

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN

**Charakterisierung der mitochondrialen
Außenmembranproteine Om14p und Om45p
von *Saccharomyces cerevisiae***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

angefertigt am Institut für Genetik

von

HEIDEMARIE SUSANN LAUFFER

(Diplom Biologin)

geboren am 29.11.1980 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Rödel
Prof. Dr. Michael Göttfert

Eingereicht am: 12. November 2012

Verteidigt am: 22. April 2013

A journey of a thousand miles
begins with just one step.

Lao Tsu

Selbständigkeitserklärung

Ich, Susann Lauffer, versichere hiermit, dass ich diese Dissertation und die darin vorgestellten Arbeiten ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel selbstständig verfasst und durchgeführt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Gerhard Rödel am Institut für Genetik der TU Dresden betreut und von Juni 2006 bis November 2012 verfasst. Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Meine Person betreffend erkläre ich hiermit, dass keine früheren erfolglosen Promotionsverfahren stattgefunden haben.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Technische Universität Dresden an.

Dresden, 11. November 2012

Susann Lauffer

Liste der Veröffentlichungen

Teile der Doktorarbeit wurden aus Aktualitätsgründen bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht bzw. auf zwei Konferenzen vorgestellt. Über die Membrantopologie von Om45p wurde öffentlich in der Zeitschrift *Journal of Biological Chemistry* diskutiert.

Publikation

Lauffer, S., Mäbert, K., Czupalla, C., Pursche, T., Hoflack, B., Rödel, G. und Krause-Buchholz, U. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* Porin Pore Forms Complexes with Mitochondrial Outer Membrane Proteins Om14p and Om45p. *J Biol Chem* 287 (21) 17447-17458 PMID: 22461620.

Diskussionsbriefe zur Publikation

Rapaport, D. (2012) The Mitochondrial Protein OM45 Is Exposed to the Cytosol. *J Biol Chem* 287 (33) 27415 PMID: 22888114.

Lauffer, S., Rödel, G. und Krause-Buchholz, U. (2012) Reply to Rapaport: The Mitochondrial Protein OM45 is Exposed to the Cytosol. *J Biol Chem* 287 (33) 27416.

Poster

Lauffer, S., Krause-Buchholz, U. und Rödel, G. (2009) A link between copper metabolism and the mitochondrial outer membrane protein Om14p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Horizons in Molecular Biology*, 6th International PhD Student Symposium, Göttingen, 9. - 12. September 2009.

Lauffer, S., Mäbert, K., Czupalla, C., Pursche, T., Hoflack, B., Rödel, G. und Krause-Buchholz, U. (2012) Dancing with the right partner: Interaction of porin pore associated factors with inner mitochondrial membrane carriers selectively facilitates metabolite transport. 11th *European Conference On Fungal Genetics (ECFG11)*, Marburg, 30. März - 2. April 2012.

Danksagung

Diese Arbeit war die bisher größte akademische Herausforderung in meinem Leben. Ohne die Unterstützung vieler Personen wäre sie nicht das geworden, was nun vor Ihnen liegt. Daher möchte ich an dieser Stelle meinen tiefsten Dank an die folgenden Personen aussprechen:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerhard Rödel, der es mir ermöglichte, das Thema meiner Wahl neben den Drittmittelprojekten in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Seine wertvollen Anregungen trugen erheblich zum Fortgang dieser Arbeit in die richtige Richtung bei.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Göttfert für seine Bereitschaft, diese Dissertation als Zweitgutachter zu beurteilen, bedanken.

Dr. Udo Krause-Buchholz danke ich für seine stete Offenheit gegenüber Fragen und Diskussionen, für seinen wissenschaftlichen Rat sowie für seine konstruktiven Kommentare, die zu einem erheblichen Teil zum Gelingen des *Papers* sowie dieser Arbeit beitrugen. Mein Dank gilt außerdem Dr. Kai Ostermann für seine stetige Diskussionsbereitschaft. Des Weiteren möchte ich mich bei Uta Gey für ihre Unterstützung und wertvollen Tipps im Labor, insbesondere bei der 2D DIGE-Methode sowie auch bei allen anderen Mito-Dingen, bedanken.

Katrin Mäbert, die durch ihr Engagement die TAP-Prozedur zum Laufen gebracht und dadurch ungemein zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, bin ich sehr dankbar und wünsche ihr viel Erfolg für ihre eigene akademische Laufbahn.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Bernard Hoflack vom *Biotec* der TU Dresden, der meiner Arbeit wohlgesonnen gegenüberstand, und v. a. an seine Mitarbeiterin Theresia Pursche, die stets mit voller Begeisterung die MS-Analysen durchführte.

Aus Zeitgründen mussten leider von meiner Seite aus einige Analysen vorzeitig abgebrochen werden. Dennoch möchte ich folgenden Personen Danke sagen, die mir alle sofort begeistert mit ihrem Wissen und ihren technischen Ausstattungen für die in-

itialen Untersuchungen zur Verfügung standen: Andreas Janke vom Leibniz-Institut für Polymerforschung (IPF) für die AFM-Untersuchungen der Porinporen, Dr. Petr Formanek vom IPF für die TEM-Aufnahmen von Porinporen und Erdinc Sezgin von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Schwille am *Biotec* der TU Dresden für die FCS-Messungen des ATP-Flusses.

All meinen Labor- und Bürokollegen, insbesondere Susi, Corina, Uta, Ivan, Mandy, Simone, Annett, Anja und Kirsten möchte ich danken. Mit Ihnen verbinde ich viele schöne Erlebnisse und sie machten es mir einfacher, die Rückschläge zu bewältigen.

Annett Groß sei an dieser Stelle noch einmal besonders für die tolle Einführung ins \LaTeX , die einzigartige Vorlage und die sofortigen Hilfen bei auftretenden Schwierigkeiten gedankt. Du hast mich überzeugt: ich würde wieder mit \LaTeX schreiben!

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Corina, Micha und meiner Mami fürs Korrekturlesen dieser Arbeit.

Und nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund Micha, da er mich während der gesamten Promotionszeit stets unterstützte, motivierte, an mich glaubte, mit mir über die Arbeit diskutierte, mich in schweren Zeiten ertragen und mich durch unseren Sport abgelenkt hat. Meiner Tochter Anna rechne ich hoch an, dass sie v. a. in der Schreibphase so gut auf mich „verzichtet“ hat. Meiner noch ungeborenen Tochter werde ich immer dankbar sein, dass sie bis zum Abschließen dieser Arbeit im Bauch ausgehalten hat.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Biologische Bezeichnungen	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Mitochondrien	1
1.2 Die äußere Membran der Mitochondrien	3
1.2.1 Dynamik und zelluläre Verteilung der Mitochondrien	3
1.2.2 Kommunikation mit anderen zellulären Organellen	4
1.2.3 Induktion des programmierten Zelltodes	6
1.2.4 Transportprozesse der mt OM	7
1.3 Die Proteine Om14p & Om45p	14
1.4 Zielstellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Labormaterialien	17
2.1.1 Plasmide	17
2.1.2 DNA-Oligonukleotide	17
2.1.3 Enzyme	19
2.1.4 Größenstandards für DNA und Proteine	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Feinchemikalien	21
2.1.7 <i>Kit</i> -Systeme	22

2.2	Mikroorganismen	22
2.2.1	Bakterienstämme	22
2.2.2	Hefestämme	23
2.3	Zellbiologische Methoden	24
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen	24
2.3.2	Wachstumsuntersuchungen	26
2.3.3	Mikroskopische Analyse der Mitochondrienmorphologie	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	DNA-Isolation	27
2.4.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.4.3	DNA-Amplifikation	28
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4.5	DNA-Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
2.4.6	Transformation	31
2.5	Biochemische Methoden	33
2.5.1	Isolation von Gesamtprotein aus <i>S. cerevisiae</i>	33
2.5.2	Präparation der Mitochondrienfraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.5.3	Stufengradienten-Zentrifugation von Mitochondrien	36
2.5.4	NaCl-Behandlung von Mitochondrien	37
2.5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.5.6	Proteinfällung	38
2.5.7	Proteinbehandlungen mit spezifischen Enzymen	38
2.5.8	Protein-Interaktionsnachweise	40
2.5.9	Eindimensionale Proteinauftrennungen	43
2.5.10	Zweidimensionale Proteinauftrennungen	45
2.5.11	Proteinfärbungen im Polyacrylamid-Gel	52
2.5.12	Massenspektrometrie	52
2.5.13	<i>Western-Blot</i>	53
2.5.14	Bestimmung der Zitratsynthase-Aktivität	55
2.5.15	Nachweis von mitochondrialem ATP	56
3	Ergebnisse	59
3.1	Molekulare Charakterisierung	59

3.1.1	Generierung von Fusionsproteinen	60
3.1.2	Membrantopologie von Om45p	63
3.1.3	Posttranslationale Modifikationen	66
3.1.4	Molekulare Organisation von Om14p & Om45p	74
3.2	Interaktionsstudien	76
3.2.1	Protein-Interaktionsstudien mittels TAP & Co-IP	76
3.2.2	Abhängigkeit der Proteinstabilität von Komplexpartnern	79
3.2.3	Molekulare Organisation der OM-Proteine bei fehlenden Komplex- Untereinheiten	80
3.2.4	Protein-Interaktionsstudien von Deletionsmutanten	82
3.2.5	Identifizierung des Om14p-assoziierten Proteoms	84
3.3	Phänotypische Charakterisierung	87
3.3.1	Mitochondriale Morphologie	87
3.3.2	Auswirkungen von <i>OM14/OM45</i> -Gendeletionen auf das mt Proteom	91
3.3.3	Mitochondrialer Transport von TBHP	95
3.3.4	Mitochondrialer ADP / ATP-Transport	97
4	Diskussion	105
4.1	Der mitochondriale OM-Komplex	105
4.2	Funktion der Proteine Om14p & Om45p	109
4.3	Experimentelle Funktionsverifizierung	122
4.4	Funktionale Regulation mittels posttranslationaler Modifikationen	126
4.5	Evolutionäre Konservierung der OM-Proteine	129
4.6	Weiterführende Untersuchungen	131
	Zusammenfassung	135
	Literaturverzeichnis	137
	Datenbanken	163
	Anhang	165
	A Proteinsequenzen	165
	B Wachstumsanalysen	167

C Daten Massenspektrometrie

175

Tabellenverzeichnis

1.1	Mitochondriale <i>Carrier</i> der inneren mt Membran	11
2.1	Plasmide	17
2.2	<i>Primer</i>	18
2.3	Enzyme	19
2.4	DNA- und Proteinmarker	20
2.5	Antikörper	20
2.6	Feinchemikalien	21
2.7	<i>Kits</i>	22
2.8	Bakterienstämme	22
2.9	Hefestämme	23
3.1	Mitochondriale Auswirkungen von <i>OM14/OM45</i> -Gendeletionen	93
4.1	Co-Faktoren/Substrate & deren Transporter von Om14p / Om45p-abhängigen mt Proteinen	116
C.1	MS-Daten Glykosylierung	175
C.2	MS-Daten TAP	176
C.3	MS-Daten 2D DIGE	178

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mitochondrien - ER - Verbindungen	5
1.2	Proteinimport	8
1.3	Import von β -barrel Proteinen der mt OM	9
1.4	Porinpore	12
1.5	Porin - Porenzustände	13
3.1	Expressionsnachweis	61
3.2	Lokalisationsnachweis	62
3.3	Trypsinverdau	64
3.4	Proteinase K Verdau	65
3.5	Membrantopologie	66
3.6	Phosphorylierung 1D	67
3.7	Phosphorylierung 2D	68
3.8	Glykosylierung 1D	70
3.9	Glykosylierung 2D	72
3.10	Molekulare Protein-Organisation	74
3.11	Protein-Interaktionsstudien	77
3.12	<i>Steady state</i> Proteinkonzentrationen in Deletionsstämmen	79
3.13	Molekulare Protein-Organisation in Deletionsstämmen	81
3.14	Interaktionsstudien mit Deletionsmutanten	83
3.15	Mitochondriales Interaktom von Om14p	85
3.16	Mitochondriale Morphologie - fermentative Bedingungen	88
3.17	Mitochondriale Morphologie - respiratorische Bedingungen	90
3.18	Analyse des mt Proteoms	91
3.19	Venn-Diagramm der 2D DIGE-Analyse	95

3.20	Wachstum in Gegenwart von TBHP	96
3.21	Wachstum in Gegenwart von BKA	98
3.22	ATP-Nachweis	100
3.23	Mitochondrialer ATP-Fluss	103
4.1	Modell der Proteininteraktionen des OM-Komplexes	107
4.2	ADP / ATP-Austausch	113
4.3	Ethanol-Metabolismus	118
4.4	Modelle von mt Transportprozessen	123
4.5	Funktionsmodell des Proteinpaares Om14p / Om45p	136
A.1	Proteinsequenz von Por1p	165
A.2	Proteinsequenz von Om14p	166
A.3	Proteinsequenz von Om45p	166
B.1	Wachstum der <i>getagkten</i> Stämme mit fermentierbaren Medien	168
B.2	Wachstum der <i>getagkten</i> Stämme mit nicht-fermentierbaren Medien	169
B.3	Wachstum der Deletionsstämme mit fermentierbaren Medien	170
B.4	Wachstum der Deletionsstämme mit nicht-fermentierbaren Medien	171
B.5	Wachstum der gemischten Stämme mit fermentierbaren Medien	172
B.6	Wachstum der gemischten Stämme mit nicht-fermentierbaren Medien	173

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen gemäß den Richtlinien des „*Journal of Biological Chemistry*“ (<http://www.jbc.org/site/misc/abbrev.xhtml>) und des allgemeinen deutschen Sprachgebrauchs (<http://www.duden.de/>) werden vorausgesetzt. [Letzte Abfrage der URLs am 11. November 2012.]

