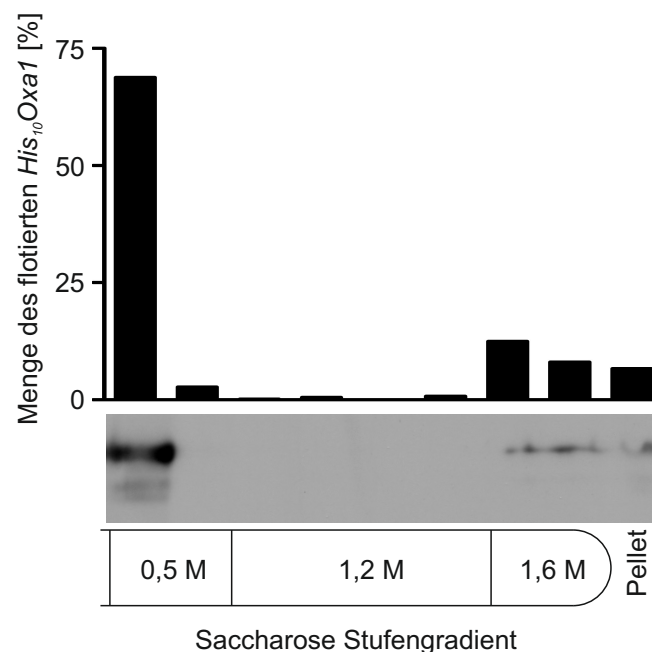


Abbildung 3.18: Nach der Rekonstitution von His₁₀Oxa1 in Liposomen kann das Protein erfolgreich flотиert werden. Rekonstituierte His₁₀Oxa1-Proteoliposomen wurden nach dem Auftauen kurz Ultraschall-behandelt und die Proteine mit 100 mM Carbonat extrahiert. Anschließend wurden sie in einer hochmolaren Zuckerlösung verdünnt, deren Endkonzentration 1,6 M Saccharose war. Diese Saccharoseschicht wurde mit einer 1,2 M Saccharoselösung und einer 0,5 M Saccharoselösung überschichtet und die Proteoliposomen durch Ultrazentrifugation (16 h, 140 000 · g) flотиert. Der Saccharose-Stufengradient wurde in acht Fraktionen geerntet, die Proteine mittels Trichloressigsäure gefällt, in SDS-Ladepuffer gelöst, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Verteilung von His₁₀Oxa1 in den einzelnen Fraktionen densitometrisch bestimmt und graphisch dargestellt. Pellet = Material am Boden des Zentrifugenröhrchens wurde mit Ladepuffer resuspendiert.

3.2.4 Das Innenmembranprotein Atp8 wird Oxa1-abhängig in rekonstituierte Liposomen inseriert

Um die Rolle von Oxa1 bei der ko-translationalen Proteininsertion im Detail untersuchen zu können, wurde zunächst ein entsprechender *in vitro*-Assay etabliert. Hierzu wurde das mitochondrial kodierte Innenmembranprotein Atp8 in Anwesenheit von radioaktivem ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert. Die Translation fand entweder in Abwesenheit von Proteoliposomen oder in Anwesenheit von Liposomen statt, die mit His₁₀Oxa1 beladen waren oder kein Protein enthielten. Die Insertion von Atp8 in die Liposomen wurde erneut durch Flotation in einem Saccharose-Stufengradienten überprüft. Ein erstes Experiment zeigte, dass Atp8, welches in Abwesenheit von Liposomen oder in Anwesenheit leerer Liposomen synthetisiert wurde, in der hochmolekularen Saccharoseschicht verblieb (Abbildung 3.19). In Anwesenheit von His₁₀Oxa1-Proteoliposomen wurden dagegen etwa 25% des translatierten Atp8 zusammen mit den Liposomen floriert. Die An-

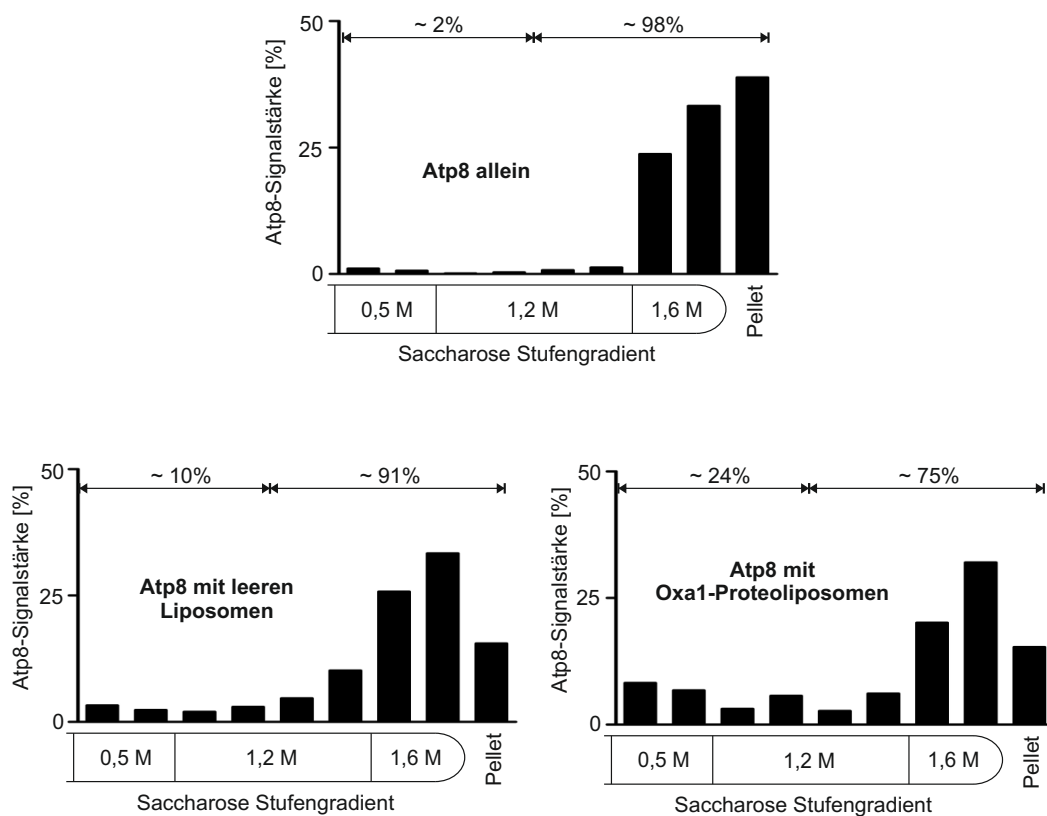


Abbildung 3.19: Atp8 wird in Oxa1-Proteoliposomen, nicht aber in leere Liposomen inseriert. Atp8 wurde in Abwesenheit von Liposomen, in Anwesenheit leerer Liposomen oder His₁₀Oxa1-Proteoliposomen *in vitro* für 15 Minuten bei 30°C translatiert und dabei mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Die Translation von Atp8 wurde gestoppt und die Reaktionen in eine hochmolekulare Saccharoselösung mit einer Endkonzentration von 1,6 M aufgenommen. Diese wurde mit einer 1,2 M und einer 0,5 M Saccharoselösung überschichtet. Um die Lipide zu flotieren, wurden die Stufengradienten für 16 Stunden bei 140 000 · g zentrifugiert. Die Gradienten wurden geerntet, die acht Fraktionen mit SDS-Laufpuffer versetzt, ein mögliches Pellet in SDS-Ladepuffer resuspendiert und die Proteine anschließend gelelektrophoretisch getrennt. Durch Autoradiographie nachgewiesenes Atp8 der einzelnen Fraktionen wurde densitometrisch quantifiziert und graphisch dargestellt.

wesenheit von Oxa1 führt also zu einer deutlich verstärkten Insertion oder Assoziation von Atp8 mit Liposomen. Dies zeigt zum ersten Mal, dass Oxa1 direkt die Insertion von Membranproteinen katalysiert. Mit diesem rekonstituierten Insertionsansatz sollte es in Zukunft möglich sein, die molekularen Mechanismen der Oxa1-vermittelten Proteinbiogenesevorgänge aufzuklären.

4 Diskussion

Die mitochondriale Innenmembran ist eine wichtige Schnittstelle zwischen zytosolischen Stoffwechselfvorgängen und denen, die in der mitochondrialen Matrix ablaufen. Unter anderem beherbergt die Innenmembran die Multiproteinkomplexe der Atmungskette, die eine Schlüsselfunktion bei der zellulären Energiegewinnung einnehmen. In *S. cerevisiae* umfasst die Atmungskette vier Komplexe, deren Untereinheiten von zwei unterschiedlichen genetischen Systemen synthetisiert werden – der zytosolischen und der mitochondrialen Expressionsmaschinerie. Die kernkodierte Untereinheiten werden im Zytosol synthetisiert, durch die Translokasen der äußeren und inneren Membran in die Mitochondrien importiert und in die Innenmembran inseriert. Parallel dazu werden die mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in der Matrix synthetisiert und ko-translational in einem durch Oxa1 vermittelten Prozess in die Innenmembran inseriert (Hell *et al.*, 2001). Anschließend werden die Proteine in ihre dreidimensionale Struktur gefaltet und assembliert.