λ -PP	λ Protein Phosphatase
ü. N.	über Nacht
1D/2D	ein-/zweidimensional
AEBSF	Aminoethyl-benzolsulfonylfluorid
AFM	<i>atomic force microscopy</i> / Rasterkraftmikroskopie
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	autonom replizierende Sequenz
a. u.	<i>arbitrary unit</i> / willkürliche Einheit
BKA	<i>bongrekic acid</i> / Bongkrekensäure
BN	<i>Blue Native</i> / blau und nativ
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
CBP	Calmodulin Bindepeptid
CCCP	Carbonyl-cyanid m-chlorophenyl hydrazon
CEN	Centromer
CM	Cristae Membran
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
COX	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIGE	<i>difference in gel electrophoresis</i> / Differenz-Elektrophorese im Gel
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	Dithionitrobenzolsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMES	ER-mitochondria encounter structure / Zusammentreff des ERs mit den Mitochondrien
FCS	fluorescence correlation spectroscopy / Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
IBM	inner boundary membrane / innere Grenzmembran
IEF	isoelektrische Fokussierung
IM	inner membrane / innere Membran
IMS	inter membrane space / Zwischenmembranraum
kb	Kilo Basenpaare
LB	lysogeny broth / Nährmedium für <i>E. coli</i>
LiAc	Lithiumacetat
MAM	mitochondria-associated membrane / mt assoziierte Membran
MC	mt carrier / mt Transporter
MDM	mt distribution and morphology / mt Verteilung und Morphologie
MIA	mt IMS assembly / mt Assemblierung im IMS
MM	Minimalmedium
mtCK	mitochondriale Kreatinkinase
mt	mitochondrial
MTS	mt or matrix targeting sequence / mt oder Matrix-Signalsequenz
MW	molecular weight / Molekulargewicht bzw. molekulare Masse
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OGT	β -N-Acetylglukosaminyltransferase
OM	outer membrane / äußere Membran
PAA	Polyacrylamid
PAM	presequence-associated protein import motor / Signalsequenz-assoziierter Proteinimportmotor
PBR	peripherer Benzodiazepinrezeptor
PI	Protease-Inhibitor
PTP	Permeabilitäts-Transitions-pore
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	sorting and assembly machinery / Sortier- und Assemblierungsmaschinerie
SFH	short flanking homology / kurze flankierende Homologie
ss	single stranded / einzelsträngig
TAP	tandem affinity purification / Tandem Affinitätsreinigung
TBHP	tert-Butylhydroperoxid

TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphin-hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethyldiamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEV	<i>tobacco etch virus</i> / Tabakätzvirus
TIM22	<i>IM carrier translocase</i> / Träger-Translokator der IM
TIM23	<i>IM presequence translocase</i> / Signalsequenz-Translokator der IM
TMD	Transmembrandomäne
TOM	Translokator der mt OM
TPI	Triosephosphat Isomerase
U/min	Umdrehungen pro Minute
UAS	<i>upstream activating sequence</i> / 5'-seitige aktivierende Sequenz
UE	Untereinheit
U	<i>units</i> / Einheiten
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i> / spannungsabhängiger Anionenkanal
WW	Wechselwirkungen
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> / Hefe Stickstoffquelle
YPD/E/G/Gal	..	Hefevollmedium mit Glukose, Ethanol, Glycerin oder Galaktose als C-Quelle
YPGCE	Hefevollmedium mit Glycerin, Zitrat und Ethanol als C-Quelle
ZNG	Zellnaßgewicht

Biologische Bezeichnungen

Genetische Nomenklatur

in <i>S. cerevisiae</i> :	<i>POR1</i>	Wildtyp-Gen
	$\Delta por1$	Deletion des Gens (Nullmutation)
	Por1p	Genprodukt (Protein)
in Säugerorganismen:	<i>VDAC</i>	Wildtyp-Gen
	VDAC	Genprodukt (Protein)

Nukleotidbezeichnung

Purinbasen:

A	Adenin
G	Guanin

Pyrimidinbasen:

C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil

Aminosäurekennzeichnung

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Mitochondrien

Mitochondrien sind zelluläre Kompartimente von eukaryontischen Zellen. Gemäß der allgemein anerkannten Endosymbiontentheorie werden die Mitochondrien von α -Proteobakterien abgeleitet, die wahrscheinlich von einem Archaeobakterium durch Endozytose aufgenommen wurden [1, 2].

Als Resultat des Endozytoseprozesses wurde der Endosymbiont mit einer Phospholipid-Doppelschicht der Wirtszelle umschlossen, so dass die Mitochondrien in vier Kompartimente unterteilt werden können: die äußere Membran (OM), der mitochondriale (mt) Zwischenmembranraum (IMS), die innere Membran (IM) und die mt Matrix. Die IM weist zudem starke Einstülpungen auf, so dass die in die Matrix ragenden Abschnitte der IM als *cristae membrane* (CM) und die in der Nähe der OM befindlichen Segmente als *inner boundary membrane* (IBM) bezeichnet werden. Beide Teile der IM werden durch sogenannte tubuläre *cristae junctions* miteinander verbunden bzw. getrennt [3, 4].

Bei den Mitochondrien handelt es sich nicht um starre Gebilde, sondern vielmehr um ein sehr dynamisches tubuläres Netzwerk, das ständig seine Form verändert und innerhalb der Zelle entlang des Zytoskeletts wandert [5].

Die Mitochondrien verfügen über ein separates Genom (zirkuläre, dsDNA), welches allerdings im Laufe der Evolution durch horizontalen Gentransfer ins nukleäre Genom sowie durch Genverluste stark reduziert wurde [6]. Innerhalb der mt Matrix erfolgt die Synthese von 13 (bei Säugetieren) bzw. 8 (bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) mt Proteinen mit Hilfe ebenfalls mt kodierter tRNAs und rRNAs [7]. Die meisten mt Proteine sind allerdings kernkodiert und müssen nach der Translation im Zytoplasma ins Mitochondrium transportiert werden. Dies erfolgt über ein komplexes Proteinimportsystem.

Die wohl bekannteste Funktion von Mitochondrien ist die Generierung von ATP mittels oxidativer Phosphorylierung. Durch die Stoffwechselprozesse Glykolyse, Zitronensäurezyklus und β -Fettsäureoxidation entstehen die energiereichen Moleküle NADH und FADH₂, aus denen die Enzymkomplexe der mt Atmungskette Elektronen beziehen. Die Atmungskettenkomplexe, die sich v. a. in der CM befinden [4], übertragen diese Elektronen in einer Reihe von Redoxvorgängen final auf molekularen Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird. Während des Elektronentransports werden zudem Protonen aus der Matrix in den mt IMS gepumpt, wodurch ein Protonengradient erzeugt wird. Der elektrochemische Protonengradient wird anschließend von der ebenfalls in der IM verankerten ATP-Synthase zur Produktion von ATP aus ADP und P_i genutzt.

Neben der Bereitstellung des Energiemoleküls ATP dienen die Mitochondrien aber auch als Kalziumspeicher und regulieren dadurch die Kalziumhomöostase der Zelle und spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalweiterleitung. Zudem sind die Mitochondrien bei zahlreichen Stoffwechselfvorgängen involviert: bei der Biosynthese von Aminosäuren, Eisen-Schwefel *Cluster*, Flavinmononukleotiden, Häm, Phospholipiden, Pyrimidinen sowie Ubiquinon und bei den Abbauprozessen Zitronensäurezyklus, β -Oxidation von Fettsäuren und dem Harnstoffzyklus [7–10]. Für den Transfer der Metabolite in die mt Matrix bzw. aus den Mitochondrien heraus war die Entwicklung von Transportsystemen in der OM und der IM für die eukaryontische Zelle ebenso bedeutsam.

Im IMS sind u. a. pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom *c* und der Apoptose induzierende Faktor (AIF) lokalisiert [11], so dass die Mitochondrien eine wichtige Schnittstelle für Signalkaskaden darstellen, die zum Zelltod (sowohl durch Apoptose und Nekrose) führen können.

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Mitochondrien liegt in der Aufrechterhaltung der Redoxbalance, denn Mitochondrien generieren auf der einen Seite Antioxidantien und sind auf der anderen Seite Hauptquelle und Hauptangriffspunkt von freien Radikalen [12].

Humane mt Funktionsstörungen können zum Alterungsprozess beitragen und zu zahlreichen Krankheiten wie z. B. Diabetes, neurodegenerative Krankheiten wie die Alzheimer Krankheit oder Parkinson aber auch zu Krebs führen [7, 9, 13]. Die Gewinnung molekularer Erkenntnisse, die die Mitochondrien betreffen, ist deswegen für die Entwicklung von Medikamenten und diagnostischen Angriffspunkten für mt assoziierte Krankheiten von großer Bedeutung.

Für molekular-biologische Untersuchungen der Mitochondrien ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ein besonders geeigneter Modellorganismus. Sie ist in der Lage, ihren Energiebedarf wahlweise durch einen fermentativen oder respiratorischen Metabolismus zu decken [14]. Die Energiegewinnung mittels Fermentation eignet sich v. a. für die Erforschung der mt Atmungskette, da dadurch auch atmungsdefiziente

Stämme untersucht werden können. Weitere Vorteile der Hefe sind, dass ihr Genom vollständig sequenziert ist und zahlreiche Informationen über ihre Gene und Proteine über verschiedene Datenbanken abgerufen werden können. *S. cerevisiae* lässt sich einfach kultivieren und leicht genetisch manipulieren, wodurch die molekular-genetische Arbeit mit diesem Organismus sehr effektiv gestaltet werden kann. Zudem sind zahlreiche Deletionsstämme bereits von dem *EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional Analysis* (EUROSCARF) generiert worden.

Trotz der großen evolutionären Distanz zwischen der Hefe und dem Menschen konnten für 46 % der Hefeproteine homologe Proteine beim Menschen identifiziert werden [15]. Außerdem gibt es zahlreiche Belege, dass die an *S. cerevisiae* festgestellten molekularen Erkenntnisse auf höhere Organismen einschließlich dem Menschen übertragen werden können [10, 16].

1.2 Die äußere Membran der Mitochondrien

Im Fokus dieser Arbeit steht die OM von Mitochondrien, welche für eine Abgrenzung vom Zytoplasma sorgt. Sie stellt aber nicht nur eine physiologische Barriere dar, sondern ist auch eine wichtige Regulationsstelle der mt Funktionen. In der mt OM sind beispielsweise zahlreiche Proteine verankert, die die Dynamik des Organells kontrollieren oder als Kontaktstelle für andere Organellen fungieren. Zudem sind in der OM Regulatoren des programmierten Zelltodes, Enzyme und Poren-formende Proteine lokalisiert [17]. Diese Prozesse und die beteiligten Proteine der mt OM werden im Folgenden näher dargestellt.

1.2.1 Dynamik und zelluläre Verteilung der Mitochondrien

Die Mitochondrien sind ständig ablaufenden Fusions- und Teilungsprozessen unterworfen. Diese Mechanismen stellen eine mt Qualitätskontrolle und eine effektive Anpassung des mt Kompartiments an die metabolischen Bedürfnisse der Zelle dar. Durch die Teilung von Mitochondrien wird die Anzahl der Organellen während der Zellteilung und Zelldifferenzierung reguliert. Ebenso kann die Zelle dadurch auf Veränderungen der Umwelt, beispielsweise auf wechselnde Energiebedürfnisse, reagieren. Außerdem wird durch Teilungsprozesse der Abbau von Mitochondrien durch die Lysosomen (Mitophagie) vorbereitet. Die Fusion von einzelnen Mitochondrien ermöglicht die Komplementation von Proteinkomplexen, die Reparatur der mt DNA sowie die Verteilung von metabolischen Intermediaten (Übersichtsartikel von Braun und Westermann [18] sowie Zungu *et al.* [19]).

In *S. cerevisiae* spielen bei der Fusion von Mitochondrien drei Proteine eine wesentliche Rolle: Fzo1p, Mgm1p und Ugo1p. Fzo1p ist eine konservierte GTPase, die sich im

Zytoplasma befindet und in der mt OM verankert ist. Sie ist für das Ankoppeln der OMs zweier Mitochondrien zuständig, indem Fzo1p zweier Organellen miteinander dimerisieren. Nach der Fusion der OM wird die Verschmelzung der IM durch die in der IM verankerte GTPase Mgm1p initiiert. Interessanterweise scheint ein Kontakt der Fusionsmaschinerien beider mt Membranen für eine koordinierte Doppelmembranverschmelzung nötig zu sein. Das integrale OM-Protein Ugo1p ist wahrscheinlich für diese Verbindung verantwortlich [5, 20].

Die mt Teilungsmaschinerie von *S. cerevisiae* besteht aus vier Hauptkomponenten: Fis1p, Mdv1p, Caf4p und Dnm1p. Das konservierte Rezeptorprotein Fis1p ist gleichmäßig auf der mt Oberfläche verteilt und in der OM verankert. An Fis1p docken die funktionell redundanten zytosolischen Proteine Mdv1p bzw. Caf4p an. Sie fungieren als Adaptorproteine zwischen Fis1p und dem Schlüsselspieler der mt Teilung, Dnm1p. Dnm1p ist ein Dynamin-verwandtes konserviertes Protein und homomerisiert an der mt Oberfläche über die Interaktion mit Mdv1p bzw. Caf4p spiralförmig und umspannt somit das gesamte Organell. Es schnürt die OM ein und führt schließlich zur Spaltung der Membran. Über die Teilung der mt IM ist bisher sehr wenig bekannt. Das in der IM verankerte Matrixprotein Mdm33p scheint für die IM-Spaltung wichtig zu sein [5, 20].

Zur Aufrechterhaltung der mt Morphologie in einem stabilen Zustand ist eine Balance der mt Vereinigung und Teilung von extremer Bedeutung.

Proteine der mt OM sind neben der Teilung und Fusion der Mitochondrien auch an der Verteilung der Organellen innerhalb der Zelle bzw. in die Tochterzelle beteiligt. Die Mitochondrien befinden sich gehäuft in Regionen mit hohem Energiebedarf wie z. B. den Synapsen von Neuronen [7]. Der Transport der Mitochondrien erfolgt primär über molekulare Motorproteine entlang des Zytoskeletts. Dabei interagieren Rezeptorproteine der mt OM mit Adaptorproteinen, die wiederum den Kontakt zu den Motorproteinen herstellen [21].

Bei der Zellteilung muss neben den Mitochondrien auch die mt DNA an die Tochterzelle weitergegeben werden. Eine Kopplung beider Prozesse wird durch Mmm1p vermutet. Das OM-Protein Mmm1p interagiert mit dem Zytoskelett der Zelle und gleichermaßen wurde eine Co-Lokalisation mit mt DNA nachgewiesen [22]. Bisher ist allerdings nicht klar, wer die Interaktion von Mmm1p zur mt DNA über die mt IM vermittelt.

1.2.2 Kommunikation mit anderen zellulären Organellen

Die starke Kompartimentierung einer eukaryontischen Zelle macht es erforderlich, dass die einzelnen Organellen miteinander kommunizieren, damit die zellulären Funktionen koordiniert ablaufen können. Eine Möglichkeit der Kommunikation besteht über das Aus-

senden von Signalmolekülen. Eine weitere Form der Kommunikation kann über direkte Kontaktstellen zweier Membranen erfolgen, bei der Moleküle zwischen zwei zellulären Kompartimenten übertragen werden [23–25]. Solche Kontaktstellen zweier Membranen sind redundant, d. h. verschiedene Proteinkomplexe, mit meist niedrigen Affinitäten, verbinden die Organellen [24]. Interessanterweise haben die Verbindungsproteine zweier Organellen oftmals zusätzliche Funktionen.

Eine Verbindung von Mitochondrien mit anderen zellulären Kompartimenten ist beispielsweise die zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Mitochondrien und das ER sind beide sehr dynamische zelluläre Kompartimente und weisen daher auch dynamische bzw. transiente Verbindungen miteinander auf, die zunächst durch elektronenmikroskopische Untersuchungen entdeckt wurden [26]. Die Verbindung zwischen der mt OM und dem ER wird als *mitochondria-associated membrane* (MAM) Fraktion bezeichnet. In einer Hefezelle werden zwischen 80 und 110 solcher Kontaktstellen prognostiziert [27].

In HeLa- und Rattenleberzellen wurde nachgewiesen, dass der *voltage-dependent anion channel* (VDAC) der mt OM mit dem Kalziumkanal IP₃R des ERs über das mt Chaperon GRP75 interagiert [28]. Eine weitere Verankerungsform in Säugerzellen erfolgt über eine Dimerisierung von Mitofusin 2 (MFN2), welches dual, in der mt OM und der Membran des ERs, lokalisiert ist [29].

In *S. cerevisiae* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Por1p (homolog zu VDAC) mit dem sogenannten großen ER Membrankomplex in Wechselwirkung tritt [30]. Eine bekanntere Verbindung ist jedoch die *ER-mitochondria encounter structure* (ERMES), bestehend aus dem zytosolischen Mdm12p, den Proteinen der mt OM Mdm10p und Mdm34p sowie dem ER-Membranprotein Mmm1p [31]. Es wird vermutet, dass ERMES v. a. eine strukturelle Rolle ausübt, homologe Proteine in Säugerzellen wurden bisher nicht gefunden.

Abb. 1.1 stellt die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien schematisch dar.

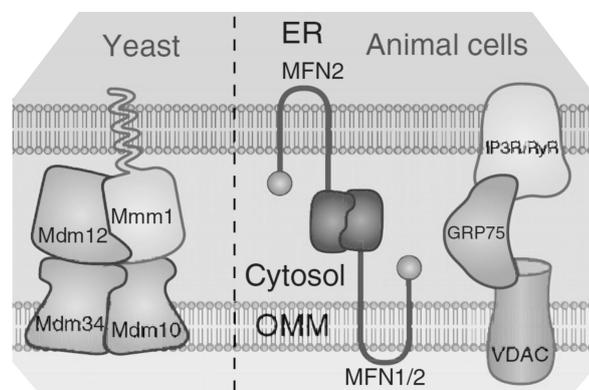


Abbildung 1.1: MAM - Fraktion: Mitochondrien - ER - Verbindungen

Die Darstellung wurde aus Elbaz und Schuldiner (2011) [23, Abb. 1] entnommen und stellt die bekannten Verbindungsproteine zwischen den Mitochondrien und dem ER in Säugerzellen und Hefen dar. OMM: mt OM

Die MAM-Fraktion ist v. a. für die Phospholipidbiosynthese von Bedeutung, da für diese aufgrund der Enzymlokalisierungen beide Kompartimente benötigt werden. Verschiedene Vorstufen von z. B. Phosphatidylcholin werden daher zwischen den Mitochondrien und dem ER in der MAM-Fraktion hin und her transportiert [23].

Eine weitere wichtige Funktion der MAM-Fraktion besteht in der Aufrechterhaltung der zellulären Kalziumhomöostase [32]. Durch die Verbindung des ERs mit der mt OM, über IP₃R und VDAC, erlangt der mt Kalziumimport durch den niedrig affinen Kalziumuniporter (MCU) in der mt IM seine Effektivität. Die mt Ca²⁺-Konzentration reguliert die ATP-Syntheserate, da verschiedene metabolische Schlüsselenzyme des Zitratzyklus durch Ca²⁺ aktiviert werden. Ein mt Ca²⁺-Überschuss allerdings führt zur Induktion des Zelltodes (Apoptose und Nekrose), indem die mt *permeability transition pore* (PTP) durch Ca²⁺ geöffnet wird [33].

1.2.3 Induktion des programmierten Zelltodes

Der programmierte Zelltod (Apoptose) wird durch verschiedene Stimuli in Form von Signalkaskaden ausgelöst, wobei die Mitochondrien entscheidende Regulatoren der Apoptose darstellen. Durch die Permeabilisierung der mt OM kommt es zu einem Ausstoß von im IMS lagernden pro-apoptotischen Faktoren (Cytochrom *c*, Apoptose induzierender Faktor und Endonuklease G) ins Zytoplasma der Zelle. Diese Faktoren führen zu verschiedenen Proteolyseprozessen innerhalb der Zelle sowie Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung im Zellkern [11, 34, 35].

Apoptose ist ein Phänomen von mehrzelligen Organismen, die der gezielten Entfernung geschädigter Zellen ohne Beeinflussung des Nachbargewebes dient. In der einzelligen Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurden dennoch zum Säugersystem homologe Proteine und analoge Apoptoseprozesse nachgewiesen [11, 36].

In der Hefe scheinen bei dem entscheidenden Prozess der mt OM Permeabilisierung die ADP / ATP-Translokatoren der IM eine Rolle zu spielen [36]. Eine Beteiligung der Porinpore der OM am Apoptoseprozess wird kontrovers diskutiert. So wurde z. B. gezeigt, dass eine Deletion von *POR1* den Zelltod beschleunigt [36]. Por1p könnte demzufolge auch einen inhibitorischen Effekt auf den Zelltod ausüben.

Wie die ADP / ATP-Translokatoren in Kombination mit den Porinporen oder ohne diese zur Permeabilisierung der mt OM führen können wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Es könnte z. B. eine bisher unbekannte, ADP / ATP-Translokator-abhängige, spezifische Pore für pro-apoptotische Faktoren in der mt OM gebildet werden. Die Öffnung der ADP / ATP-Translokatoren könnte aber auch zu einem mt Anschwellen führen, wodurch die mt OM aufbricht. Da aber nicht alle Proteine des IMS ins Zytoplasma gelangen, scheint die letztere Variante nicht der Realität zu entsprechen [35].

Neben der Permeabilisierung der mt OM scheint auch die mt Fragmentierungs- sowie

Fusionsmaschinerie (siehe Abschnitt 1.2.1) die Apoptose positiv und negativ regulieren zu können. In Säugerzellen und Hefen wurde bei Apoptose z. B. eine extensive mt Fragmentierung beobachtet. Für Fis1p (Bestandteil des Teilungsapparates) wurde allerdings eine anti-apoptotische Funktion gezeigt. Fis1p teilt einige biophysikalische Eigenschaften mit dem anti-apoptotischen BCL2 der mt OM, so dass Fis1p BCL2-ähnlich agieren könnte [34, 37, 38].

1.2.4 Transportprozesse der mt OM

Für die Biogenese von Mitochondrien ist der Import von nukleär kodierten Proteinen essentiell. Aber auch der ständige Austausch von Ionen und Metaboliten zwischen den Mitochondrien und dem Zytoplasma ist für die Gewährleistung aller mt Funktionen unabdingbar. Aufgrund der beiden mt Membranen sind für diese Prozesse evolutionär komplexe Transportsysteme entstanden. Durch diese wird sichergestellt, dass das innere Membranpotential aufrechterhalten bleibt. Sie sind spezifisch, proteinvermittelt und verbrauchen meist ATP [39].

Proteinimport

Die zentrale Eintrittspforte für mt Vorläuferproteine ist der ubiquitär verbreitete TOM- (*translocase of the outer membrane of mitochondria*) Komplex in der mt OM (Vgl. Übersichtsabbildung 1.2). In der Hefe verfügt der TOM-Komplex über drei Rezeptoren: Tom70p, Tom22p und Tom20p, die zu importierende Proteine anhand ihrer mt Zielsequenzen erkennen. Die typische mt Signalsequenz befindet sich am N-Terminus eines Vorläuferproteins, ist positiv geladen und bildet aufgrund ihrer amphipathischen Sequenz eine α -Helix aus. Sie dient zusätzlich als Erkennungssequenz für die Prozessierung im IMS oder in der Matrix durch die entsprechenden Peptidasen [39]. Sämtliche lösliche mt Matrixproteine sowie einige Proteine der IM verfügen über diese typische N-terminale Sequenz, weshalb sie auch *matrix targeting sequence* (MTS) genannt wird [40]. Proteine der OM weisen interne mt Zielsequenzen, die nicht prozessiert werden, auf [17]. Zusätzlich wurde auch schon von C-terminalen Signalsequenzen berichtet [41].

Die an den TOM-Rezeptoren gebundenen Vorläuferproteine werden anschließend an den eigentlichen Translokationskanal, der aus dem β -barrel Protein Tom40p gebildet wird, übergeben.

Nach dem Passieren des TOM-Komplexes, trennen sich die Wege der zu importierenden Vorläuferproteine entsprechend ihrer mt Subkompartimente. Proteine mit charakteristischen Cysteinmotiven werden mit Hilfe der MIA- (*mt IMS assembly*) Maschinerie in den IMS befördert. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken durch das Erv1p-Mia40p *disulfide relay* System werden die Proteine im IMS zurückgehalten [42].

Mt Matrixproteine werden mit Hilfe des TIM23- (*inner membrane presequence translocase*) Komplexes durch die IM transportiert. Für den Transfer wird zusätzlich das Membranpotential der IM und der ATP-betriebene PAM- (*presequence-associated protein import motor*) bzw. Motorkomplex inklusive dem mt Hsp70p benötigt [43]. Der Import einiger weniger Proteine der mt IM wird in der Hefe ebenfalls durch den TIM23-Komplex mit dem sogenannten Stopp-Transfer-Mechanismus oder über den konservativen Weg über die mt Matrix bewerkstelligt [40, 43–45].

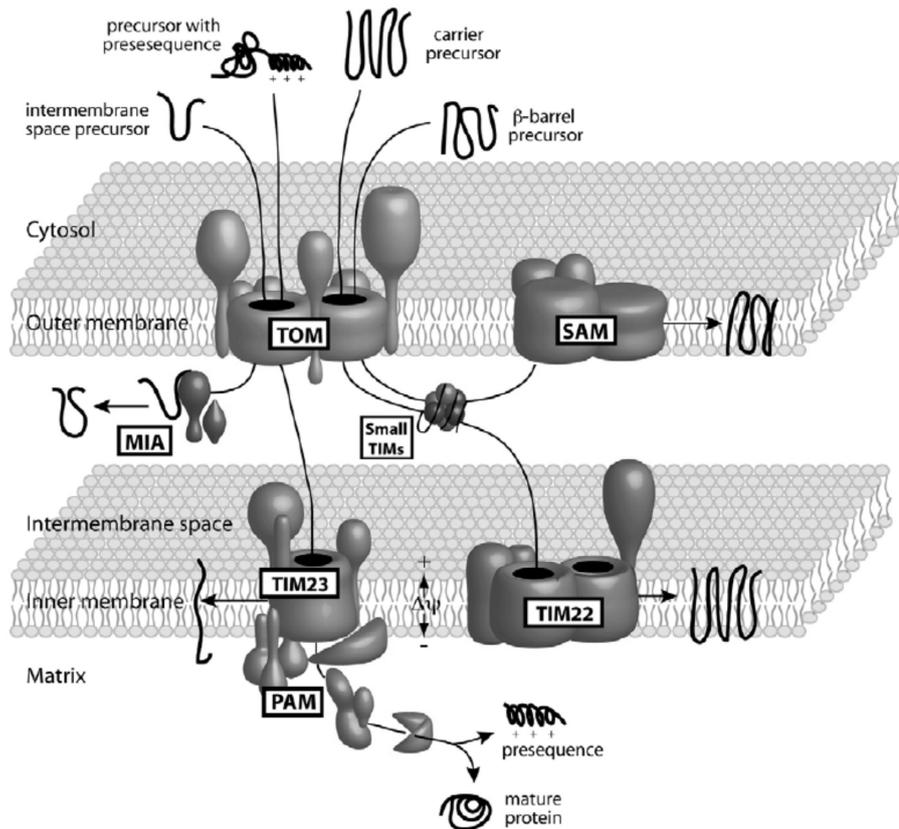


Abbildung 1.2: Mitochondrialer Proteinimport

Die Darstellung der mt Proteinimportmaschinerie von *S. cerevisiae* wurde aus Becker *et al.* (2008) [46, Abb. 1] entnommen.

Im IMS befinden sich kleine TIM-Komplexe. Sie fungieren als Chaperone und transportieren Membranproteine im IMS zu den Importmaschinerien in der OM bzw. in der IM [47, 48].

Proteine, die für die IM bestimmt sind und interne Signalsequenzen besitzen, werden nach der Translokation durch den TOM-Komplex von den kleinen TIM-Komplexen erkannt und an den TIM22- (*inner membrane carrier translocase*) Komplex befördert. Dieser baut die Proteine anschließend in die mt IM ein [49, 50].

Vorläufer von β -barrel Proteinen der mt OM, wie z. B. Tom40p und Por1p, werden von kleinen TIM-Komplexen an den SAM- (*sorting and assembly machinery*) Komplex in der OM geliefert. Der SAM-Komplex führt zur Integration dieser Proteine in die

OM. Mdm10p kann mit SAM-Komponenten assoziieren und wird wahrscheinlich für späte Reifungsschritte einiger Proteine, wie z. B. Tom40p, benötigt [51]. Der MDM- (*mt distribution and morphology*) Komplex der mt OM scheint ebenfalls beim generellen Importweg der β -barrel Proteine beteiligt zu sein [52]. Die molekulare Funktion ist allerdings noch unklar. Abb. 1.3 stellt die Integration der β -barrel Proteine in die mt OM schematisch dar.

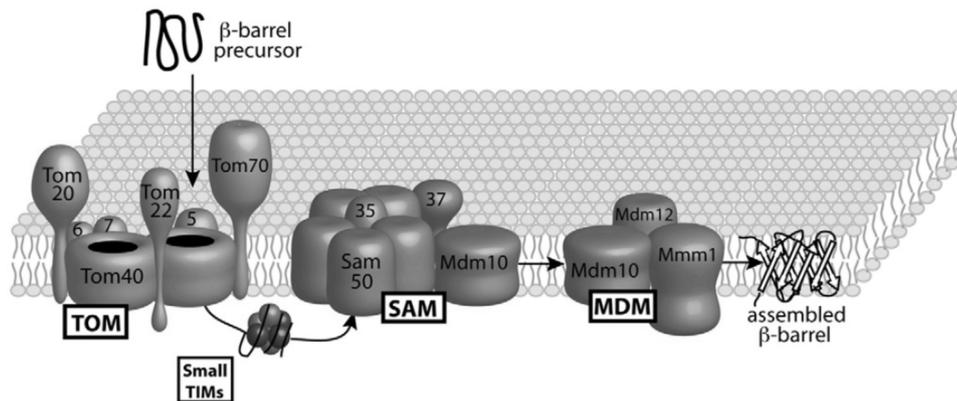


Abbildung 1.3: Import von β -barrel Proteinen der mt OM
Die Darstellung stammt aus Becker *et al.* (2008) [46, Abb. 2].

Neben den β -barrel Proteinen beherbergt die mt OM auch Proteine mit α -Helices, die als Transmembrandomänen (TMDs) fungieren.

Proteine mit einer α -Helix können N-terminus- (N-Terminus in der OM) oder C-terminal- (C-Terminus in der OM) verankert sein [17]. Deren mt Signalsequenzen bilden keinen Konsens innerhalb der Aminosäuresequenz. Die Information für die OM-Lokalisation wird vielmehr über die Struktur der TMD und deren flankierenden, positiven Aminosäurereste erkannt [17, 46]. Wie diese Proteine in die mt OM importiert werden, ist noch nicht klar. Die bisherigen Importdaten von TOM-Untereinheiten (UE) lassen vermuten, dass es zwei Formen des SAM-Komplexes gibt. Eine Form interagiert mit Mdm10p, die andere mit einem weiteren OM-Protein namens Mim1p.

Signal-verankerte Proteine, wie z. B. Tom20p und Tom70p, die wahrscheinlich über den SAM-Komplex mit Mim1p in die OM inseriert werden, scheinen den TOM-Komplex nicht zu benötigen [53].