Im Fall von löslichen Proteinen stellen Chaperone Faltungshelfer dar, die für eine schnelle und effiziente Proteinfaltung und Assemblierung nötig sind (Hartl, 1996). Sie erkennen hydrophobe Bereiche einer Polypeptidkette, binden diese und verhindern so deren unkontrollierte Faltung und Aggregation im wässrigen Milieu (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Albanèse *et al.*, 2006; Vabulas *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu ist nur wenig über die Mechanismen oder Faktoren bekannt, die zur Faltung und Assemblierung integraler Membranproteine nötig sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Insertase Oxa1 nicht nur an der Insertion von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran beteiligt ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Faltung und Assemblierung von Membranproteinen übernehmen kann.

4.1 Die Rolle von Oxa1 bei der Biogenese mitochondrialer Innenmembranproteine

Oxa1 ist eine zentrale Komponente der Insertionsmaschinerie mitochondrial kodierter Proteine und von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Integrität der inneren mitochondrialen Membran. So sind beispielsweise nicht nur die Level mitochondrial kodierter Proteine wie Cox2 in Abwesenheit von Oxa1 reduziert (Abbildung 3.1) (He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997), sondern auch eine Reihe kernkodierter Proteine wie die beiden Untereinheiten Rip1 und Cor2 der Cytochrom *c*-Reduktase. Letzteres lässt sich damit erklären, dass Komplex III in Abwesenheit einzelner struktureller Untereinheiten nicht vollständig assembliert werden kann, was sich auch auf die Stabilität anderer Komplexkomponenten auswirkt (Crivellone *et al.*, 1988). Ungeklärt bleibt an dieser Stelle jedoch, ob dieser Effekt die Folge der ineffizienten, Oxa1-abhängigen *Cytb*-Insertion ist oder ob Oxa1 eine direkte Rolle bei der Assemblierung von Komplex III spielt.

Neben verschiedenen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe ist auch die Stabilität anderer

Innenmembranproteine in Abwesenheit von Oxa1 betroffen. Ein Beispiel hierfür ist der ABC-Transporter Atm1, dessen vollständige Insertion in die Innenmembran unter anderem von Oxa1 abhängt (Bohnert *et al.*, 2010). Fehlt Oxa1, wird Atm1 vermutlich nur unvollständig in die Membran inseriert, kann nicht assemblieren, ist instabil und wird abgebaut. Auch die Level des kernkodierten ADP/ATP-Carriers Aac2 sind in der $\Delta oxa1$ -Mutante stark reduziert. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von Oxa1 bei der Biogenese von Aac2 und eventuell weiteren Vertretern der mitochondrialen Carrier-Familie hin. Die genaue mechanistische Ursache für die reduzierten *steady state*-Level der oben beschriebenen Proteine in der $\Delta oxa1$ -Mutante ist nicht bekannt. Nichtsdestotrotz deuten die gesammelten Daten darauf hin, dass neben der erfolgreichen Membraninsertion auch die Faltung und Assemblierung die Stabilität von Membranproteinen beeinflussen kann.

4.2 Oxa1 spielt eine bisher unbeschriebene Rolle bei der Biogenese mitochondrialer Carrier

Der Import und die Membraninsertion mitochondrialer Carrier sind bereits im Detail untersucht worden. Eine Beteiligung von Oxa1 an der Biogenese von Carrier-Proteinen wurde bisher jedoch nicht gefunden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass Oxa1 eine kritische Rolle bei diesem Prozess spielt.

Im Folgenden werden Möglichkeiten diskutiert, auf welche Weise Oxa1 die Biogenese der Carrier unterstützen könnte und verschiedene Interpretationsweisen der in dieser Arbeit beobachteten Effekte vorgeschlagen und beurteilt.

4.2.1 Die Beteiligung von Oxa1 am Import der Carrier in Mitochondrien

Eine mögliche Erklärung der stark verringerten Importeffizienz aller untersuchten Carrier in Abwesenheit von Oxa1 wäre eine direkte Beteiligung von Oxa1 während des Imports dieser Proteine. Dem gegenwärtigen, gut beschriebenen und allgemein akzeptierten Modell zufolge werden die im Zytosol synthetisierten Carrier durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum der Mitochondrien importiert. Dort wechselwirken sie mit den kleinen Tim-Proteinen und werden anschließend durch die TIM22-Translokase in die Membran inseriert (Abbildung 1.2) (Endres *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001; Truscott *et al.*, 2002; Rehling *et al.*, 2004; Brandner *et al.*, 2005). Dabei werden zunächst Transmembrandomäne fünf und sechs (Modul 3) der Carrier-Proteine in einer Haarnadel-ähnlichen Konformation in Abhängigkeit vom Membranpotential in die Membran inseriert. Im Anschluss erst können Transmembrandomänen drei und vier (Modul 2) sowie eins und zwei (Modul 1) in die Innenmembran integriert werden (Rehling *et al.*, 2004), die alleine den TIM22-Komplex weder binden, noch TIM22-vermittelt in die Membran inseriert werden können (Endres *et al.*, 1999; Brandner *et al.*, 2005). In diesem Modell ist die Membraninsertion der

Carrier lediglich von TIM22 abhängig und die Beteiligung anderer Insertionsmaschinerien der Innenmembran wird nicht berücksichtigt. Interessanterweise wurde jedoch gezeigt, dass die Erkennung und Membraninsertion der individuellen *Carrier*-Module auch durch den TIM23-Komplex möglich ist (Vergnolle *et al.*, 2005b). Dieser Befund wirft daher die Frage auf, ob tatsächlich alle 3 Module der *Carrier*-Proteine ausschließlich über den TIM22-Komplex in die Membran inseriert werden, oder ob dieser mit anderen Translokasen der Innenmembran kooperiert. Eine ähnliche Situation wurde für ein anderes Membranprotein, den ABC-Transporter Mdl1 beschrieben. Bei dessen Insertion wirken zwei unabhängige Insertionssysteme zusammen: Hierbei werden die Transmembrandomänen 1 und 2 per Stopp-Transfer-Mechanismus mittels des TIM23-Komplexes in die Innenmembran inseriert. Im Anschluss werden die Transmembrandomänen 3 und 4 zunächst in die Matrix importiert und in einem anschließenden, Oxa1-vermittelten Schritt in die Membran inseriert (Bohnert *et al.*, 2010). Diese Studie zeigt somit eindrucksvoll, dass verschiedene Insertionsmaschinerien der mitochondrialen Innenmembran bei der Proteininsertion zusammenwirken können. Im Hinblick darauf ist es also theoretisch denkbar, dass die Module 1 und/oder 2 der *Carrier* in einem TIM23- oder Oxa1-vermittelten Schritt in die Innenmembran inseriert werden. Ein solches Szenario würde die drastisch reduzierte Importeffizienz von *Carriern* in der *Oxa1ts*-Mutante erklären und könnte ebenfalls für die in der Δ *oxa1*-Mutante beobachteten, reduzierten *steady state*-Mengen an Aac2 verantwortlich sein. Betrachtet man jedoch die Membraninsertion frisch importierter *Carrier*-Moleküle in Abwesenheit von *Oxa1ts*, zeigen sowohl Daten der Carbonat-Extraktion als auch die Analyse der submitochondrialen Lokalisierung durch Proteaseverdau (Abbildung 3.9), dass die eigentliche Insertion in die mitochondriale Innenmembran nicht gestört ist. Damit ist eine essentielle Funktion von Oxa1 bei der Membraninsertion mitochondrialer *Carrier* auszuschließen. Der ineffiziente Import von *Carriern* in die *Oxa1ts*-Mutante wird somit wahrscheinlich durch einen späteren Oxa1-vermittelten Schritt der *Carrier*-Biogenese verursacht.

4.2.2 Die Rolle von Oxa1 bei der Freisetzung von *Carrier*-Proteinen aus der TIM22-Translokase

Eine alternative Erklärung für den ineffizienten Import der *Carrier* in Abwesenheit von Oxa1 wäre eine Beteiligung von Oxa1 an der Freisetzung der importierten Proteine aus der TIM22-Translokase. Hierbei wäre der TIM22-Komplex durch zuvor importierte Proteine blockiert und der Import käme in Abwesenheit von Oxa1 zum Erliegen. Eine ähnliche Funktion wurde in der Tat für das Oxa1-Homolog YidC beschrieben. YidC ist ein essentieller Bestandteil der bakteriellen Innenmembran und kann, ähnlich Oxa1, Proteine eigenständig in die Membran inserieren (Serek *et al.*, 2004; van der Laan *et al.*, 2004a). Darüber hinaus bildet YidC aber auch mit der SecYEG-Translokase einen Komplex, der an der Insertion einer Reihe weiterer Substratproteine wie beispielsweise der Untereinheit a der F_1F_0 -ATPase oder der Untereinheit K der NADH-Dehydrogenase I beteiligt ist (Yi *et al.*, 2003, 2004; Price & Driessen, 2010). YidC scheint hier-

bei die Freisetzung der inserierten Sec-Substrate zu erleichtern, indem es deren Transmembrandomänen beim Übergang vom SecYEG-Translokation in die Lipidmembran bindet und so stabilisiert (Urbanus *et al.*, 2001). Vergleichbar dieser Funktion wäre es denkbar, dass Oxa1 in ähnlicher Weise an der Freisetzung der *Carrier*-Proteine aus dem TIM22-Komplex beteiligt ist. Diese Möglichkeit ist jedoch relativ unwahrscheinlich, denn alle Importexperimente wurden mit radioaktiv markierten *Carrier*-Proteinen durchgeführt (Abbildung 3.6 und 3.7). Die hierbei importierten, radioaktiven Substratmengen sind so gering, dass die Anzahl der Translokationskomplexe nicht gesättigt wird (Palmisano *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2002). Die unvollständig importierten, im TIM22-Komplex arretierten *Carrier*-Moleküle sollten daher auch in Abwesenheit von Oxa1 in vergleichbaren Mengen detektierbar sein wie die in Anwesenheit von Oxa1 vollständig importierten *Carrier*. Zudem sollte durch den mit *Carrier*-Molekülen blockierten TIM22-Komplex auch der Import anderer TIM22-Substrate wie Tim23 oder Tim22 selbst beeinflusst sein. Die *steady state*-Mengen dieser Proteine sind jedoch im Gegensatz zu den *Carrier*-Leveln in Abwesenheit von Oxa1 nicht reduziert (Abbildung 3.1), was darauf hindeutet, dass die TIM22-Translokase nicht blockiert ist. Darüber hinaus ist YidC über SecDFYajC mit SecYEG verbunden und kann im Komplex mit der Sec-Translokase aufgereinigt werden (Scotti *et al.*, 2000; Nouwen & Driessen, 2002). Oxa1 scheint dagegen kein Teil der TIM22-Maschinerie zu sein, denn im Gegensatz zu YidC konnte Oxa1 bei der Aufreinigung des TIM22-Komplexes nicht ko-isoliert werden (Rehling *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Argumente ist auch eine essentielle Funktion von Oxa1 für die Freisetzung der *Carrier*-Proteine aus dem TIM22-Kanal in die Lipidmembran unwahrscheinlich.

4.2.3 Die Rolle von Oxa1 bei der Dimerisierung mitochondrialer *Carrier*

Wie zuvor diskutiert, scheint Oxa1 nicht an der Membraninsertion oder der Freisetzung von *Carrier*-Proteinen aus der TIM22-Translokase beteiligt zu sein. Der beobachtete Importdefekt in Abwesenheit von Oxa1 wird daher vermutlich durch einen späteren, Oxa1-vermittelten Schritt der *Carrier*-Biogenese verursacht. Der Vergleich der $\Delta oxa1$ -Mutante mit der $\Delta crd1$ -Mutante, bei der die *Carrier*-Assemblierung durch das Fehlen von Cardiolipin beeinträchtigt ist (Jiang *et al.*, 2000), erlaubt die nähere Untersuchung der Beteiligung von Oxa1 an diesem Prozess. Die Bedeutung von Cardiolipin für die Struktur und Funktion des ADP/ATP-*Carriers* verdeutlichen frühere Befunde (Jiang *et al.*, 2000; Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; Nury *et al.*, 2005), die zeigen, dass sechs Cardiolipinmoleküle pro Aac2-Dimer gebunden werden (Beyer & Klingenberg, 1985; Hoffmann *et al.*, 1994). In Abwesenheit von Crd1 liegt das *steady state*-Aac2 ausschließlich in der zuvor beschriebenen oxidierbaren Übergangsform vor (Abbildung 3.11). Somit scheint es sich bei dieser Aac2-Form um das monomere Molekül zu handeln. Im Gegensatz hierzu ist die nicht mehr oxidierbare Form des Wildtyps vermutlich vollständig assemblierter ADP/ATP-*Carrier*. Welche Cysteine eines Aac2-Monomers in der $\Delta crd1$ -Mutante oxidiert werden, ist nicht klar. Es spricht jedoch eine Studie von Hoffmann *et al.* dafür, dass zumindest Cystein 73 an einer Disulfidbrücke

beteiligt sein könnte. Dieser Rest des Aac2-Moleküls spielt eine entscheidende Rolle für die Bindung von Cardiolipin (Hoffmann *et al.*, 1994). Er befindet sich im hydrophilen Bereich zwischen Transmembrandomäne eins und zwei auf der Matrixseite der Innenmembran. Ein weiterer Cysteinrest (271) ist im hydrophilen Bereich zwischen Transmembrandomäne fünf und sechs zu finden, wie in Abbildung 3.10 A gezeigt. Es ist somit vorstellbar, dass es diese beiden Cysteine des Monomers sind, die in der $\Delta crd1$ -Mutante durch Kupferphenanthrolin oxidiert werden. Laut

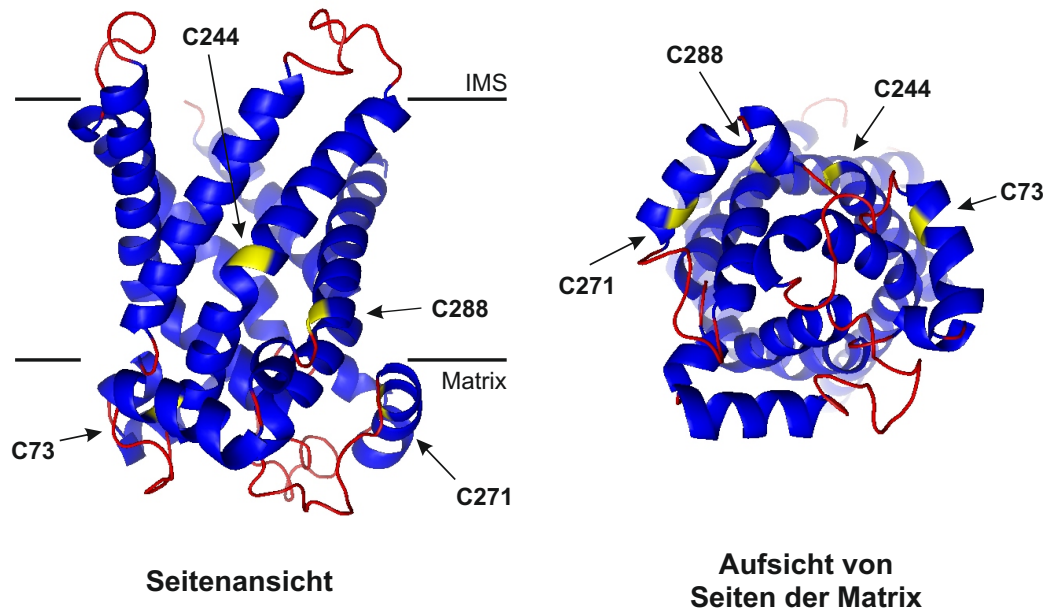


Abbildung 4.1: Modulierte Kristallstruktur eines ADP/ATP-Carrier-Monomers aus *S. cerevisiae*. Die dargestellte Struktur wurde anhand des bereits kristallisierten ADP/ATP-Carriers aus *B. taurus* berechnet. α -helicale Bereiche sind blau dargestellt, unstrukturierte Regionen rot. Die vier Cysteinreste des Carriers wurden gelb hervorgehoben und durch Pfeile gekennzeichnet. (Links) Seitenansicht des ADP/ATP-Carriers Aac2. (Rechts) Aufsicht von Seiten der Matrix.

Hoffmann *et al.* ist wenigstens Cystein 73 entscheidend für die enge Assoziation von Cardiolipin mit Aac2, wie sie im Wildtyp, nicht aber in der $\Delta crd1$ -Mutante stattfindet (Hoffmann *et al.*, 1994). Durch Cardiolipin abgeschirmt, würde Cystein 73 somit nicht mehr zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zur Verfügung stehen, sodass im Wildtyp nur frisch importiertes, nicht jedoch fertig assembliertes, Aac2 durch Kupferphenanthrolin oxidiert werden kann.

Die zuvor beschriebene Positionierung der Cysteinreste bestätigt sich auch in einer modulierten Kristallstruktur von Hefe-Aac2, die durch Vergleich mit der Kristallstruktur des ADP/ATP-Carriers aus *Bos taurus* (PDB ID: 1OKC) mittels des Programms ESyPred3D berechnet wurde (Abbildung 4.1). Die beiden Homologe teilen eine 50%ige Sequenzähnlichkeit (Lambert *et al.*, 2002; Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). In dieser Struktur sind die beiden Cysteinreste 73 und 271 in kurzen, beweglichen α -helikalen Bereichen der hydrophilen Matrixdomänen des Carriers lokalisiert. Die Cysteine 244 und 288 sind in den Transmembrandomänen 5 und 6 des Moduls 3 zu finden (Vergleich Abbildung 3.10 A). Obwohl deren Oxidation theoretisch möglich ist, sprechen die folgenden Gründe gegen die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein 244 und