Bei der C-terminalen Verankerung von Tom22p in die OM hingegen arbeiten die TOM- und SAM-Maschinerien inklusive Mdm10p zusammen [46].

In der mt OM sind zusätzlich auch Proteine mit mehreren TMDs aus α -Helices, wie z. B. der periphere Benzodiazepin Rezeptor (PBR) oder Fzo1p, verankert. Diese Proteine scheinen Tom70p-abhängig importiert zu werden. Allerdings werden alle anderen TOM-Komponenten wie der Tom40p-Kanal und auch der SAM-Komplex nicht benötigt [54]. Periphere Proteine der OM, wie Sam37p, werden wahrscheinlich komplett TOM-unabhängig mit der OM assoziiert [55].

Metabolit- und Ionentransport

Die mt IM ist für Ionen und Metabolite inpermeabel. Nur kleine ungeladene Moleküle wie O₂, CO₂ und H₂O können frei durch die IM diffundieren [56]. Die Passage von hydrophilen Komponenten wie anorganische Ionen, Co-Faktoren, Nukleotide und Metabolite durch die mt IM wird von zahlreichen dort lokalisierten Transportproteinen katalysiert. Sie gehören fast alle der Familie der mt *Carrier* (MC) an. Diese Transporter sind kleine Proteine mit 30-34 kDa. Sie sind jeweils mit sechs TMDs in der IM verankert und weisen unterschiedliche Substratspezifitäten auf (Übersichtsartikel siehe [57–59]). Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass die MCs in dimeren Formen arbeiten, konnte in neueren Arbeiten gezeigt werden, dass die funktionellen Formen der Transportproteine Monomere darstellen [60–63]. Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für 34 MCs [59], das von *Homo sapiens* für mindestens 49 [58]. Tabelle 1.1 stellt die zur Zeit 22 identifizierten MCs von *S. cerevisiae* mit ihren zu transportierenden Substanzen dar. Für acht weitere Transporter gibt es erste Hinweise für deren Transportprozesse und für vier Hefe-*Carrier* steht die Funktionsaufklärung noch ganz aus.

Der bisher am besten untersuchte *Carrier* ist der ADP / ATP-Translokator Aacp. Er tauscht in Abhängigkeit des Membranpotentials der IM zytosolisches ADP gegen ATP, welches in den Mitochondrien synthetisiert wurde, in einem Verhältnis von 1:1 aus [100, 101].

Aacp liegt in zwei verschiedenen Konformationen vor, die in Gegenwart der Substrate ADP oder ATP reversibel ineinander übergehen können. Die beiden Konformationen werden spezifisch von zwei verschiedenen Inhibitorclassen erkannt. Durch die Inhibitorbindung werden stabile Komplexe gebildet und der Transporter blockiert. Die erste Klasse der spezifischen und natürlich vorkommenden Inhibitoren beinhaltet Atractylosid (ATR) und das biologische Vorläufermolekül Carboxyatractylosid (CATR). Beide können die IM nicht passieren und binden an Aacp im IMS. Die zweite Gruppe der Inhibitoren wird durch die Bongkreksäure (BKA) repräsentiert. Das lipophile BKA penetriert in der protonierten Form die IM, interagiert mit Aacp von der Matrixseite und inhibiert den Transporter in einer nicht-kompetitiven Art und Weise [102, 103].

S. cerevisiae verfügt über drei isomere Formen von Aacp, die verschiedene physiologische Charakteristika aufweisen. Aac1p wird nur schwach, bei aeroben Bedingungen aber konstitutiv exprimiert [104], Aac3p hingegen wird durch Sauerstoff reprimiert [65, 105]. In Gegenwart von nicht-fermentierbaren C-Quellen und aeroben Bedingungen wird die dritte Isoform Aac2p sehr stark exprimiert [106]. Aac2p, auch bekannt unter dem Namen Pet9p, ist für das Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen essentiell und homolog zur humanen Form ANT1 [107, 108].

Tabelle 1.1: MCs der mt IM und deren transportierte Substanzen in *S. cerevisiae*.

Die Richtung der Transportprozesse (mt Import / Export) kann je nach Stoffwechselweg auch anders erfolgen. Proteinbezeichnungen in Klammern stellen alternative Proteinnamen dar. per.: peroxisomal; PP IX: Protoporphyrin IX; Py(d)NMPs: Pyrimidin - (desoxy)Nucleosidmonophosphate; Py(d)NTPs: Pyrimidin - (desoxy)Nucleosidtriphosphate; SAhC: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin; ThMP: Thiaminmonophosphat; ThPP: Thiaminpyrophosphat

Mitochondrialer Carrier	Proteinname	mt Import von	mt Export von	Referenzen
<i>identifizierte und verifizierte MCs</i>				
ADP/ATP - Transporter	Aac1/2/3p	ADP, PP IX	ATP	[64–68]
ATP-Mg / Phosphat - Transporter	Sal1p	ADP, ATP-Mg	ATP	[69–71]
Thiaminpyrophosphat - Transporter	Tpc1p	ThPP	ThMP	[72]
per. Adenin-Nucleotid - Transporter	Ant1p	ATP	AMP	[73]
Phosphat - Transporter	Mir1p	P _i , H ⁺		[74, 75]
SAM - Transporter	Sam5p (Pet8p)	SAM	SAhC	[76]
GTP/GDP - Transporter	Ggc1p (Yhm1p)	GTP	GDP	[77]
Succinat/Fumarat - Transporter	Sfc1p (Acr1p)	Succinat	Fumarat	[78]
Zitrat - Transporter	Ctp1p	Malat	Zitrat	[79]
Oxoglutarat - Transporter	Yhm2p (Coc1p)	Oxoglutarat	Zitrat	[80]
Oxodicarboxylat - Transporter	Odc1/2p	α-Ketoglutarat, Malat	α-Ketoadipat, α-Ketoglutarat	[81–83]
Aspartat/Glutamat - Transporter	Agc1p	Glutamat, H ⁺	Aspartat	[84]
Ornithin - Transporter	Ort1p	H ⁺	Ornithin	[85]
Carnitin - Transporter	Crc1p	Acetylcarnitin	Carnitin	[86]
NAD ⁺ - Transporter	Ndt1/2p	NAD ⁺	AMP & GMP	[87]
Pyrimidin-Nucleotid - Transporter	Pyt1p (Rim2p)	Py(d)NTPs	Py(d)NMPs	[88]
Dicarboxylat - Transporter	Dic1p	Succinat, Malat	P _i	[89, 90]
Oxalacetat - Transporter	Oac1p	Oxalacetat, Sulfat, H ⁺		[91]
<i>identifizierte MCs mit Hinweisen auf deren Transportprozesse</i>				
Coenzym A - Transporter	Leu5p	CoA		[92]
Phosphat - Transporter	Pic2p	P _i		[93]
Eisen - Transporter	Mrs3/4p	Fe ²⁺ , Cu ²⁺		[94–96]
Mangan - Transporter	Mtm1p	Mn ²⁺		[97]
α-Ketoglutarat - Transporter	Ymc1/2p		α-Ketoglutarat	[82]
FAD - Transporter	Flx1p		FAD	[98, 99]
<i>noch nicht charakterisierte MCs</i>				
Ydl119cp, Yfr045cp, Ymr166cp und Ypr011cp				[59]

Im Gegensatz zur mt IM, wird die mt OM im Allgemeinen für die meisten Moleküle mit einem Molekulargewicht (MW) von bis zu 6 kDa als permeabel angesehen [109, 110]. Diese Permeabilität wird durch die zahlreichen Porinporen der OM verursacht. Das mt Porin ist das abundanteste Protein der mt OM und hat je nach Organismus ein MW von 30-32 kDa [111]. Der Name Porin lässt eine Verwandtschaft mit den Porinkanälen in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien vermuten, ist jedoch aufgrund einer anderen Struktur sowie anderer Eigenschaften irreführend [112]. Ein den Eigenschaften angepasster Name ist daher der v. a. für Säuger verwendete Begriff *voltage-dependent anion channel* (VDAC).

Porin ist ein, auf die Sekundärstruktur und Grundfunktionen bezogen, stark konserviertes Protein. Es bildet einen Membrankanal aus einer α -Helix und zwölf bis dreizehn β -Strängen aus, wobei die polare Umgebung im Inneren des Kanals die nicht-polare Membran abgrenzt [112, 113]. Abb. 1.4 stellt die Porinpore schematisch dar.

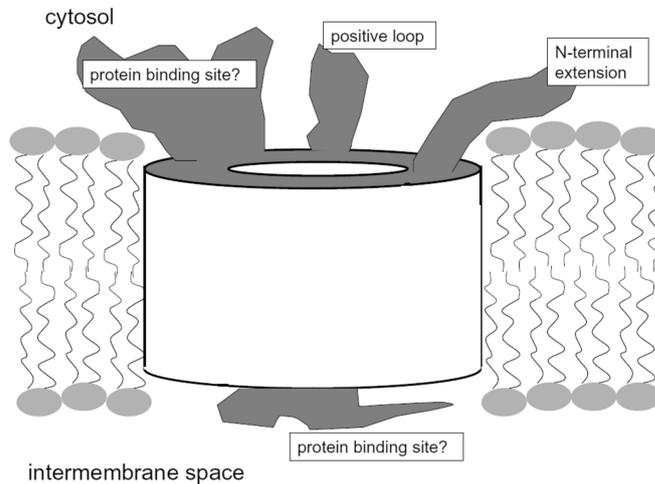


Abbildung 1.4: Porinpore

Die Darstellung stammt aus dem Übersichtsartikel von Colombini (2004) [112, Abb. 1].

Obwohl mittels *atomic force microscopy* (AFM) hexamere Strukturen der Porinporen identifiziert wurden [114, 115], konnte in planaren Lipid-Doppelmembranen nachgewiesen werden, dass ein VDAC Monomer eine Pore bildet [116]. Durch Interaktionen mit zahlreichen Proteinen wird die Pore reguliert und / oder modifiziert. Eine Spezialisierung der Pore erfolgt aber auch durch verschiedene Isoformen von Porin, die durch distinkte Gene und alternative *Splice*-Vorgänge entstehen [117]. Die Hefe z. B. besitzt zwei; Weizen, Maus und der Mensch hingegen drei Isoformen [112].

In *S. cerevisiae* stellt Por1p die Hauptform des mt Porins dar. Der Abb. A.1 im Anhang A kann die Proteinsequenz von Por1p der Hefe entnommen werden. Die Isoform Por2p wird in geringerem Umfang exprimiert. Eine Überexpression von Por2p kann zelluläre Defekte von $\Delta por1$ komplementieren, obwohl in planaren Lipid-Doppelmembranen nicht gezeigt werden konnte, dass Por2p Poren bildet [118–120].

Die Porinpore stellt keinen Kanal dar, durch den ein passiver Transfer sämtlicher Moleküle bis 6 kDa erfolgt, vielmehr ist sie ein selektiver Kanal. Eine Porinpore verändert ihre Selektivität, indem sie zwischen einem komplett offenen und einem fast geschlossenen Zustand wechseln kann (Vgl. Abb. 1.5) [111].

Der offene Zustand, mit einem Porendurchmesser von 2,5 - 3,0 nm, ist durch eine hohe Leitfähigkeit gekennzeichnet [116]. Da bevorzugt Anionen transportiert werden, wird ein effizienter Fluss von Metaboliten (organische Anionen) gewährleistet [118].

Durch positive sowie negative Spannungsänderungen (ca. 25 mV) der mt OM wird die Pore geschlossen [111]. Diverse Theorien, die ein Membranpotential der mt OM erklären, können dem Übersichtsartikel von Colombini (2004) [112] entnommen werden. Ein positiv geladener Spannungssensor von Porin wird wahrscheinlich auf die Außenseite des Kanals verlagert [113, 121] und verringert dadurch den Porendurchmesser auf ca. 1,9 nm [118]. Die Leitfähigkeit der Pore beträgt im sogenannten geschlossenen Zustand immer noch 50 - 60 %, allerdings verändert sich die Selektivität. Es kommt zu einem reduzierten Anionenfluss. Große Anionen wie ATP, Succinat oder Hydrogenphosphat können den Kanal wegen der kleineren Öffnung und der größeren Energiebarriere der Membran nicht mehr passieren [112]. Es kommt zu einem verstärkten Strom von kleinen Kationen wie Ca^{2+} , K^+ und Na^+ , aber auch kleine Anionen wie Cl^- können noch ungehindert passieren [109, 122, 123].

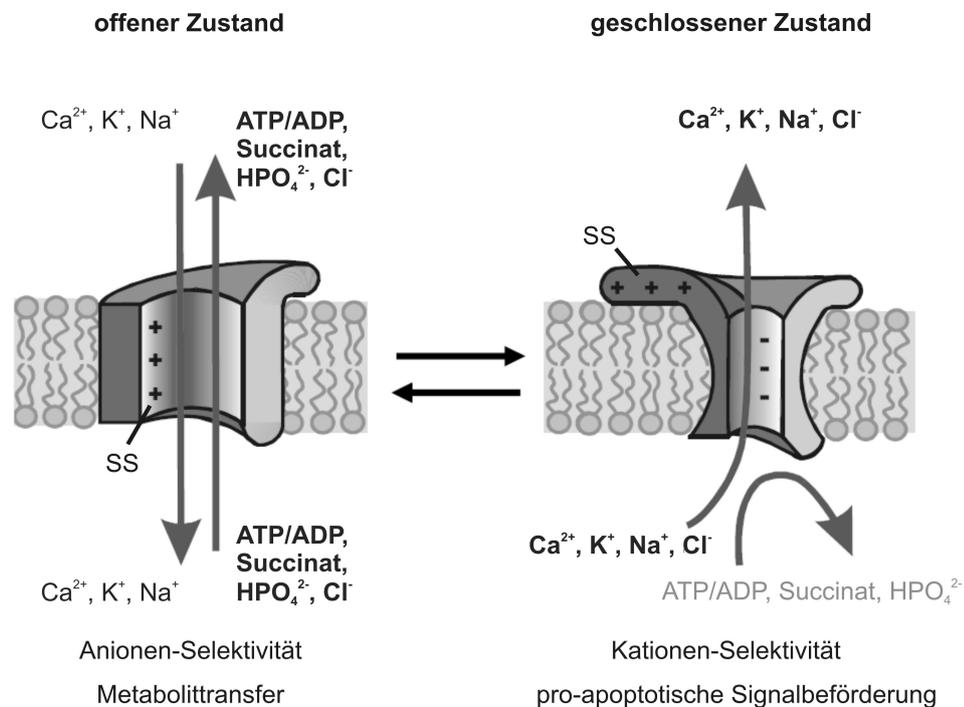


Abbildung 1.5: Porin - Porenzustände

Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Darstellung der Abb. 1 aus Rostovtseva und Bezrukov (2008) [111]. SS: Spannungssensor

Das Schließen von VDAC unterstützt bzw. initiiert eventuell den Apoptosevorgang einer Zelle auf eine noch nicht geklärte Art und Weise [111, 124]. Das Apoptose auslösende

Cytochrom *c* kann allerdings aufgrund seines MWs von ca. 12 kDa und einer Breite von etwa 3,4 nm die Porinpore offensichtlich nicht passieren. Die Beteiligung von Porin bei der Induktion von Apoptoseprozessen bleibt daher ungeklärt (siehe Abschnitt 1.2.3).