288: Zum einen sind die Reste derart in benachbarten Transmembrandomänen positioniert, dass die reaktiven Thiolgruppen räumlich nahezu parallel ausgerichtet sind und somit aus sterischen Gründen eine Verknüpfung unwahrscheinlich ist. Zum anderen sind beide Cysteinreste in Modul 3 lokalisiert, werden also daher gleichzeitig in Form einer Schleife in die Membran inseriert. Somit sollten sich diese beiden Cysteine nicht nur im vollständig assemblierten *Carrier*, sondern auch zu jedem Zeitpunkt des Imports in räumlicher Nähe zueinander befinden. Man würde also erwarten, dass diese Disulfidbrücke nicht nur im oxidierbaren Assemblierungsintermediat, sondern auch im vollständig assemblierten *Carrier* ausgebildet werden kann. Da die oxidierbare Form bei frisch in Mitochondrien importiertem Aac2 jedoch im Laufe der Assemblierung verschwindet (Abbildung 3.13), ist es wahrscheinlicher, dass es die Cysteine 73 und 271 sind, die auf Grund der Flexibilität der Matrixdomänen zu einem Zeitpunkt während der Biogenese oxidiert werden. Die Positionierung der Cysteine in der hier berechneten Kristallstruktur von Aac2 muss jedoch nicht zwangsläufig der *in vivo*-Situation entsprechen. Darüber hinaus sind *Carrier* dynamische Proteinkomplexe, die während des Metabolittransports ihre Konformation ändern, während die hier gezeigte Kristallstruktur lediglich eine mögliche Konformation widerspiegelt. Die Ausbildung alternativer Disulfidbrücken kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Ausgehend von Modell eines oxidierbaren Assemblierungsintermediats und der Oxidierbarkeit von frisch importiertem Aac2 (Abbildung 3.13), würde man sowohl in Abwesenheit von Oxa1 als auch in der $\Delta crd1$ -Mutante Defekte in der Dimerisierung von Aac2 postulieren. Bei der Betrachtung des *steady state*-Verhaltens von Aac2 in beiden Mutanten werden jedoch Unterschiede deutlich. Während in $\Delta crd1$ -Zellen hierbei ebenfalls ausschließlich die oxidierbare Form detektiert wurde, akkumulierte in der $\Delta oxa1$ -Mutante der *Carrier* in seiner nicht oxidierbaren Form (Abbildung 3.11). Oxa1 scheint somit keine essentielle Funktion bei der Dimerisierung von Aac2 zu übernehmen.

4.2.4 Die Rolle von Oxa1 als Chaperon für mitochondriale *Carrier*

Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, ist Aac2 in der $\Delta crd1$ -Mutante nicht oder nur fehlerhaft assembliert. Interessanterweise ist die Stabilität des *Carriers* in diesem Stamm jedoch nicht betroffen, denn die *steady state*-Level von Aac2 sind vergleichbar mit denen im Wildtyp. Im Gegensatz hierzu sind die Mengen an Aac2 in Abwesenheit von Oxa1 stark reduziert. Diese geringen Mengen des *Carriers* scheinen allerdings erfolgreich assembliert vorzuliegen (Abbildung 3.11). Dieses scheinbar kontroverse Verhalten der $\Delta oxa1$ - und $\Delta crd1$ -Mutante lässt sich am besten unter der Annahme erklären, dass Oxa1 nicht für die Dimerisierung der *Carrier per se* eine Rolle spielt, sondern vielmehr als Chaperon agiert, indem es die *Carrier* bindet, in der Membran stabilisiert und in einem assemblierungskompetenten Zustand hält. In der $\Delta crd1$ -Mutante kann der *Carrier* nach diesem Modell zwar in die Mitochondrien importiert, jedoch nicht assembliert werden. Da Oxa1 in dieser Mutante vorhanden ist, wird Aac2 vermutlich von Oxa1 gebunden und liegt stabil in einem assemblierungskompetenten Zustand vor. Anders ist die Situation in der $\Delta oxa1$ -

Mutante. Hier kann der *Carrier* ebenfalls in Mitochondrien importiert und in die Innenmembran inseriert werden. Im Gegensatz zur $\Delta crd1$ -Mutante fehlt allerdings Oxa1. Hierdurch können die *Carrier*-Proteine nicht stabilisiert werden und ein Großteil der frisch importierten *Carrier* wird schnell wieder abgebaut. Eine Rolle von Oxa1 als Chaperon wurde bereits für das mitochondrial kodierte Protein Atp9 beschrieben (Jia *et al.*, 2007). Dieses kann nur in Anwesenheit von Oxa1 erfolgreich oligomerisieren und mit Atp6 assemblieren. Darüber hinaus bilden Oxa1 und Atp9 einen stabilen Komplex. Eine solche direkte Interaktion konnte zwar bisher zwischen Oxa1 und Aac2 nicht nachgewiesen werden, jedoch war die Quervernetzung minimaler Mengen von Oxa1 mit Aac2 aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* erfolgreich (die Daten wurden auf Grund der extrem ineffizienten Quervernetzung nicht gezeigt). Die Idee, dass Oxa1 nicht nur an der Membraninsertion, sondern auch an der Assemblierung verschiedener Proteine beteiligt sein könnte, wird erneut auch durch Studien des bakteriellen Oxa1-Homologs YidC unterstützt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass YidC an der Biogenese der bakteriellen Proteine LacY und MalF beteiligt ist (Nagamori *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2008; Wang & Dalbey, 2011) und entscheidend zur Assemblierung des Maltose-Transporterkomplexes beiträgt (Wagner *et al.*, 2008). Darüber hinaus haben voneinander unabhängige Arbeiten gezeigt, dass YidC mit den Transmembrandomänen einer Reihe verschiedener, frisch membraninsertierter Proteine quervernetzt werden kann. Dies deutet auf eine direkte Interaktion und damit auf eine mögliche YidC-vermittelte Stabilisierung dieser Proteine hin (Beck *et al.*, 2001; van der Laan *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008). Für eine zentrale Rolle des Oxa1-Homologs YidC als Chaperon spricht ebenfalls, dass YidC in vielen Fällen nicht zwingend notwendig für die eigentliche Membraninsertion der zuvor beschriebenen Proteine ist (Samuelson *et al.*, 2000; van der Laan *et al.*, 2003, 2004b). Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen Oxa1 und YidC und der strukturellen Ähnlichkeit vor allem im Bereich der Transmembranregionen wäre es daher denkbar, dass Oxa1 neben seiner Insertaseaktivität eine weitere Funktion als Chaperon übernimmt. Auf eine Rolle von Oxa1 bei der Stabilisierung verschiedener Membranproteine deuten ebenfalls auch Daten von Lemaire *et al.* hin, die zeigen, dass verschiedene Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase in Abwesenheit von Oxa1 zwar membraninsertiert, jedoch instabil sind und durch die AAA-Protease Yme1 abgebaut werden (Lemaire *et al.*, 2000). Durch die gleichzeitige Deletion von Oxa1 und Yme1 akkumulieren die ATPase-Untereinheiten wie im Wildtyp und die ATPase-Aktivität kann wieder hergestellt werden. Demnach scheint Oxa1 die membranständigen Untereinheiten der ATPase nach ihrer Insertion zu binden, wie dies für Atp9 gezeigt wurde (Jia *et al.*, 2007), und so vor Degradation zu schützen.

Im Licht der beschriebenen Literatur deuten die in dieser Arbeit gesammelten Daten darauf hin, dass Oxa1 die Funktion eines Chaperons während der *Carrier*-Biogenese übernimmt.

4.2.5 Die Rolle von Oxa1 bei der *Carrier*-Biogenese – ein Modell

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, scheint Oxa1 keine Rolle beim *Carrier*-Import, der Freisetzung der *Carrier* aus der TIM22-Translokase und der *Carrier*-Dimerisierung

zu spielen. Vielmehr deuten die vorgestellten Daten auf eine Chaperonfunktion von Oxa1 während der *Carrier*-Biogenese hin. Das folgende Modell bringt daher sowohl den beobachteten Effekt von Oxa1 auf die Assemblierung als auch auf den Import der mitochondrialen *Carrier* in Einklang: Die *Carrier* werden demnach zunächst durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum im-

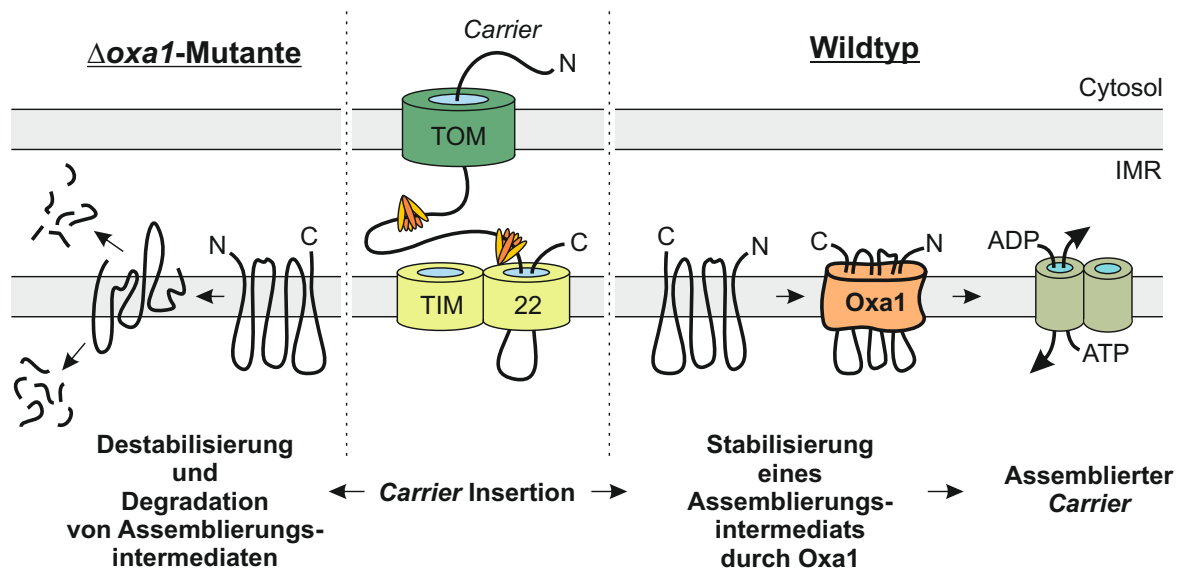


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung eines möglichen Oxa1-abhängigen Schrittes während der *Carrier*-Biogenese. Das durch den TOM- und TIM22-Komplex importierte *Carrier*-Protein kann unter normalen Umständen (rechts, Wildtyp) an Oxa1 binden, wird stabilisiert und erfolgreich assembliert. In Abwesenheit von Oxa1 (links, $\Delta oxa1$ -Mutante) ist ein membraninseriertes Assemblierungsintermediat des *Carriers* nicht stabil und wird abgebaut. IMR = Intermembranraum.

portiert und anschließend in einem membranpotentialabhängigen Schritt in die Innenmembran inseriert. Nach Verlassen der TIM22-Translokationspore werden die *Carrier* durch Oxa1 stabilisiert, in einem assemblierungskompetenten Zustand gehalten und können schließlich dimerisieren (Abbildung 4.2). In Abwesenheit von Oxa1 können die frisch membraninserterten *Carrier*-Moleküle nicht hinreichend stabilisiert werden, der Großteil der nicht assemblierten *Carrier* wird durch Proteasen des Intermembranraum oder der Matrix abgebaut und nur ein kleiner Teil kann erfolgreich assemblieren. Somit kann auch in einer $\Delta oxa1$ -Mutante Aac2 noch detektiert werden und eine basale ADP-Aufnahme ist messbar.

4.3 Einblicke in die Oxa1-vermittelte Proteininsertion

Der molekulare Mechanismus, durch den Proteine Oxa1-vermittelt in die mitochondriale Innenmembran inseriert werden, konnte bisher nicht entschlüsselt werden. Um Einblicke in diesen Prozess zu erhalten, wurde *S. cerevisiae* Oxa1 rekombinant aus Bakterien aufgereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert. Der größere Teil des in Bakterien synthetisierten Oxa1 bildet einen homooligomeren Komplex von etwa 200 kDa (Abbildung 3.17). Da Oxa1 durch das milde Detergenz

DDM aus der Membran gelöst wurde und die Menge assoziierter Detergenzmizellen nicht bekannt ist (Møller & le Maire, 1993), kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei dem hier aufgereinigten Komplex um ein Dimer oder einen höheroligomeren Komplex wie ein Tetramer handelt. Frühere Untersuchungen mit rekombinant gereinigtem Oxa1 aus *N. crassa*, das ebenfalls in einem Komplex von etwa 200 kDa vorliegt, sowie endogenem Oxa1 aus Hefe-Mitochondrien, das in einem Komplex aus 250-300 kDa vorliegt, deuten allerdings auf einen tetrameren Komplex hin (Preuss *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Szyrach *et al.*, 2003).

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Richard Wagner in Osnabrück wurde das rekombinant exprimierte Oxa1 in *black lipid membranes* inseriert und anschließend elektrophysiologisch vermessen. Die von Michael Meinecke und Vivien Krüger durchgeführten Messungen deuteten darauf hin, dass Oxa1 eine Pore in der Membran bildet. Daten, wie ein solcher Oxa1-Kanal organisiert sein könnte, fehlen jedoch bisher. Die Ergebnisse, dass Oxa1 einen oligomeren Komplex ausbildet, erlauben Spekulationen über die molekulare Organisation des OXA1-Komplexes. So wäre es möglich, dass je zwei Oxa1-Moleküle eine Translokationspore bilden, wie dies für die SecY-Untereinheit des SecYEG-Komplexes oder für Sec61 α des Sec61-Komplexes des Endoplasmatischen Retikulums gezeigt wurde. Im Beispiel des SecYEG-Komplexes sind die zehn Transmembrandomänen von SecY um eine zentrale Pore angeordnet, durch die ein ungefaltetes Protein über die Membran transloziert oder in diese inseriert werden kann (Breyton *et al.*, 2002; du Plessis *et al.*, 2011). In einem aus zwei Untereinheiten bestehenden OXA1-Komplex könnte man sich eine ähnliche Organisation vorstellen. Die insgesamt zehn Transmembrandomänen zweier Oxa1-Moleküle wären dabei um eine zentrale Pore angeordnet. Dieses Modell wird durch kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützt, die die Bindung von Oxa1-Dimeren im Bereich des Tunnelausgangs bakterieller Ribosomen zeigen (Köhler *et al.*, 2009). Eine solche dimere Organisation des OXA1-Komplexes steht allerdings im Gegensatz zu der tetrameren Organisation von endogenem Oxa1 (Preuss *et al.*, 2001; Szyrach *et al.*, 2003). Diese Diskrepanz ließe sich unter anderem damit erklären, dass der native, endogene OXA1-Komplex aus zwei miteinander verbundenen Oxa1-Translokationsporen bestehen könnte. Eine solche Zusammenlagerung zweier unabhängiger Translokationskanäle wurde bereits früher unter anderem für den TIM22-Kanal berichtet (Rehling *et al.*, 2003). Ungeachtet dessen sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass in der kryoelektronenmikroskopischen Studie von Köhler *et al.* bakterielle Ribosomen verwendet wurden. Diese unterscheiden sich strukturell stark von mitochondrialen Ribosomen, besonders in der Region um den Polypeptid-Tunnelausgang, wo auch Oxa1 bindet (Sharma *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2009). Somit ist es möglich, dass die in dieser Studie berichtete dimere Organisation nicht die *in vivo*-Situation in Mitochondrien widerspiegelt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine eindeutigen Schlüsse zur molekularen Organisation des OXA1-Komplexes erlangt werden, es wurde jedoch eine Kooperation mit der Gruppe von Irmgard Sinning in Heidelberg initiiert, um die Kristallstruktur von Oxa1 zu lösen. Es bleibt deshalb zukünftigen Forschungsarbeiten vorbehalten, Licht ins Dunkel der intensiven Debatte über eine dimere oder höheroligomere Struktur des OXA1-Komplexes zu bringen.

In einem nächsten Schritt wurde Oxa1 erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert (Abbildung 3.18) und ein ko-translationaler, auf Kaninchen-Retikulozytenlysate basierender Insertionsassay etabliert. Erste Versuche zeigten eine Oxa1-abhängige Insertion der mitochondrial kodierten ATPase-Untereinheit Atp8. Diese vorläufigen Daten stehen jedoch im Kontrast zu einer früheren Studie, in der die Oxa1-unabhängige, spontane Membraninsertion von Atp8 gezeigt wurde (Ii & Mihara, 2001). Da diese Studie mit invertierten mitochondrialen Innenmembranvesikeln durchgeführt wurde, ist nicht klar, ob dieser Befund die *in vivo*-Situation widerspiegelt oder die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten vorläufigen Daten. Das hier etablierte rekonstituierte System stellt deshalb zukünftig eine elegante Möglichkeit dar, diese Frage zu beantworten und die Mechanismen der Oxa1-vermittelten Proteininsertion und -faltung im Detail zu klären.

5 Zusammenfassung

Oxa1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Innenmembran und eine zentrale Komponente der Proteininsertionsmaschinerie in Mitochondrien. Oxa1 ist an der Insertion zweier unterschiedlicher Klassen von Proteinen in die Innenmembran beteiligt: Durch eine C-terminale, matrixständige Domäne interagiert Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen und vermittelt so die ko-translationale Membraninsertion mitochondrial kodierter Proteine. Darüber hinaus wurde auch eine Beteiligung von Oxa1 an der Insertion einiger kernkodierter Proteine beschrieben. Bei allen bisher identifizierten kernkodierten Substraten von Oxa1 handelt es sich um sogenannte konservativ sortierte Proteine, die nach ihrer Synthese im Zytosol zunächst klassisch über die Translokasen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran in die mitochondriale Matrix importiert werden. In einem Oxa1-vermittelten Schritt werden sie schließlich von der Matrix aus in die Innenmembran inseriert. Vergleiche mit dem bakteriellen Oxa1-Homolog YidC lassen weiterhin vermuten, dass Oxa1 auch an der Faltung von Membranproteinen beteiligt sein könnte, bisher ist eine solche Oxa1-Funktion jedoch nur in Einzelfällen beschrieben worden.