1.3 Die Proteine Om14p & Om45p

Neben Por1p gibt es zwei weitere abundante Proteine der mt OM in *S. cerevisiae*: Om14p und Om45p [125–127].

Bei Om14p handelt es sich um ein kleines (14 kDa), Cystein-reiches Protein mit drei α -helikalen TMDs, wobei der N-Terminus ins Zytoplasma und der C-Terminus in den mt IMS ragt [125]. Es wird durch das Gen *YBR230c* kodiert, welches über ein 97 bp langes Intron verfügt [128]. Laut Burri und Mitarbeitern ist es das erste bekannte mt Protein in *S. cerevisiae*, das von einem Intron-haltigen Gen kodiert wird [125].

In der zweiten TMD ist die Aminosäuredomäne CxxC lokalisiert. CxxC ist zum einen ein konserviertes Motiv von Thioredoxinen [129], zum anderen stellt es ein putatives Metallbindemotiv dar [130, 131]. Zusätzlich wurde das Cu_B -Konsensusbindemotiv von Cox1p, einer UE des Atmungskettenkomplexes IV (COX), in der Aminosäuresequenz von Om14p identifiziert. Allerdings liegt dieses Motiv in der inversen Orientierung vor [132]. Die Bindung der Kupferionen erfolgt hierbei über die Histidinreste (Datenbank PROSITE, [133]). Lithgow und seine Arbeitsgruppe betrachten die Aminosäuresequenz $\text{Hx}_4\text{Cx}_2\text{C}$, die den C-terminalen Histidinrest des Cu_B -Konsensusmotivs sowie das Motiv CxxC enthält, als eine potentielle Ligandenbindungsstelle (Lithgow, persönliche Mitteilung). Abb. A.2 im Anhang A verdeutlicht die Aminosäuremotive und die TMDs in der Aminosäuresequenz von Om14p.

Eigene Vorarbeiten führten zu der Hypothese, dass Om14p indirekt am mt Metalltransport, insbesondere von Kupferionen, beteiligt sein könnte [132]. In darauffolgenden Untersuchungen konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigt werden [134].

Om45p wird durch das Gen *YIL136w* kodiert und weist ein MW von 45 kDa auf. Yaffe und seine Mitarbeiter vermuteten bereits 1989 durch eine Analyse der Hydrophathie, dass Om45p mit einer α -Helix am N-Terminus (Aminosäuren 5-22) in der mt OM verankert ist [127]. 2003 konnte die Arbeitsgruppe von Rapaport dies auch experimentell bestätigen. Sie zeigten, dass die N-terminal fusionierten Aminosäuren 1-23 von Om45p das lösliche und grün fluoreszierende Protein (GFP) in der mt OM verankern können [135]. Über die Topologie des Proteins in der OM wird kontrovers berichtet [17, 126, 127, 136–138]. Im Anhang A Abb. A.3 ist die Proteinsequenz von Om45p mit der N-terminalen TMD dargestellt.

Interessanterweise wird die Expression von Om14p und Om45p in *S. cerevisiae* stark reguliert, d. h. sowohl die Transkription beider Gene (*OM14*: + 9,2-fach; *OM45*: + 14,9-fach) als auch die Translation wird durch einen *diauxic shift*¹ verstärkt induziert [141]. Dies wurde für 16 weitere mt Proteine gezeigt, die alle in respirationsassoziierten Stoffwechselwegen involviert sind. Der Umfang und die Regulation der Proteinexpression impliziert, dass Om14p und Om45p eine funktionelle Rolle beim Übergang zum respiratorischen Wachstum spielen. Vor diesem Hintergrund ist es erstaunlich, dass bisher keine Informationen bezüglich der Proteinfunktionen bekannt sind. Dass bisher kein Phänotyp bei der Deletion der jeweiligen Gene gefunden wurde, kann daran liegen, dass die Effekte der Nullmutationen bei den bisher getesteten Laborbedingungen nicht auffallen. Außerdem wäre es möglich, dass beide Proteine eine redundante Funktion ausüben und die Effekte nur bei einer Doppeldeletion sichtbar werden. Dieses Phänomen ist beispielsweise für die mt Zitratsynthase bekannt [142].

¹*S. cerevisiae* katabolisiert bevorzugt Glukose durch alkoholische Fermentation, wobei die Respiration supprimiert wird (Crabtree Effekt). Ist die Glukose aufgebraucht, kommt es zu einer Wachstumsarretierung. Während dieses Arrests, dem *diauxic shift*, wird der Metabolismus auf Respiration umgestellt und an alternative C-Quellen wie z. B. Ethanol oder Glycerin angepasst [139, 140].

1.4 Zielstellung

Proteine der mt OM spielen beispielsweise beim Transport von mt Vorläuferproteinen, Metaboliten und Ionen, bei der Kontaktherstellung mit anderen zellulären Kompartimenten, bei der Induktion des programmierten Zelltodes sowie der Aufrechterhaltung der Dynamik der Mitochondrien eine wesentliche Rolle. Ebenso sind mt OM-Proteine notwendig, um die OM mit der IM zu verbinden und dadurch koordinierte Abläufe von beiden mt Membranen zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die bisher funktionell unbekannt, nach einem *diauxic shift* abundanten Proteine Om14p und Om45p der mt OM von *S. cerevisiae* zu charakterisieren. Als initialer Schritt sollen beide Proteine molekular-biologisch analysiert werden. Für immunologische Proteinnachweise ist es notwendig, die Proteine Om14p und Om45p mit einem Epitop-*tag* zu versehen. Die kontrovers beschriebene Membrantopologie von Om45p soll durch Untersuchungen von Protease-Sensitivitäten geklärt werden. Des Weiteren soll geprüft werden, ob es Hinweise für Glykosylierungen und/oder Phosphorylierungen beider Proteine gibt. Aussagen über die molekulare Organisation der beiden OM-Proteine innerhalb der Mitochondrien sollen mittels nativer *Blue Native* Gelelektrophorese gewonnen werden.

Die Identifizierung von Interaktionspartnern spielt eine große Rolle bei der funktionellen Beschreibung von Proteinen. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit Studien zu Protein-Protein-Wechselwirkungen mit zwei unterschiedlichen molekularen Verfahren (*Tandem Affinity Purification* und Co-Immunopräzipitation) angefertigt werden. Sollten interagierende Proteine identifiziert werden, wird eine weitere Charakterisierung des/der gefundenen Proteinkomplexe(s) angestrebt. Diese Arbeiten umfassen Analysen von Deletionsmutanten, denen einzelne Komplex-UEs fehlen, in Bezug auf Proteinstabilitäten, der molekularen Organisation der Interaktionspartner sowie der Proteinkomplexbildung. Phänotypische Beschreibungen von Deletionsmutanten zur Identifizierung von Proteinfunktionen sollen die gewonnenen Daten ergänzen. Für diesen Zweck sollen die Auswirkungen von Gendelektionen auf die mt Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. proteomweite Effekte mit 2D IEF - SDS-PAGEs analysiert werden. Die putativen Proteinfunktionen, die durch die Interaktionsstudien gewonnen wurden, sollen mit funktionalen Analysen untermauert werden.

Unter Umständen üben die Proteine Om14p und Om45p redundante Proteinfunktionen aus, so dass die Analysen durch Untersuchungen der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ erweitert werden sollen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Labormaterialien

2.1.1 Plasmide

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide.

Plasmid	relevante Charakteristika	Quelle
pBS1539	kodierende Sequenz für TAP-tag, 2μ , Amp ^R , Deletionskassette <i>KIURA3</i> ,	Euroscarf
pGA2254	kodierende Sequenz für 9-fachen c-Myc-tag, <i>Sphis5⁺</i> (komplementiert <i>his3</i>)	W. Zachariae, MPI für Biochemie, München
pUC19-3HA-URA	kodierende Sequenz für 3-fachen HA-tag, <i>URA3</i>	W. Zachariae, MPI für Biochemie, München
pUZV108	kodierende Sequenz für 3-fachen HA-tag, <i>Sphis5⁺</i> (komplementiert <i>his3</i>)	W. Zachariae, MPI für Biochemie, München
pYX142-mtGFP	kodierende Sequenz für GFP mit mt Matrix- Zielsequenz, <i>LEU2</i> , Einzelkopieplasmid, ARS/CEN, starker konstitutiver <i>TPI</i> -Promotor	[143]

2.1.2 DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen biomers.net oder Eurofins MWG Operon bezogen und in 5 mM Tris/HCl pH 7,2 bei 60 °C und 700 U/min für 1 h gelöst (finale Konzentration: 100 pmol/ μ l). Die Tabelle 2.2 stellt die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* sowie deren Verwendungszweck dar.

Tabelle 2.2: Verwendete Primer.

Die unterstrichenen Bereiche der *Primer* sind komplementär zu Bereichen der Plasmide pUZV108 (#1a, #1b), pUC19-3HA-URA (#1a, #1b), pGA2254 (#2a, #2b) bzw. pBS1539 (#3a, #3b, #4a, #4b, #5a, #5b)

Nr.	Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'	Anwendung
#1a	YBR230cmycfor	GGT ATA ATT TCA AAG AAA TAC TAC TCC AGA TAC GAC AAG AAA <u>TCC GGT TCT GCT GCT AG</u>	Amplifikation der Kassetten <i>3HA-Sphis5⁺</i> bzw. <i>3HA-KIURA3</i> für <i>OM14</i>
#1b	YBR230cmycrev	TAA TAG TTA TAA AAA TAT ATG TAT ATA AAG TGT GTG AGT GTG <u>TCT CGA GGC CAG AAG AC</u>	
#1c	YBR230chkfor	CCT AAC TCT ACA GTC TTA GC	Integrationsnachweis
#1d	YBR230chkrev	TCA CTT GAC CGA TGA AGA GG	
#2a	OM45tagfor	AAT GAT AAG GGT GAT GGT AAA TTC TGG AGC TCG AAA AAG GAC <u>TCC GGT TCT GCT GCT AG</u>	Amplifikation der Kasette <i>9cMyc-Sphis5⁺</i> für <i>OM45</i>
#2b	OM45tagrev	ATA AAA AAT GAG AAA CAT GTG AAT ATG TAT ATA TGT TAT GCG <u>CCT CGA GGC CAG AAG AC</u>	
#2c	OM45chkfor	GAG GCC CAA AAG AAG TAC GA	Integrationsnachweis
#2d	OM45chkrev	CCG TTT TCC AAT CCA TAA TC	
#3a	OM45TAPfor	AAT GAT AAG GGT GAT GGT AAA TTC TGG AGC TCG AAA AAG GAC <u>ATG GAA AAG AGA AGA TGG</u>	Amplifikation der Kasette <i>TAP-KIURA3</i> für <i>OM45</i>
#3b	OM45TAPrev	GCC ACT AAT TTA CTC CGT TTT CCA ATC CAT AAT CAG CAA <u>AAT GTC CAC AAA ATC ATA TAC C</u>	
#3c	OM45TAPchkfor	CAG ATA AGG ATG TCA TCA AG	Integrationsnachweis
#3d	TAPchkrev	TCC ACG GCT TCA TCG TGT TG	
#4a	TOM22TAPfor	ATT GGC CCA AGG TGA AAA AGA TGC TGC AGC AAC AGC CAA <u>TAT GGA AAA GAG AAG ATG G</u>	Amplifikation der Kasette <i>TAP-KIURA3</i> für <i>TOM22</i>
#4b	TOM22TAPrev	TAT TGA TAT AGC GGT TTA AAA CGA AGA TTT TTT TTC TTC <u>AAT GTC CAC AAA ATC ATA TAC C</u>	
#4c	TOM22TAPchkfor	GCA TCA TTC AAA TGG TCG AA	Integrationsnachweis mit #3d

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

Tabelle 2.2: [Fortsetzung]

Nr.	Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'	Anwendung
#5a	deltaYIL136wfor	GCC AGT AAC GTT AAT CAT TTA ATA AAA CAA GCA GAT AAG GAG CTT GAT ATC GAA TC	Amplifikation der Deletionskassette <i>KIURA3</i> für <i>OM45</i>
#5b	deltaYIL136wrev	ATG TTA TGC GGG AAC CAA CCC TTT ACA ATT AGC TAT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG	
#5c	chkYIL136for	CCT TTC TTG AAA TAA AGG	Nachweis der <i>OM45</i> -Deletion
#5d	chkYIL136wrev	GAC CAT ATG TGA TTT CAA	
#6a	Sphis5for03	TTT GGA CAA AGC TCC CTT ACC	Nachweis des <i>Sphis5⁺</i> -Markers
#6b	Sphis5rev03	ACA ACA CTC CCT TCG TGC TTG	
#7a	URA3KlSondefor	GCA GGT GGC TAT TAG	Nachweis des <i>KIURA3</i> -Markers
#7b	URA3KlSonderev	ATG GTC TGA TAT CAC	
#8a	KANfor	CTC ACA TCA CAT CCG AAC	Nachweis des <i>kanMX4</i> -Markers
#8b	KANrev	GAG AAA ACT CAC CGA GGC A	

2.1.3 Enzyme

Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
AcTEV™ Protease	Invitrogen
λ Protein Phosphatase	NEB
<i>Phusion</i> ® - <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
Proteinase K	Invitrogen / Roth
Ribonuklease A	AppliChem
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	TU Dresden, IfG
Trypsin	Promega / Sigma
Zymolyase-20T (aus <i>Arthrobacter luteus</i>)	MP Biomedicals

2.1.4 Größenstandards für DNA und Proteine

Zum Größenvergleich von DNA-Fragmenten und Proteinen verschiedenster Gelelektrophoreseverfahren wurden die in Tabelle 2.4 dargestellten Marker mitgeführt. Wenn im Text nicht anders vermerkt, wurden die mit * markierten Standardmarker genutzt.

Tabelle 2.4: Verwendete DNA- und Proteinmarker.

Marker	Hersteller
<i>für Agarose-Gelelektrophorese</i>	
* λ -DNA Marker / <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Fermentas
<i>für SDS-PAGE</i>	
<i>CandyCane™ Glycoprotein Molecular Weight Standard</i>	Invitrogen
* <i>Page-Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>für BN-PAGE</i>	
* <i>High molecular weight gel filtration calibration kit</i>	GE Healthcare

2.1.5 Antikörper

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in TBS/T mit 5% (w/v) Magermilchpulver (siehe Kapitel 2.5.13).

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper für Immundetektion.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<i>Primäre Antikörper</i>		
mouse-anti-c-Myc	1 : 1.000	Roche
mouse-anti-Cox1p	1 : 1.000	MitoSciences
mouse-anti-Cox2p	1 : 1.000	MitoSciences
mouse-anti-HA	1 : 1.000	Roche
mouse-anti-Pgk1p	1 : 10.000	Molecular Probes
mouse-anti-Por1p	1 : 1.000	MitoSciences
rabbit-anti-Aco1p	1 : 2.000	R. Lill, Marburg
rabbit-anti-Ccp1p	1 : 1.000	W. Neupert, München
rabbit-anti-Cit1p	1 : 1.000	T. Fox, Ithaca
rabbit-anti-TAP (gegen das Calmodulin Bindepeptid (CBP) gerichtet)	1 : 2.000	Open Biosystems
rabbit-anti-Tom22p	1 : 1.000	D. Mokranjac, München
rabbit-anti-Tom40p	1 : 1.000	J. Brix, Freiburg
<i>Sekundäre Antikörper</i>		
<i>ECL™ Mouse IgG</i> , HRP-konjugiert (aus Schaf)	1 : 5.000	GE Healthcare
<i>ECL™ Rabbit IgG</i> , HRP-konjugiert (aus Esel)	1 : 5.000	GE Healthcare
<i>ECL™ Plex goat-anti-mouse IgG</i> , <i>Cy5™</i>	1 : 2.500	GE Healthcare

2.1.6 Feinchemikalien

Tabelle 2.6: Verwendete Feinchemikalien.

Chemikalie	Hersteller
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	GE Healthcare
6-Aminocapronsäure	Sigma
30 % Acryl-/Bisacrylamid	AppliChem
40 % Acryl-/Bisacrylamid, (hoher Reinheitsgrad)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth
β -NADH (Dinatriumsalz)	AppliChem
Acetyl-CoA	AppliChem
ADP (Natriumsalz aus bakterieller Quelle)	Sigma
Aminoethyl-benzolsulfonylfluorid (AEBSF) - Hydrochlorid	AppliChem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	AppliChem
Bongkretsäure (BKA)	Enzo Life Sciences
Carbonyl-cyanid m-chlorophenyl hydrazon (CCCP)	Sigma
Coomassie [®] Brilliant Blau G250	Serva
<i>Deoxynucleotide Solution Mix</i> (dNTPs)	NEB
Digitonin	AppliChem
Dithionitrobenzolsäure (DTNB, Ellmans Reagenz)	ICN Biomedicals
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Dodecyl- β -D-maltosid (Laurylmaltosid)	Sigma
einzelsträngige Heringssperma-DNA (ss-DNA)	Invitrogen
Ethidiumbromid	Serva
H ₂ O (Reinheitsgrad für HPLC geeignet)	AppliChem
Imidazol	AppliChem
Lithiumacetat (LiAc)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Oligomycin (aus <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>)	Sigma
Oxalacetat	Sigma
Paraquat (Methyl viologen)	Sigma
<i>Phosphatase Inhibitor Cocktails</i> I und II	Sigma
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

Tabelle 2.6: [Fortsetzung]

Chemikalie	Hersteller
<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i> (PI-Mix, EDTA-frei)	Roche
<i>RedSafe™</i> (4000x)	iNtRON Biotechnology
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (TBHP, T-HYDRO® Lösung)	Sigma
Tris(2-carboxyethyl) phosphin-hydrochlorid (TCEP)	Sigma
Triton X-100	Sigma

2.1.7 Kit-Systeme

Tabelle 2.7: Verwendete Kit-Systeme.

Name	Hersteller
<i>Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare
<i>ATP Glow Juice</i> (ohne Detergenz)	PJK
Calmodulin-Sepharose™ 4B	GE Healthcare
<i>DC™ Protein Assay</i>	Bio-Rad
IgG-Sepharose™ 6 Fast Flow	GE Healthcare
<i>NHS HP SpinTrap</i>	GE Healthcare
<i>Plasmid Miniprep™ - Classic</i>	Zymo Research
<i>Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit</i>	Invitrogen
<i>Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit</i>	Zymo Research

2.2 Mikroorganismen

2.2.1 Bakterienstämme

Zum Amplifizieren von Plasmiden wurde das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet.

Tabelle 2.8: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL(Str^R) endA1</i></i>	Invitrogen

2.2.2 Hefestämme

Sämtliche Analysen dieser Arbeit erfolgten mit den in Tabelle 2.9 aufgelisteten *S. cerevisiae* Stämmen.

Tabelle 2.9: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>Wildtypstamm</i>		
BY4741 / WT	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf Acc. No. Y00000
<i>getaggte Stämme</i>		
OM14-HA	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR230c::(<i>YBR230c-3HA-Sphis5</i> ⁺)	diese Arbeit
OM45-cMyc	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YIL136w::(<i>YIL136w-9cMyc-Sphis5</i> ⁺)	[144]
OM14-HA OM45-cMyc	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR230c::(<i>YBR230c-3HA-KIURA3</i>) YIL136w::(<i>YIL136w-9cMyc-Sphis5</i> ⁺)	[144]
OM14-TAP	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR230c::(<i>YBR230c-TAP-KIURA3</i>)	[134]
OM45-TAP	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YIL136w::(<i>YIL136w-TAP-KIURA3</i>)	diese Arbeit
TOM22-TAP	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YNL131w::(<i>YNL131w-TAP-KIURA3</i>)	diese Arbeit
<i>Deletionsstämme</i>		
Δ <i>fis1</i>	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YIL065c:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf Acc. No. Y01458
Δ <i>fzo1</i>	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR179c:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf Acc. No. Y03319
Δ <i>om14</i>	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR230c:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf Acc. No. Y03370
Δ <i>om14</i> OM45-cMyc	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YBR230c:: <i>kanMX4</i> , YIL136w::(<i>YIL136w-9cMyc-Sphis5</i> ⁺)	diese Arbeit
Δ <i>om45</i>	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YIL136w:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf Acc. No. Y02295
Δ <i>om45</i> OM14-HA	MATa, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YIL136w:: <i>kanMX4</i> , YBR230c::(<i>YBR230c-3HA-Sphis5</i> ⁺)	diese Arbeit

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

Tabelle 2.9: [Fortsetzung]

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
$\Delta om14 \Delta om45$	MATa, <i>his3</i> $\Delta 1$, <i>leu2</i> $\Delta 0$, <i>met15</i> $\Delta 0$, <i>ura3</i> $\Delta 0$, YBR230c:: <i>kanMX4</i> , YIL136w:: <i>KIURA3</i>	diese Arbeit
$\Delta por1$	MATa, <i>his3</i> $\Delta 1$, <i>leu2</i> $\Delta 0$, <i>met15</i> $\Delta 0$, <i>ura3</i> $\Delta 0$, YNL055c:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf Acc. No. Y07374
$\Delta por1$ OM14-HA	MATa, <i>his3</i> $\Delta 1$, <i>leu2</i> $\Delta 0$, <i>met15</i> $\Delta 0$, <i>ura3</i> $\Delta 0$, YNL055c:: <i>kanMX4</i> , YBR230c:: <i>(YBR230c-3HA-Sphis5⁺)</i>	diese Arbeit
$\Delta por1$ OM45-cMyc	MATa, <i>his3</i> $\Delta 1$, <i>leu2</i> $\Delta 0$, <i>met15</i> $\Delta 0$, <i>ura3</i> $\Delta 0$, YNL055c:: <i>kanMX4</i> , YIL136w:: <i>(YIL136w-9cMyc-Sphis5⁺)</i>	diese Arbeit
$\Delta por1$ OM14-HA OM45-cMyc	MATa, <i>his3</i> $\Delta 1$, <i>leu2</i> $\Delta 0$, <i>met15</i> $\Delta 0$, <i>ura3</i> $\Delta 0$, YNL055c:: <i>kanMX4</i> , YBR230c:: <i>(YBR230c-3HA-KIURA3)</i> , YIL136w:: <i>(YIL136w-9cMyc-Sphis5⁺)</i>	diese Arbeit

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen

Die Bestandteile der jeweiligen Nährmedien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Formedium, Roth und AppliChem bezogen.

Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte mit LB-Medium bei 37 °C ü. N. im Brutschrank (Festmedium) oder im Inkubationsschüttler mit 180 U/min (Flüssigkultur). Trugen die Bakterien ein Plasmid, wurde in Gegenwart der benötigten Antibiotika kultiviert.

lysogeny broth (LB-Medium)

0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1,0 % (w/v)	Pepton
1,0 % (w/v)	Natriumchlorid
2,0 % (w/v)	Agar (für Festmedium)
pH-Wert: 7,4	

Antibiotika

100 µg/ml	Ampicillin
-----------	------------

Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde, wenn nicht anders vermerkt, bei 30 °C mit Vollmedium auf Agarplatten oder in Flüssigkultur (180 U/min) ü. N. angezogen. Als C-Quelle diente Glukose (YPD). Zur Isolation der Mitochondrienfraktion, wurde die Hefe in YPE (Ethanol als C-Quelle) kultiviert, wobei dazu Schikanekolben verwendet wurden. Für verschiedene Wachstumsuntersuchungen wurden zusätzlich die Medien YPGal, YPG und YPGCE verwendet.

Zur Selektion von transformierten Hefen oder bei Plasmidanwesenheit wurden die Hefen in Minimalmedium (MM) mit den entsprechenden Supplementen angezogen.

Vollmedium (YP)

	1,0 % (w/v)	Hefeextrakt	
	2,0 % (w/v)	Pepton	
	1,5 % (w/v)	Agar (für Festmedium)	
C-Quellen:	<i>Fermentation:</i>		
	2,0 % (w/v)	Glukose	→ YPD
	2,0 % (w/v)	Galaktose	→ YPGal
	<i>Respiration:</i>		
	3,0 % (v/v)	Ethanol	→ YPE
	2,0 % (v/v)	Glycerin	→ YPG

YPGCE

	1,0 % (w/v)	Hefeextrakt
	2,0 % (w/v)	Pepton
	3,0 % (w/v)	Glycerin
	50 mM	Natriumzitat
	2,0 % (v/v)	Ethanol
	2,5 % (w/v)	Agar (für Festmedium, extra autoklaviert)
	pH-Wert: 4,0	

Minimalmedium (MM)

	0,5 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	0,17 % (v/v)	YNB
	2,0 % (w/v)	Glukose
	2,5 % (w/v)	Agar (für Festmedium)

Supplemente

	120 mg/ml	L-Histidin
	160 mg/ml	L-Leucin
	40 mg/ml	L-Methionin
	60 mg/ml	Uracil

Lagerung von Mikroorganismen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der gentechnisch veränderten Mikroorganismen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 1 ml einer ü. N. Kultur mit 1 ml 50 %igem Glycerin vermischt, 30 min bei RT inkubiert und in einem Kryoröhrchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.2 Wachstumsuntersuchungen

Wachstumsanalysen auf Festmedium

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in 10 ml YPD angeimpft und ü. N. bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorkultiviert. Die Vorkultur wurde mit dem später zu testenden Grundmedium 1:100 verdünnt und erneut ü. N. bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde die jeweilige Zellzahl ermittelt ($\text{OD}_{600} = 1 \hat{=} 1 \times 10^7$ Hefezellen) und eine Verdünnungsreihe von $1,25 \times 10^6$ bis $1,25 \times 10^3$ Zellen/ml angefertigt. Jeweils $8\text{ }\mu\text{l}$ der Verdünnungsstufen ($\hat{=} 10^4$ bis 10^1 Zellen) wurden auf den zu untersuchenden Agarplatten aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für ein bis neun Tage. Aussagen zum Wachstumsverhalten wurden visuell ermittelt.

Wachstumsanalysen in Flüssigkultur

Die Hefestämme wurden analog zu den Wachstumsuntersuchungen auf Festmedium vorkultiviert und auf eine Zellzahl von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. In eine transparente 96-well Platte wurden pro well $200\text{ }\mu\text{l}$ Medium und $8\text{ }\mu\text{l}$ Hefekultur ($\hat{=} 1 \times 10^4$ Hefezellen) pipettiert und mit einer *Breathe-Easy*-Membran (Diversified Biotech) verschlossen. Die Kultivierung erfolgte im Nephelometer *NEPHELOstar Galaxy* (BMG Labtechnologies) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit den folgenden Parametern: orbitales Schütteln, 240 U/min und 2 mm Auslenkung; *gain* 80; Laserstrahl 2,0 mm. Während der dreitägigen Inkubation wurde in Intervallen von 20 min die Lichtstreuung (Maß für die Zelldichte) bestimmt. Die Dokumentation der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software *NEPHELOstar Control* (BMG Labtechnologies). Mit dem Programm *Microsoft® Office Excel 2003* wurden die Daten ausgewertet.

2.3.3 Mikroskopische Analyse der Mitochondrienmorphologie

Zur Visualisierung der Mitochondrienmorphologie wurden die zu untersuchenden Hefestämme mit dem Plasmid pYX142-mtGFP transformiert (siehe Tabelle 2.1) und auf MM-Platten ohne Leucin selektiert. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Transformanten bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ü. N. in MM kultiviert. Für die Analysen von atmenden Hefen wurden die Kulturen für weitere 6 h in YPE inkubiert. Jeweils

10 μl Hefesuspension wurden auf einen Objektträger pipettiert und sofort in eine 10 μl Agaroselösung eingebettet. Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop *BZ-8100* (Keyence) mit einem 100-fachen Objektiv, einer 10-fachen okularen Vergrößerung und dem GFP-BP-Filter bzw. im Phasenkontrast. Die Bearbeitung der Einzelaufnahmen und die Erstellung der *overlays* erfolgten mit dem Programm *Biozero Analyzer 2.5*, wobei das *tool: haze reduction* verwendet wurde.

Agaroselösung

0,5 % (w/v)	Agarose (Biozym, mit niedriger Schmelztemperatur)
5 mM	Glukose
5 mM	Tris/HCl pH 7,4

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA-Isolation

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) [145]

3 ml einer ü. N.-Kultur (LB_{amp}) wurden bei 13.000 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl Tris-Glukose-Puffer resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl frisch hergestellter NaOH-SDS-Lösung erfolgte die Lyse der Zellen für 5 min auf Eis. Um das Lysat zu neutralisieren, wurden 150 μl Natriumacetat (3 M, pH 4,8) hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und Proteine bei 13.000 xg für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. 300 μl des Überstandes wurden zum Abbau von RNA mit 1 μl Ribonuklease A (10 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 210 μl Isopropanol zugesetzt und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (18.000 xg, 20 min, RT) wurde das Nukleinsäure-Pellet mit 70-%igem (v/v), eiskalten Ethanol gewaschen, anschließend in einer Vakuumzentrifuge (*Concentrator 5301*, Eppendorf) bei 30 °C getrocknet und final in 40 μl Tris/HCl (5 mM; pH 7,4; 60 °C) gelöst und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

Tris-Glukose-Puffer

25 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	Glukose
10 mM	EDTA pH 8,0

NaOH-SDS-Lösung

200 mM	Natriumhydroxid
1 % (w/v)	SDS

Plasmid-Präparation mit dem Kit *Plasmid Miniprep*TM - *Classic*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus einer *E. coli* ü. N.-Kultur für die Langzeitlagerung oder Sequenzierung wurde mit dem Kit *Plasmid Miniprep*TM - *Classic* (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer 10 ml ü. N.-Kultur wurden bei 3.500 xg für 5 min gerntet und mit 1 ml dH₂O gewaschen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Glasperlen (0,25 - 0,5 mm Durchmesser, bis kurz unterhalb der 500 µl Markierung gefüllt) überführt. Nach 2-minütigem kräftigen Vortexen wurden die Zellen auf Eis gestellt bis die Glasperlen sedimentierten. Der Überstand mit dem aufgebrochenen Zellmaterial wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 275 µl Ammoniumacetat (7 M, pH 7,0) versehen, bei 65 °C für 5 min und anschließend auf Eis für weitere 5 min inkubiert. Danach wurden 500 µl Chloroform hinzugegeben und die entstehenden Phasen gemischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 13.000 xg wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Abbau von vorhandener RNA wurde der Überstand mit 1 µl Ribonuklease A (10 mg/ml) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 ml Isopropanol für 5 min bei RT. Die gefällte DNA wurde pelletiert (5 min, 13.000 xg), mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und in der Vakuumpzentrifuge (*Concentrator 5301*, Eppendorf) getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 50 µl Tris/HCl (5 mM; pH 7,4; 60 °C) aufgenommen.