Der genaue molekulare Mechanismus der Proteininsertion durch Oxa1 sowie eine eventuelle Beteiligung von Oxa1 an der Insertion anderer mitochondrialer Innenmembranproteine ist bisher unklar. Es war daher überraschend festzustellen, dass die Level des ADP/ATP-Carriers in Abwesenheit von Oxa1 stark reduziert waren. Der Import und die Membraninsertion mitochondrialer Carrier wurden in den vergangenen Jahren im Detail beschrieben, bisherige Studien deuteten jedoch nie auf eine Beteiligung von Oxa1 bei der Carrier-Biogenese hin. Carrier-Proteine werden, im Gegensatz zu konservativ sortierten Proteinen, aus dem Intermembranraum in die Innenmembran inseriert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Importversuche gezeigt werden, dass Oxa1 eine wichtige, wenn auch nicht essentielle Funktion bei der Biogenese verschiedener Vertreter der mitochondrialen Carrier-Familie einnimmt. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass Oxa1 nicht an der Membraninsertion der Carrier-Proteine *per se* beteiligt ist, sondern ähnlich einem Chaperon die TIM22-abhängig inserierten Carrier stabilisiert und ihre Faltung oder Assemblierung in der Membran begünstigt. Diese Arbeit zeigt somit, dass Oxa1 nicht nur an der Membraninsertion verschiedener mitochondrial und kernkodierter Proteine beteiligt ist, sondern eine weitere wichtige Funktion als Chaperon einnimmt. Bedeutend ist hierbei vor allem, dass diese Rolle bei der Stabilisierung und Faltung mitochondrialer Innenmembranproteine sich nicht auf klassische Oxa1-Substrate beschränkt, die von Seiten der Matrix in die Membran inseriert werden, sondern entscheidend die Biogenese von Proteinen beeinflusst, deren eigentliche Membraninsertion Oxa1-unabhängig verläuft.

Die Bedeutung von Oxa1 bei der Insertion mitochondrial kodierter Proteine ist gut dokumentiert, genaue mechanistische Details des Prozesses der Membraninsertion durch Oxa1 fehlen jedoch bisher. Um den molekularen Mechanismus der Oxa1-vermittelten Proteininsertion besser zu verstehen, wurde die native Aufreinigung von rekombinant exprimiertem *S. cerevisiae* Oxa1 etabliert

und gezeigt, dass dieses einen dimeren oder höher oligomeren Komplex ausbildet. Oxa1 wurde weiterhin erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert und stimuliert *in vitro* die Insertion des mitochondrial kodierten Proteins Atp8. In dieser Arbeit wurden vorläufige Daten über die Oxa1-vermittelte Proteininsertion gesammelt. Das hier etablierte Rekonstitutionssystem wird eine wichtige Basis für zukünftige Arbeiten bilden, die zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Oxa1-abhängigen Proteininsertion beitragen werden.

Literatur

- Abramoff, M., Magelhaes, P., & Ram, S. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7), 36–42.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W., & Brunner, M. (1999). Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* 18(2), 313–9.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., & Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* 153(6), 1151–60.
- Albanèse, V., Yam, A. Y.-W., Baughman, J., Parnot, C., & Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124(1), 75–88.
- Alconada, A., Kübrich, M., Moczko, M., Hönlinger, A., & Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol. Cell. Biol.* 15(11), 6196–205.
- Alder, N. N., Jensen, R. E., & Johnson, A. E. (2008). Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface. *Cell* 134(3), 439–50.
- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., & Dujardin, G. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome *c* oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.* 382(1-2), 111–5.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396(6707), 133–40.
- Backert, S., Von Nickisch-Rosenegk, E., & Meyer, T. F. (1998). Potential role of two *Helicobacter pylori* relaxases in DNA transfer. *Mol. Microbiol.* 30(3), 673–4.
- Barrientos, A., Zambrano, A., & Tzagoloff, A. (2004). Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23(17), 3472–82.
- Bartlett, K. & Eaton, S. (2004). Mitochondrial β -oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271(3), 462–9.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G., & Pratje, E. (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 245(3), 272–8.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., & Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 87(1), 33–41.

- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J., & Müller, M. (2001). YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* 2(8), 709–14.
- Benz, R. (1989). Porins from mitochondrial and bacterial outer membranes: structural and functional aspects. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 200–214.
- Beyer, K. & Klingenberg, M. (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 24(15), 3821–6.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6), 1513–23.
- Bohnert, M., Rehling, P., Guiard, B., Herrmann, J. M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr. Biol.* 20(13), 1227–32.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P. P., & Dujardin, G. (1994). *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* 239(2), 201–12.
- Borst, P. & Grivell, L. A. (1978). The mitochondrial genome of yeast. *Cell* 15(3), 705–23.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14(2), 115–32.
- Brandner, K., Rehling, P., & Truscott, K. N. (2005). The carboxyl-terminal third of the dicarboxylate carrier is crucial for productive association with the inner membrane twin-pore translocase. *J. Biol. Chem.* 280(7), 6215–21.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kühlbrandt, W., & Collinson, I. (2002). Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418(6898), 662–5.
- Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., & Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* 274(23), 16522–30.
- Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J. L., & Jacq, C. (1995). Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* 228(3), 762–71.

- Claypool, S. M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J. A., & Koehler, C. M. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *182*(5), 937–50.
- Crivellone, M. D., Wu, M. A., & Tzagoloff, A. (1988). Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome *c* reductase complex. *J. Biol. Chem.* *263*(28), 14323–33.
- Cyr, D. M., Stuart, R. A., & Neupert, W. (1993). A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *268*(32), 23751–4.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*(2), 205–19.
- Dembowski, M., Kunkele, K. P., Nargang, F. E., Neupert, W., & Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* *276*(21), 17679–85.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M., & Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* *388*(6638), 195–200.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., & Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* *313*(5785), 314–8.
- Donzeau, M., Káldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M. F., Neupert, W., & Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* *101*(4), 401–12.
- du Plessis, D. J. F., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2011). The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*(3), 851–65.
- Dukanovic, J. & Rapaport, D. (2011). Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*(3), 971–80.
- Embley, T. M. & Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* *440*(7084), 623–30.
- Emtage, J. L. & Jensen, R. E. (1993). *MAS6* encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J. Cell Biol.* *122*(5), 1003–12.
- Endres, M., Neupert, W., & Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* *18*(12), 3214–21.
- Ernster, L. & Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* *91*(3 Pt 2), 227s–255s.

- Fiumera, H. L., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2007). Translocation of mitochondrially synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space. *Mol. Cell. Biol.* *27*(13), 4664–73.
- Funes, S., Nargang, F. E., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2004). The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* *15*(4), 1853–61.
- Gakh, O., Cavadini, P., & Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*(1), 63–77.
- Gasser, S. M., Daum, G., & Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* *257*(21), 13034–41.
- Gavel, Y. & von Heijne, G. (1992). The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclear and mitochondrially encoded proteins. *Eur. J. Biochem.* *205*(3), 1207–15.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N., & Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* *111*(4), 507–18.
- Geissler, A., Rassow, J., Pfanner, N., & Voos, W. (2001). Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix Hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol. Cell. Biol.* *21*(20), 7097–104.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* *350*, 87–96.
- Glaser, S. M., Miller, B. R., & Cumsky, M. G. (1990). Removal of a hydrophobic domain within the mature portion of a mitochondrial inner membrane protein causes its mislocalization to the matrix. *Mol. Cell. Biol.* *10*(5), 1873–81.
- Glaser, S. M., Trueblood, C. E., Dircks, L. K., Poyton, R. O., & Cumsky, M. G. (1988). Functional analysis of mitochondrial protein import in yeast. *J. Cell. Biochem.* *36*(3), 275–87.
- Goyon, V., Fronzes, R., Salin, B., di Rago, J.-P., Velours, J., & Brèthes, D. (2008). Yeast cells depleted in Atp14p fail to assemble Atp6p within the ATP synthase and exhibit altered mitochondrial cristae morphology. *J. Biol. Chem.* *283*(15), 9749–58.
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* *283*(5407), 1476–81.
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* *2*(6), REVIEWS1018.

- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381(6583), 571–9.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295(5561), 1852–8.
- Hartl, F. U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H., & Neupert, W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *Cell* 47(6), 939–51.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015–69.
- He, S. & Fox, T. D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* 8(8), 1449–60.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCox2 from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* 418(3), 367–70.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5), 2250–5.
- Hell, K., Neupert, W., & Stuart, R. A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20(6), 1281–8.
- Herrmann, J. M. (2003). Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* 11(2), 74–9.
- Herrmann, J. M. & Bonnefoy, N. (2004). Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J. Biol. Chem.* 279(4), 2507–12.
- Herrmann, J. M., Koll, H., Cook, R. A., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1995). Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 270(45), 27079–86.
- Herrmann, J. M., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* 16(9), 2217–26.
- Higy, M., Junne, T., & Spiess, M. (2004). Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 43(40), 12716–22.
- Hildenbeutel, M., Habib, S. J., Herrmann, J. M., & Rapaport, D. (2008). New insights into the mechanism of precursor protein insertion into the mitochondrial membranes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 268, 147–90.

- Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., & Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395(6701), 516–21.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brüttsch, H., & Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J* 9(10), 3191–200.
- Hoffmann, B., Stöckl, A., Schlame, M., Beyer, K., & Klingenberg, M. (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J. Biol. Chem.* 269(3), 1940–4.
- Horwich, A. L., Kalousek, F., Mellman, I., & Rosenberg, L. E. (1985). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J.* 4(5), 1129–35.
- Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B., & Schatz, G. (1984). The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* 178(2), 306–10.
- Ii, M. & Mihara, K. (2001). Insertion of mitochondrial DNA-encoded F_1F_0 -ATPase subunit 8 across the mitochondrial inner membrane *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 276(27), 24704–12.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., & Stuart, R. A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* 22(24), 6438–47.
- Jia, L., Dienhart, M. K., & Stuart, R. A. (2007). Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase complex. *Mol. Biol. Cell* 18(5), 1897–908.
- Jia, L., Kaur, J., & Stuart, R. A. (2009). Mapping of the *Saccharomyces cerevisiae* Oxa1-mitochondrial ribosome interface and identification of MrpL40, a ribosomal protein in close proximity to Oxa1 and critical for oxidative phosphorylation complex assembly. *Eukaryot. Cell* 8(11), 1792–802.
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., de Gier, J.-W., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2003). Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *J Biol Chem* 278(49), 48965–72.
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., & Greenberg, M. L. (2000). Absence of cardiolipin in the *CRD1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 275(29), 22387–94.
- Káldi, K., Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., & Brunner, M. (1998). Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *EMBO J.* 17(6), 1569–76.