Lysepuffer

100 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	EDTA pH 8,0
10 % (w/v)	SDS

2.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektrophotometer *NanoDrop*[®] *ND-1000* (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Jeweils 1 µl Probe wurde zur Messung verwendet und mit der Software *NanoDrop V3.1.2 - Nucleic Acids* analysiert.

2.4.3 DNA-Amplifikation

Short Flanking Homology Polymerasekettenreaktion (SFH-PCR)

Mit Hilfe der SFH-PCR nach Wach *et al.* (1997) [146], wurden DNA-Fragmente für die Integration ins Hefegenom amplifiziert. Für die Amplifikation verschiedener Integrationskassetten dienten die folgenden Vektoren als *Template*:

Verwendung	Kassette	Vektor
HA-tag:	<i>3HA-Sphis5⁺</i>	pUZV108
	<i>3HA-KIURA3</i>	pUC19-3HA-URA
cMyc-tag:	<i>9cMyc-Sphis5⁺</i>	pGA2254
TAP-tag:	<i>TAP-KIURA3</i>	pBS1539
Deletionskassette:	<i>KIURA3</i>	pBS1539

Um die gewünschte Integration ins Hefegenom zu gewährleisten, wurden für die SFH-PCR *Primer* verwendet, die 5'-seitig komplementär zur spezifischen Integrationsstelle und 3'-seitig komplementär zum *Template* waren (siehe Abschnitt 2.2). Folgende Komponenten wurden für eine PCR-Reaktion verwendet:

Komponente	eingesetzte Menge
5x <i>Phusion</i> [®] HF-Puffer (inkl. 7,5 mM MgCl ₂)	10 µl
Plasmid-DNA	ca. 50 ng
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1 µl
<i>forward Primer</i> (100 pmol/µl)	0,5 µl
<i>reverse Primer</i> (100 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Phusion</i> [®] DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O	ad. 50 µl

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen im *Thermocycler* (*Primus 25 advanced*, Peqlab) durchgeführt:

initiale Denaturierung:	98 °C	5 min	
Denaturierung:	98 °C	1 min	
Annealing:	Primer-abhängig (*)	1 min	10 Zyklen
Elongation:	72 °C	Amplifikat- u. Polymerase-abhängig (**)	
Denaturierung:	98 °C	1 min	
Annealing:	Primer-abhängig (*)	1 min	30 Zyklen
Elongation:	72 °C	Amplifikat- u. Polymerase-abhängig (**)	
terminale Elongation:	72 °C	5 min	
Abkühlung & Lagerung:	10 °C		

(*) Die *Annealing*-Temperatur eines *Primers* hängt vom prozentualen Anteil der Basen Guanin und Cytosin (GC) in der Primersequenz sowie dessen Länge (PL) ab. Sie lässt sich näherungsweise nach folgender Formel berechnen (siehe www.eurofinsdna.com - FAQs Products & Services / Oligonukleotide):

$$T_a [^{\circ}\text{C}] = 59,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC} \% - 650/\text{PL}$$

Für die ersten 10 Zyklen wurden nur die zum *Template* komplementären Bereiche der *Primer* und für die folgenden 30 Zyklen die kompletten *Primer*-Sequenzen in die Berechnung einbezogen.

(**) Die Elongationszeit berechnet sich aus der Amplifikatlänge und der Syntheserate der verwendeten DNA-Polymerase. In dieser Arbeit wurde die *Taq* bzw. *Phusion* DNA-Polymerase mit einer Syntheserate von etwa 1.000 bzw. 2.000 Nukleotiden pro min verwendet.

Diagnostische PCR

Zum Nachweis der korrekten Integration eines spezifischen DNA-Fragmentes in das Hefegenom wurde die diagnostische PCR eingesetzt. Als *Template* wurde genomische DNA des entsprechenden Transformanden genutzt, welche nach der unter 2.4.1 beschriebenen Methode isoliert wurde. Folgende Komponenten wurden für eine PCR-Reaktion verwendet:

Komponente	eingesetzte Menge
10x <i>Taq</i> -Puffer (ohne MgCl ₂)	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 μ l
genomische Hefe-DNA	ca. 50 ng
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1 μ l
<i>forward Primer</i> (100 pmol/ μ l)	0,5 μ l
<i>reverse Primer</i> (100 pmol/ μ l)	0,5 μ l
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l
dH ₂ O	ad. 50 μ l

Die PCR-Reaktionen erfolgten analog zur SFH-PCR, wobei es sich bei der diagnostischen PCR um eine einstufige PCR mit 45 Zyklen handelte. Für die *Taq* DNA-Polymerase wurde eine Denaturierungstemp. von 95 °C gewählt.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse von PCR-Produkten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Die Auftrennung der DNA-Amplifikate nach ihrer Molekülgröße erfolgte in 0,8 %-igen (w/v) Agarose-Gelen mit 1x TBE bzw. 1x TAE (falls die Proben anschließend aus dem Gel isoliert und weiter verwendet werden sollten) als Elektrophorese-Puffer. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1x Elektrophorese-Puffer geschmolzen und auf ca. 60 °C abgekühlt. Vor dem Gießen wurden 40 ml Gel mit 10 μ l *RedSafe*TM (4000x) versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versehen und zusammen mit einem Größenstandard (*Eco*RI und *Hind*III gespaltene λ -DNA, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120 V Gleichspannung in horizontalen Gelelektrophorese-Systemen (*PerfectBlue*TM *Mini S* bzw. *L*, Peqlab). Die DNA wurde

mit einem UV-Transilluminator (*AlphaImager HP*, Biozym) bei einer Wellenlänge von 365 nm visualisiert.

10x TBE-Puffer

0,9 M	Tris-Borat
20 mM	EDTA pH 8,0

50x TAE-Puffer

2 M	Tris
1 M	Eisessig
50 mM	EDTA pH 8,0

6x DNA-Ladepuffer

10 mg	Bromphenolblau
1 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
1,7 ml	Glycerin 87 %
ad. 5 ml	dH ₂ O

2.4.5 DNA-Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Um im Anschluss einer SFH-PCR die gewünschte DNA-Integrationskassette von eventuell auftretenden unspezifischen Amplifikaten sowie von den PCR-Komponenten zu trennen bzw. zu reinigen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.4.4) durchgeführt. Das Fragment der gewünschten Länge wurde unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gelblock wurde mit dem *Zymoclean[®] Gel DNA Recovery Kit* (ZymoResearch) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.6 Transformation

Transformation von *E. coli*

Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer *E. coli* ü.N.-Kultur inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Zum Ernten der Zellen wurde die Kultur auf Eis für 30 min gekühlt und mit 3.500 xg bei 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Danach folgten zwei Waschschriffe mit eiskaltem dH₂O und anschließend einer mit 10 %-igem Glycerin (je 200 ml). Danach wurden die Zellen in 1 ml (Endvolumen) 10 %-igem Glycerin aufgenommen, wobei die Zelldichte mindestens 3 x 10¹⁰ Zellen/ml betragen sollte. Die Zellsuspension wurde in 50 µl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation wurde für die Transformation von Plasmid-DNA angewandt. Dazu wurden die elektrokompententen *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Zu einer 50 μl Zellsuspension wurden ca. 1 μg Plasmid-DNA gegeben, gut gemischt, für ca. 1 min auf Eis belassen und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Plattenabstand 0,2 cm; Bio-Rad) überführt. Mit Hilfe des *Gene Pulser II* (Bio-Rad) wurde ein Impuls mit den Einstellungen: Spannung: 2,5 kV, Kapazität: 25 μF , Widerstand: 200 Ω ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (13.000 xg, 30 s, RT). 800 μl des Überstandes wurden verworfen. Die Zellen im Pellet wurden in den restlichen 200 μl resuspendiert und dann auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und bei 37 °C ü. N. kultiviert.

SOC-Medium

10 mM	Natriumchlorid
2,5 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Magnesiumsulfat
20 mM	Glukose
2,0 % (w/v)	Pepton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

Transformation von *S. cerevisiae*

Transformation von Integrationskassetten

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit PCR-Fragmenten, die ins Hefegenom integriert werden sollten, erfolgte nach dem Protokoll der *High efficiency LiAc transformation* von Gietz *et al.* (2002) [147]. Dabei wurden 50 ml YPD mit einer ü. N.-Vorkultur des zu transformierenden Hefestammes angeimpft, so dass sich eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 einstellt. Nachdem eine Zellzahl von etwa 2 x 10⁷ Zellen/ml (entspricht einer OD₆₀₀ von ca. 2) erreicht wurde, erfolgte die Zellernte bei 3.500 xg für 5 min. Anschließend wurde das Zellpellet zuerst mit ddH₂O, danach mit 1 ml LiAc (100 mM) gewaschen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (15 s, 13.000 xg). Das Pellet wurde in 400 μl LiAc (100 mM) aufgenommen und zu je 50 μl aliquotiert. Pro Transformation wurde ein Aliquot verwendet. Die Aliquots wurden für 15 s bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand verworfen. Die Heringsspermien-DNA wurde für 5 min bei 100 °C zu Einzelstrang-DNA (ss-DNA) denaturiert und unverzüglich auf Eis gestellt. Zu den Zellpellets wurden in der angegebenen Reihenfolge folgende Komponenten hinzugegeben:

240 μ l	PEG 3350 (50 % (w/v))
36 μ l	Lithiumacetat (LiAc) (1 M)
10 μ l	ss-DNA (10 mg/ml; denaturiert)
x μ l	zu transformierende DNA (bis zu 74 μ l)
ad. 360 μ l	ddH ₂ O

Nachdem der Reaktionsansatz gemischt wurde, erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 40 min im Thermomixer (Eppendorf). Nach Sedimentation des Transformationsansatzes (15 s, 13.000 xg) wurden die Zellen in 100 μ l ddH₂O resuspendiert, auf Selektionsplatten (MM siehe Abschnitt 2.3.1) ausgespatelt und bei 30 °C für zwei bis drei Tage inkubiert.

Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde die verkürzte LiAc-Methode nach Schiestl und Gietz (1989) [148] angewandt. Die dafür verwendeten Hefezellen wurden in Vollmedium angeimpft und ü. N. bei 30 °C inkubiert. Die Zellen von 2 ml dieser Kultur wurden bei 3.500 xg für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend mit 500 μ l dH₂O gewaschen. In der angegebenen Reihenfolge wurden 10 μ l ss-DNA (diese wurde zuvor bei 100 °C für 5 min denaturiert), 1 μ g Plasmid-DNA und 500 μ l PEG-LiAc-Gemisch auf das Zellpellet gegeben und gemischt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 15 min bei 30 °C und nachfolgend für 15 min bei 42 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.500 xg für 5 min vom Überstand getrennt. Das Zellpellet wurde in 100 μ l dH₂O aufgenommen und auf MM-Platten mit den entsprechenden Supplementen ausgespatelt.

ss-DNA

10 mg/ml	Heringssperma-DNA
----------	-------------------

PEG-LiAc-Gemisch

0,1 M	Lithiumacetat (LiAc)
10 mM	Tris/HCl pH 5,5
1 mM	EDTA pH 8,0
40 % (w/v)	PEG 3350

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Isolation von Gesamtprotein aus *S. cerevisiae*

Zur Proteinisolation aus Hefezellen wurden die Hefen aus 5 ml einer ü. N.-Kultur geerntet (5 min, 3.500 xg, RT). Das Zellpellet wurde mit 1 ml dH₂O gewaschen und in 500 μ l MTE-Puffer resuspendiert. Ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde bis knapp unterhalb der 500 μ l

Markierung mit Glasperlen (0,25 - 0,5 mm Durchmesser) gefüllt. Die resuspendierten Zellen wurden zu den Glasperlen gegeben, intensiv 5 min gevortext bzw. in der Kugelmühle (*MM 200, Retsch*) bei 30.000 Hz mechanisch aufgeschlossen. Danach sedimentierten die Glasperlen auf Eis. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Glasperlen mit 400 μ l frischem MTE-Puffer gespült. Die Überstände wurden miteinander vereinigt und das Zellmaterial bei 3.500 xg für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die zu analysierenden Proteine der Hefezelle.

MTE-Puffer

650 mM	Mannitol
20 mM	Tris/HCl pH 7,6
1 mM	EDTA pH 8,0
1 mM	AEBSF (frisch zugesetzt)
1x	PI-Mix (frisch zugesetzt)

2.5.2 Präparation der Mitochondrienfraktion aus *S. cerevisiae*

Um die Mitochondrien aus *S. cerevisiae* zu isolieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen durch die eingesetzten Kulturvolumina, die Art des Zellaufschlusses, die Länge des Isolationsprozesses sowie in der Reinheit der präparierten Mitochondrien. Mechanisch isolierte Mitochondrien wurden für die eindimensionalen posttranslationalen Modifikationsuntersuchungen sowie für die *Tandem Affinity Purification* (TAP) genutzt. Für alle anderen Untersuchungen wurden enzymatisch isolierte Mitochondrien verwendet, die deutlich weniger zytoplasmatische Verunreinigungen aufweisen. Durch die enzymatische Isolation können v. a. funktionell intakte Mitochondrien gewonnen werden, was für die Funktionalitätsuntersuchungen von besonderer Bedeutung war.

Mechanische Methode - Analytischer Maßstab

Bei der mechanischen Isolation der Mitochondrien wurde analog dem Vorgehen zur Isolation der Gesamtproteine verfahren (siehe Abschnitt 2.5.1). Im Unterschied dazu wurde der finale Überstand zur Abtrennung der Mitochondrien erneut zentrifugiert (12.000 xg, 15 min, 4 °C). Das Mitochondrienpellet wurde anschließend nochmals mit 500 μ l MTE-Puffer gewaschen und schließlich in 50 μ l MTE-Puffer aufgenommen.

Mechanische Methode - Präparativer Maßstab

Um den Ertrag mechanisch isolierter Mitochondrien zu steigern, wurde das Kulturvolumen entsprechend erhöht. Dazu wurden 10 ml YPD mit einem Hefestamm inokuliert

und ü. N. bei 30 °C kultiviert. Diese Flüssigkultur wurde in 100 ml YPE überführt und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur zu 2l YPE im Schikanekolben gegeben und erneut ü. N. kultiviert.