- Kanamori, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Shin, I., Schultz, P. G., & Endo, T. (1999). Uncoupling of transfer of the presequence and unfolding of the mature domain in precursor translocation across the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*(7), 3634–9.
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., & Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* *348*(6297), 137–43.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., & Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *139*(7), 1663–75.
- Kerscher, O., Sepuri, N. B., & Jensen, R. E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* *11*(1), 103–16.
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J., & Schatz, G. (1998a). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* *279*(5349), 369–73.
- Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., & Tokatlidis, K. (1998b). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* *17*(22), 6477–86.
- Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., & Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* *20*(4), 1187–93.
- Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., & Ban, N. (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol. Cell* *34*(3), 344–53.
- Kovermann, P., Truscott, K. N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N. B., Müller, H., Jensen, R. E., Wagner, R., & Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol. Cell* *9*(2), 363–73.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M. T., Meisinger, C., Kassenbrock, C. K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M. G., Neupert, W., Nargang, F. E., & Pfanner, N. (2001). Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J. Cell Biol.* *152*(2), 289–300.
- Künkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., & Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* *93*(6), 1009–19.

- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N., & Ryan, M. T. (1999). Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol. Biol. Cell* 10(7), 2461–74.
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16(9), 857–60.
- Kutik, S., Stroud, D. A., Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2009). Evolution of mitochondrial protein biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1790(6), 409–15.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680–5.
- Lambert, C., Léonard, N., De Bolle, X., & Depiereux, E. (2002). ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18(9), 1250–6.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J., & Dujardin, G. (2000). Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores Fo-ATPase subunit accumulation in an *oxal* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275(31), 23471–5.
- Leuenberger, D., Bally, N. A., Schatz, G., & Koehler, C. M. (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J.* 18(17), 4816–22.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460(7257), 831–8.
- Lim, J. H., Martin, F., Guiard, B., Pfanner, N., & Voos, W. (2001). The mitochondrial Hsp70-dependent import system actively unfolds preproteins and shortens the lag phase of translocation. *EMBO J.* 20(5), 941–50.
- Lohret, T. A., Jensen, R. E., & Kinnally, K. W. (1997). Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J. Cell Biol.* 137(2), 377–86.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P., & Tokatlidis, K. (2004). Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated *in vivo*. *J Biol Chem* 279(18), 18952–8.
- Maarse, A. C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N., & Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS Lett.* 349(2), 215–21.
- Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., & Terada, H. (1995). Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-*o*-phenanthroline. *J. Biol. Chem.* 270(49), 29548–54.

- Manning-Krieg, U. C., Scherer, P. E., & Schatz, G. (1991). Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* *10*(11), 3273–80.
- Marom, M., Azem, A., & Mokranjac, D. (2011). Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: still a long way to go. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*(3), 990–1001.
- Martinez-Caballero, S., Grigoriev, S. M., Herrmann, J. M., Campo, M. L., & Kinnally, K. W. (2007). Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23. *J. Biol. Chem.* *282*(6), 3584–93.
- Mayer, A., Nargang, F. E., Neupert, W., & Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J.* *14*(17), 4204–11.
- Meier, S., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2005). Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J. Cell Biol.* *170*(6), 881–8.
- Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H. E., Warscheid, B., & Rehling, P. (2007). Shy1 couples *COX1* translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* *26*(20), 4347–58.
- Moczko, M., Bömer, U., Kübrich, M., Zufall, N., Hönlinger, A., & Pfanner, N. (1997). The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a *trans* binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. *Mol. Cell. Biol.* *17*(11), 6574–84.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kühlbrandt, W., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* *316*(3), 657–66.
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W., & Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* *22*(4), 816–25.
- Møller, J. V. & le Maire, M. (1993). Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* *268*(25), 18659–72.
- Nagamori, S., Smirnova, I. N., & Kaback, H. R. (2004). Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* *165*(1), 53–62.
- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2002). The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* *277*(15), 12846–53.
- Nelson, D. R., Felix, C. M., & Swanson, J. M. (1998). Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* *277*(2), 285–308.

- Neupert, W. & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–49.
- Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. (2002). SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* 44(5), 1397–405.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G., & Pebay-Peyroula, E. (2005). Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett.* 579(27), 6031–6.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S. A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W., & Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.* 21(14), 3659–71.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(7), 552–65.
- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., & Herrmann, J. M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J.* 25(8), 1603–10.
- Palmieri, F. (1994). Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* 346(1), 48–54.
- Palmieri, L., Lasorsa, F. M., Voza, A., Agrimi, G., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Walker, J. E., & Palmieri, F. (2000). Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1459(2-3), 363–9.
- Palmisano, A., Zara, V., Hönliger, A., Voza, A., Dekker, P. J., Pfanner, N., & Palmieri, F. (1998). Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 151–8.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., & Brandolin, G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractylolide. *Nature* 426(6962), 39–44.
- Pelham, H. R. & Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67(1), 247–56.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22(21), 5951–61.
- Pfanner, N. (2000). Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol* 10(11), R412–5.
- Pierrel, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cricco, J. A., & Winge, D. R. (2007). Coal links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* 26(20), 4335–46.

- Popot, J. L. & de Vitry, C. (1990). On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* *19*, 369–403.
- Poyton, R. O., Bellus, G., McKee, E. E., Sevarino, K. A., & Goehring, B. (1996). *In organello* mitochondrial protein and RNA synthesis systems from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* *264*, 36–42.
- Pozzan, T. & Rizzuto, R. (2000). The renaissance of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* *267*(17), 5269–73.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R. A., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2001). Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *153*(5), 1085–96.
- Price, C. E. & Driessen, A. J. M. (2010). Conserved negative charges in the transmembrane segments of subunit K of the NADH:ubiquinone oxidoreductase determine its dependence on YidC for membrane insertion. *J. Biol. Chem.* *285*(6), 3575–81.
- Rapaport, D., Neupert, W., & Lill, R. (1997). Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *J. Biol. Chem.* *272*(30), 18725–31.
- Rassow, J. & Pfanner, N. (1991). Mitochondrial preproteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space. *FEBS Lett.* *293*(1-2), 85–8.
- Reers, M., Smiley, S. T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., & Chen, L. B. (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* *260*, 406–17.
- Reers, M., Smith, T. W., & Chen, L. B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* *30*(18), 4480–6.
- Rehling, P., Brandner, K., & Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*(7), 519–30.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K. N., & Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* *299*(5613), 1747–51.
- Rojo, E. E., Guiard, B., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1999). N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic "positive-inside" rule of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* *274*(28), 19617–22.
- Rojo, E. E., Stuart, R. A., & Neupert, W. (1995). Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires Δ pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J.* *14*(14), 3445–51.

- Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* *101*, 202–11.
- Ryan, K. R., Leung, R. S., & Jensen, R. E. (1998). Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol. Cell. Biol.* *18*(1), 178–87.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., & Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* *26*(22), 4777–87.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., & Dalbey, R. E. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* *406*(6796), 637–41.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* *19*(8), 1777–83.
- Scherer, P. E., Krieg, U. C., Hwang, S. T., Vestweber, D., & Schatz, G. (1990). A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein. *EMBO J.* *9*(13), 4315–22.
- Schlame, M. & Greenberg, M. L. (1997). Cardiolipin synthase from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* *1348*(1-2), 201–6.
- Schleiff, E., Silvius, J. R., & Shore, G. C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell Biol.* *145*(5), 973–8.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogl, B., Go, N. E., Nargang, F. E., Neupert, W., & Nussberger, S. (2005). Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *280*(15), 14499–506.
- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., & Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* *371*(6500), 768–74.
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B., & Luirink, J. (2000). YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* *19*(4), 542–9.
- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., & Kuhn, A. (2004). *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* *23*(2), 294–301.
- Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* *115*(1), 97–108.

- Sherman, E. L., Go, N. E., & Nargang, F. E. (2005). Functions of the small proteins in the TOM complex of *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 16(9), 4172–82.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(23), 13207–12.
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., & Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384(6609), 582–5.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W., & Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391(6670), 912–5.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N., & Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* 62(1), 107–15.
- Stiburek, L., Fornuskova, D., Wenchich, L., Pejznochova, M., Hansikova, H., & Zeman, J. (2007). Knockdown of human Oxa11 impairs the biogenesis of F₁F₀-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Mol. Biol.* 374(2), 506–16.
- Sundberg, E., Slagter, J. G., Fridborg, I., Cleary, S. P., Robinson, C., & Coupland, G. (1997). *ALBIN3*, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9(5), 717–30.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22(24), 6448–57.
- Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., & Deisenhofer, J. (2001). Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* 9(7), 615–25.
- Tjaden, J., Schwöppe, C., Möhlmann, T., Quick, P. W., & Neuhaus, H. E. (1998). Expression of a plastidic ATP/ADP transporter gene in *Escherichia coli* leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 273(16), 9630–6.
- Truscott, K. N., Wiedemann, N., Rehling, P., Müller, H., Meisinger, C., Pfanner, N., & Guiard, B. (2002). Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol. Cell. Biol.* 22(22), 7780–9.

- Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W., & Cyr, D. M. (1996). The $\Delta\psi$ - and Hsp70/MIM44-dependent reaction cycle driving early steps of protein import into mitochondria. *EMBO J.* *15*(4), 735–44.
- Ungermann, C., Neupert, W., & Cyr, D. M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* *266*(5188), 1250–3.
- Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J. W., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B., & Luirink, J. (2001). Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep.* *2*(6), 524–9.
- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*(12), a004390.
- van der Does, C., de Keyzer, J., van der Laan, M., & Driessen, A. J. (2003). Reconstitution of purified bacterial preprotein translocase in liposomes. *Methods Enzymol.* *372*, 86–98.
- van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2004a). F_1F_0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* *165*(2), 213–22.
- van der Laan, M., Houben, E. N., Nouwen, N., Luirink, J., & Driessen, A. J. (2001). Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep.* *2*(6), 519–23.
- van der Laan, M., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2004b). SecYEG proteoliposomes catalyze the $\Delta\phi$ -dependent membrane insertion of FtsQ. *J. Biol. Chem.* *279*(3), 1659–64.
- van der Laan, M., Urbanus, M. L., Ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. M., & Luirink, J. (2003). A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*(10), 5801–6.
- van Loon, A. P. & Schatz, G. (1987). Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome *c*₁ presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* *6*(8), 2441–8.
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*(2), 112–24.
- Vergnolle, M. A. S., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L.-Y., & Tokatlidis, K. (2005a). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *J. Mol. Biol.* *351*(4), 839–49.
- Vergnolle, M. A. S., Sawney, H., Junne, T., Dolfini, L., & Tokatlidis, K. (2005b). A cryptic matrix targeting signal of the yeast ADP/ATP carrier normally inserted by the TIM22 complex is recognized by the TIM23 machinery. *Biochem. J.* *385*(Pt 1), 173–80.

- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *175*(2), 237–47.
- Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* *139*(2), 428–39.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* *341*(6241), 456–8.
- Wagner, S., Pop, O. I., Haan, G.-J., Baars, L., Koningstein, G., Klepsch, M. M., Genevaux, P., Luirink, J., & de Gier, J.-W. (2008). Biogenesis of MalF and the MalFGK₂ maltose transport complex in *Escherichia coli* requires YidC. *J. Biol. Chem.* *283*(26), 17881–90.
- Walker, J. E. & Runswick, M. J. (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J. Bioenerg. Biomembr.* *25*(5), 435–46.
- Wang, P. & Dalbey, R. E. (2011). Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*(3), 866–75.
- Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T., & Gulbis, J. M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell* *21*(1), 123–33.
- White, S. H. & von Heijne, G. (2004). The machinery of membrane protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*(4), 397–404.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* *424*(6948), 565–71.
- Wiedemann, N., Pfanner, N., & Ryan, M. T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* *20*(5), 951–60.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Ichi Nishikawa, S., & Endo, T. (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* *111*(4), 519–28.
- Yamano, K., Yatsukawa, Y.-I., Esaki, M., Hobbs, A. E. A., Jensen, R. E., & Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* *283*(7), 3799–807.
- Yen, M. R., Harley, K. T., Tseng, Y. H., & Saier, M. H. (2001). Phylogenetic and structural analyses of the oxa1 family of protein translocases. *FEMS Microbiol. Lett.* *204*(2), 223–31.

- Yi, L., Celebi, N., Chen, M., & Dalbey, R. E. (2004). Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunits a, b, and c of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 279(38), 39260–7.
- Yi, L., Jiang, F., Chen, M., Cain, B., Bolhuis, A., & Dalbey, R. E. (2003). YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F₁F₀ ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry* 42(35), 10537–44.
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J., & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112(1), 41–50.
- Yu, Z., Koningstein, G., Pop, A., & Luirink, J. (2008). The conserved third transmembrane segment of YidC contacts nascent *Escherichia coli* inner membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 283(50), 34635–42.
- Zara, V., Conte, L., & Trumpower, B. L. (2009). Biogenesis of the yeast cytochrome *bc₁* complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1793(1), 89–96.

Lebenslauf

- 24.01.1980 geboren in Heidelberg
- 1986 – 1990 Besuch der Grundschule Laudenbach
- 1990 – 1996 Besuch der Carl-Engler-Realschule
(abgeschlossen mit der Mittleren Reife)
- 1996 – 1999 Besuch der Carl-Benz-Schule Mannheim (Technisches Gymnasium)
(abgeschlossen mit der allgemeinen Hochschulreife)
- 1999 – 2000 Ableistung des Grundwehrdienstes
- 2000 – 2006 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- 2006 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Bernhard Dobberstein,
angefertigt am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)
mit dem Titel: *The signal peptide of the mouse mammary tumor virus Rem protein
is released from the ER membrane and accumulates in the nucleus*
- seit 2007 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie der TU Kaiserslautern
bei Prof. Dr. Johannes Herrmann

Danksagung

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

In erster Linie geht mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Johannes M. Herrmann, der mir die Dissertation an seinem Lehrstuhl ermöglichte. Sein Ideenreichtum, ansteckender Optimismus und nie endende Wissbegierde haben mich in den letzten vier Jahren oft inspiriert.

Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Stefan Kins für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Martin Ott, der mich, seit er 2008 nach Kaiserslautern kam, in vielen Belangen unterstützt und aufgebaut hat und den Laboralltag mit seiner unendlichen wissenschaftlichen Begeisterung und Diskussionsbereitschaft stets erhellte. Ich danke dir für deine Unterstützung und freue mich auf die nächsten zwei Jahre in Schweden!

Jan Riemer danke ich unter anderem für die tollen Gespräche und wissenschaftlichen Diskussionen bei unseren gemeinsamen Mensabesuchen, dem ein oder anderen gemütlichen Kännchen in seinem Büro oder unseren Tierstallbesuchen, über die sich unsere Kaninchen sicherlich niemals gefreut haben (Danke an dieser Stelle an unsere tapferen Kaninchen für die Bereitstellung eurer in Eigenproduktion hergestellten Antikörper). Jan, ich hoffe, wir bleiben in Kontakt und sprechen uns nicht erst dann wieder, wenn der 1. FCK den Bayern die Lederhosen auszieht und Meister wird!

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Herrmann, Riemer und Ott möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, die von zahlreichen inspirierenden Diskussionen, viel Unterstützung und Humor und in einigen Fällen auch freundschaftlichen Banden geprägt war. Dies gilt besonders für Melanie Bien und Martin Prestele, denen ich an dieser Stelle besonders danken möchte. Beide haben mich bei meinem Start im Februar 2007 mit offenen Armen in der Zellbiologie empfangen, mich mit Rat und Tat unterstützt und standen mir immer mit Ihrer Freundschaft zur Seite und obwohl Doc P. mittlerweile der dunklen Seite der Macht (wie man die Industrie auch bezeichnen könnte) erlegen ist, freut es mich um so mehr, dass dies unserer Freundschaft keinen Abbruch getan hat.

Danken möchte ich auch Sabine Knaus und Andrea Trinkaus, die mir so manches Mal unter die Arme gegriffen haben, wenn Not am Markus war und mich mit einem nie endenden Strom isolierter Mitochondrien versorgt haben.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an dieser Stelle an unsere Simone, die im Sekretariat die Stellung hält und nicht einmal vor den kompliziertesten bürokratischen Kniffligkeiten zurückschreckte, mit denen ich sie im Laufe meiner Doktorarbeit nervte. Wenn das mal nicht auch mit meinem eigentlich ziemlich einfach zuzubereitenden Tomatenpesto zusammenhängt, für das sie mich sogar heiraten würde (ihrer eigenen Angabe zufolge).

Auch danken möchte ich Corinna Welz, die stets saubere Glaswaren aus der Spülküche für unsere Experimente bereitgestellt hat und Vera Nehr, die zusammen mit Andrea und Sabine immer für

das Vorhandensein der nötigen Verbrauchsmaterialien sorgte.

Mein Dank geht auch an Ilka Haferkamp und Melanie Geier, die mich in Sachen Proteinreinigung beraten haben. Darüber hinaus stand mir Ilkas Melanie vor allem bei den Messungen zur ADP-Aufnahme hilfreich zur Seite, bei denen der Unterhaltungsfaktor durch lustige Geschichten ihrerseits stets inklusive war.

Meinen größten Dank möchte ich an dieser Stelle an meine ganze Familie, vor allem aber meine Eltern und meinen Bruder richten, die mich seit ich denken kann mit all ihrer Kraft unterstützten, mir Trost, Mut und Freude spendeten und immer bedingungslos hinter mir standen.

Zuletzt, aber dafür umso herzlicher, möchte ich meiner Freundin Steffi danken. Mit ihrer Liebe, ihrer Lebensfreude und ihrem Tatendrang hat sie mich immer wieder zum Lachen gebracht, auch wenn mir gerade einmal nicht danach war. Sie stand mir mit all ihrer Kraft zur Seite und hat mich motiviert und aufgebaut, was sicher nicht immer einfach war. Ich danke dir von ganzem Herzen!