Die Hefezellen wurden durch 5 min Zentrifugation (3.500 xg) geerntet und mit dH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml MTE-Puffer (siehe Abschnitt 2.5.1) resuspendiert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen, welches ca. zu einem Drittel mit Glasperlen gefüllt war, überführt. Anschließend wurden die Hefezellen durch 5-minütiges Vortexen aufgeschlossen. Nach dem Sedimentieren der Glasperlen wurde der Überstand in ein Falcon überführt, die Glasperlen mit 15 ml MTE-Puffer gespült und die Überstände vereint. Die nachfolgenden Schritte waren identisch zur mechanischen Isolation von Mitochondrien aus kleineren Kulturvolumina. Das finale Mitochondrienpellet wurde in 1 ml MTE-Puffer aufgenommen und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.5.5) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Enzymatische Methode

Die enzymatische Mitochondrienisolation wurde nach der Beschreibung von Daum *et al.* (1982) [149] mit Kulturvolumina von 1- 2l durchgeführt. Zunächst wurde ein Hefestamm in 10 ml YPD angeimpft, für ca. acht Stunden bei 30 °C im Schikanekolben inkubiert und anschließend für eine ü. N.-Kultivierung mit YPE auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurden erneut 50 ml YPE hinzugegeben und für weitere acht Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden anschließend 1 oder 2l YPE im 5l Schikanekolben inokuliert und final ü. N. inkubiert.

Nach der Kultivierung der Hefestämme erfolgte die Zellernte und anschließendes Waschen des Zellpellets mit dH₂O bei 3.500 xg für jeweils 3 min. Nach der Bestimmung des Zellnaßgewichtes (ZNG) wurde das Zellpellet zur Reduktion mit Puffer A (Puffer A [ml] = 2x ZNG [g]) und DTT (DTT [mg] = 1,54 x Puffer A [ml]) versetzt und 10 min bei 30 °C inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend bei 3.500 xg für 5 min abzentrifugiert und zweimal mit ca. 150 ml Puffer C gewaschen. Die darauffolgende Sphäroblastierung erfolgte durch Zugabe von Puffer B (Puffer B [ml] = ZNG [g] / 0,15) und Zymolyase-20T (Zymolyase [mg] = 2x ZNG [g]) und einer Inkubation für 45 min bei 30 °C.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Nach Pelletierung der Sphäroblasten bei 3.500 xg für 5 min und zweimaligem Waschen mit Puffer C erfolgte ein Zellaufschluss im *Dounce*-Homogenisator (15 ml, Wheaton), wobei die Sphäroblasten in ca. 7,5 ml Puffer D aufgenommen wurden. Nach 25x *pottern* wurde das Homogenat bei 3.500 xg für 5 min abzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt.

Aus den gesammelten Überständen wurden die Mitochondrien bei 12.000 xg für 10 min pelletiert. Von dem Überstand (Zytoplasmafraktion) wurde für Lokalisationsstudien

1 ml abgenommen. Das Mitochondrienpellet wurde in 7,5 ml Puffer D resuspendiert und durch Zentrifugation bei 3.500 xg für 5 min von restlichen Zellbestandteilen befreit. Der Mitochondrien enthaltende Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 12.000 xg für 10 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Mitochondrienpellet in 200 μ l Puffer D aufgenommen.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.5.5) wurden jeweils 5 μ l der Mitochondriensuspension sowie der Zytoplasmafraktion verwendet. Die gewonnen Proben wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer A

100 mM Tris/SO₄²⁻ pH 9,4

Puffer B

1,2 M Sorbitol
20 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7,4

Puffer C

1,2 M Sorbitol Lagerung bei 4 °C

Puffer D

650 mM Sorbitol
10 mM Tris/HCl pH 7,4
1 mM AEBSF (frisch zugeben)
1x PI-Mix (frisch zugeben) Lagerung bei 4 °C

2.5.3 Stufengradienten-Zentrifugation von Mitochondrien

Zur Entfernung von Kontaminationen (Zytoplasma und Mikrosomen) der enzymatisch isolierten Mitochondrienfraktion erfolgte eine Saccharose-Gradientenzentrifugation nach Meisinger *et al.* (2000) [150]. Dafür wurden die unter Kapitel 2.5.2 beschriebenen, isolierten Mitochondrien in 100 μ l SEM-Puffer resuspendiert und auf einen Saccharose-Stufengradienten gegeben. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge (*Optima Max*, Rotor *MLS-50*, Beckmann) bei 35.000 U/min (entspricht 134.000 xg) für 60 min bei 4 °C.

Der Gradient wurde zuvor auf Eis in einem 5 ml Ultrazentrifugenröhrchen nach folgenden Angaben geschichtet, wobei mit der größten Saccharosekonzentration am Boden des Röhrchens begonnen wurde:

- 0,86 ml 15 % (w/v) Saccharose in EM-Puffer
- 0,86 ml 23 % (w/v) Saccharose in EM-Puffer
- 2,30 ml 32 % (w/v) Saccharose in EM-Puffer
- 0,86 ml 60 % (w/v) Saccharose in EM-Puffer

Nach der Zentrifugation befand sich (durch die rötlich-gelbe Farbe gut sichtbar) die Mitochondrienfraktion in der Zwischenschicht der 60 und 32 %-igen Saccharose. Diese Fraktion wurde abpipettiert und mit dem dreifachen Volumen SEM-Puffer verdünnt. Durch eine Zentrifugation bei 12.000 xg für 10 min bei 4 °C wurden die Organellen pelletiert und anschließend erneut in 100 µl SEM-Puffer resuspendiert. Die Stufengradienten-Zentrifugation wurde wiederholt, um den Reinigungseffekt zu verstärken. Abschließend wurden die Mitochondrien in 200 µl Puffer D resuspendiert, aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert bzw. sofort für Analysen verwendet.

SEM-Puffer

250 mM	Saccharose
1 mM	EDTA pH 8,0
10 mM	MOPS pH 7,2

EM-Puffer

1 mM	EDTA pH 8,0
10 mM	MOPS pH 7,2

2.5.4 NaCl-Behandlung von Mitochondrien

Periphere Membranproteine können über elektrostatische oder ionische Wechselwirkungen (WW) mit Membranen bzw. Membranproteinen assoziiert sein. Mit Hilfe von hohen Salzkonzentrationen können diese WW aufgehoben und die peripheren Proteine in Lösung gebracht werden. Somit können z. B. zytoplasmatische Proteine, die mit der mt OM assoziiert vorliegen, entfernt werden.

Für die Lokalisationsnachweise der OM-Proteine wurde eine Salz-Behandlung durchgeführt. Für alle anderen Untersuchungen wurde darauf verzichtet, um diese WW der OM-Proteine mit nicht-mitochondrialen Proteinen zu erhalten.

Für die NaCl-Behandlung wurden jeweils 20 µg der Gradienten-gereinigten Mitochondrien in 1 ml NaCl (1 M in Puffer D, siehe Abschnitt 2.5.2) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 xg für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand mit TCA (siehe Kapitel 2.5.6) gefällt und das Pellet in SEM-Puffer (2.5.3) gewaschen. Abschließend wurden beide Proben in 1x Lämmli-Ladepuffer (2.5.9) aufgenommen und bei 95 °C für 5 min gekocht.

2.5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *DCTM Protein Assay* (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers. Für das Erstellen der Eichkurve wurde BSA verwendet.

2.5.6 Proteinfällung

Um lösliche Proteine aus Lösungen zu fällen, wurde zum einen die Trichloressigsäure (TCA) und zum anderen die Methanol-Chloroform-Fällung angewandt.

TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung von Proteinen [151] wurde TCA (100 % (w/v)) mit einer Endkonzentration von 10 % zur Lösung gegeben, gut gemischt und ü. N. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine bei 18.000 xg (30 min, 4°C) pelletiert, mit $800\ \mu\text{l}$ -20°C kaltem, 80 %-igem (v/v) Aceton gewaschen und erneut bei 18.000 xg für 15 min zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschrattes wurde das Proteinpellet in der Vakuumzentrifuge (*Concentrator 5301*, Eppendorf) getrocknet und in 1x Lämmli-Ladepuffer (siehe 2.5.9) aufgenommen. Durch verbleibende TCA-Reste konnte es zu einem Farbumschlag des pH-Indikators Bromphenolblau von blau zu gelb kommen. In diesem Fall wurde, bis zu einem Umschlag nach blau, mit Tris-Base (1 M, pH 12,5) titriert. Die Proben wurden für eine anschließende Proteinauftrennung für 5 min bei 95°C denaturiert und reduziert.

Methanol-Chloroform-Fällung

Die Methanol-Chloroform-Fällung erfolgte nach dem Protokoll von Wessel und Flügge (1984) [152] bei RT. Die proteinhaltige Lösung wurde mit dem vierfachen Volumen an Methanol und dem einfachen Volumen an Chloroform versetzt und gut gemischt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens dH_2O wurde 1 min gevortext und zur Phasentrennung 1 min bei RT zentrifugiert (30 s, 13.000 xg). Die obere organische Phase wurde vorsichtig entfernt. Der restliche Ansatz wurde mit dem 3,5-fachen Volumen an Methanol versetzt und erneut kräftig gevortext und 2 min bei 13.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet wurde in der Vakuumzentrifuge (*Concentrator 5301*, Eppendorf) getrocknet und für anschließende Untersuchungen in 1x Lämmli-Ladepuffer (siehe 2.5.9) aufgenommen.

2.5.7 Proteinbehandlungen mit spezifischen Enzymen

Protease Behandlung von isolierten Mitochondrienfraktionen

Zur Klärung der Membrantopologie von Om45p-cMyc wurde die Sensitivität des Proteins gegenüber den Serinproteasen Trypsin (Sigma) und Proteinase K (Invitrogen oder Roth) analysiert.

Für diese Untersuchungen wurden frisch enzymatisch isolierte mt Proteine in Puffer D der enzymatischen Mitochondrienisolation (siehe Kapitel 2.5.2) à $25\ \mu\text{g}$ aliquotiert. Die

Proteasebehandlung erfolgte mit zunehmenden Konzentrationen der beiden Enzyme (von 0 bis 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Fall von Trypsin und von 0 bis 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Fall von Proteinase K) für jeweils 15 min auf Eis. In einem parallelen Ansatz wurden die gleichen Proben für Kontrollzwecke vor der Proteaseinkubation mit 1% (w/v) Triton X-100 lysiert. Die Aktivität der Proteasen wurde durch Zugabe der Protease-Inhibitoren AEBSF (1 mM) und PI-Mix (1x) gestoppt. Anschließend wurden die Proteinlösungen sofort mit Lämmli-Ladepuffer (2.5.9) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

λ Protein Phosphatase Behandlung

Mit dem Einsatz der λ Protein Phosphatase (λ -PP) von NEB wurde untersucht, ob es für die zu charakterisierenden Proteine Hinweise für posttranslationale Phosphorylierungen gibt.

λ -PP Behandlung mit anschließender eindimensionaler Proteinauftrennung

Mechanisch isolierte mt Proteine wurden à 20 μg aliquotiert, in 1x Phosphatasepuffer (mit 1x MnCl_2 versehen, NEB) aufgenommen, mit den Protease-Inhibitoren AEBSF (1 mM) und PI-Mix (1x) versetzt und mit 1 μl (400 U) λ -PP für 30 min bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollansatz wurde jeweils eine Probe vor der Phosphatasebehandlung mit den *Phosphatase Inhibitor Cocktails* I und II (100x verdünnt, Sigma) versehen. Nach der Dephosphorylierung wurden die Proben mit Lämmli-Ladepuffer (2.5.9) versetzt und durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C für die SDS-PAGE vorbereitet.

λ -PP Behandlung vor einer zweidimensionalen Proteinauftrennung

Für diese Analysen wurden enzymatisch isolierte und Saccharose-Gradienten-gereinigte Mitochondrien mit 4% Digitonin (Verhältnis Detergenz-/Proteinmenge von 4:1) in Lysepuffer für 10 min aus Eis inkubiert. Aus der Membran herausgelöste Proteine wurden nach Zentrifugation (18.000 xg, 15 min, 4 °C) aus dem Überstand entnommen, à 150 μg Ausgangsmaterial aliquotiert und mit der Methanol-Chloroform-Fällung (siehe Kapitel 2.5.6) präzipitiert. Die Dephosphorylierung erfolgte analog zu den oben beschriebenen Bedingungen mit 2 μl (800 U) λ -PP. Die Proteine wurden danach erneut mit Methanol-Chloroform gefällt und einer IEF - SDS-PAGE unterzogen (siehe Kapitel 2.5.10).

Lysepuffer

100 mM	Natriumchlorid
5 mM	6-Aminocaprinsäure
50 mM	Imidazol
1 mM	AEBSF
1x	PI-Mix

2.5.8 Protein-Interaktionsnachweise

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde die einstufige Co-Immunopräzipitation (Co-IP) sowie die zweistufige *Tandem Affinity Purification* (TAP) angewandt.

Co-IP

Für die Co-IP wurde das *NHS HP SpinTrap* Kit (GE Healthcare) verwendet. Jeweils 100 μl Sepharoselösung wurde auf eine Säule gegeben und die Lagerungslösung durch Zentrifugation (1 min, 200 xg) entfernt. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit je 400 μl eiskaltem Äquilibriumspuffer gewaschen. Zur Immobilisierung wurden jeweils 16 μg des cMyc-, HA- oder Por1p-Antikörpers in je 200 μl Kopplungspuffer zu den Sepharose-beads gegeben und für 60 min bei RT mit einem Drehrad (*Rotator SB3*, Stuart) inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Zentrifugation (1 min, 200 xg) von den beads entfernt. Verbleibende aktive Gruppen der Sepharose wurden durch folgendes Waschschemata mit einem ständigen Wechsel von hohem zu niedrigem pH geblockt:

- 3x Zugabe von 400 μl Puffer A, 1 min 200 xg
- 3x Zugabe von 400 μl Puffer B, 1 min 200 xg
- 2x Zugabe von 400 μl Puffer A, 1 min 200 xg
- 1x Zugabe von 400 μl Puffer A, 15 min bei RT im Drehrad inkubieren, 1 min 200 xg
- 3x Zugabe von 400 μl Puffer B, 1 min 200 xg
- 3x Zugabe von 400 μl Puffer A, 1 min 200 xg
- 3x Zugabe von 400 μl Puffer B, 1 min 200 xg

Während der Blockierung der Sepharose wurden jeweils 500 μg enzymatisch isolierte Mitochondrien mit 0,625 % (w/v) Laurylmaltosid (Verhältnis Detergenz-/Proteinmenge von 2,5:1) in 200 μl Lysepuffer für 10 min auf Eis lysiert. Membranfragmente wurden durch Zentrifugation (18.000 xg, 15 min, 4 °C) pelletiert. Jeweils 5 μl des Lysats wurden für die spätere SDS-PAGE entnommen und mit Lämmli-Ladepuffer (2.5.9) reduziert, denaturiert und bei -20 °C gelagert.

Die immobilisierten Antikörper wurden 3x mit 400 μl Lysepuffer ohne Detergenz zur Äquilibriumspuffer gewaschen. Zur Bindung des *Target*-Proteins und dessen Interaktionspartner, wurde das Mitochondrienlysats den Antikörpern hinzugefügt und für 60 min bei RT im Drehrad inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch anschließende Zentrifugation (1 min, 200 xg) entfernt. Zur Erhöhung der Spezifität wurden die Proben 5x mit je 400 μl Lysepuffer (mit 0,1 % (w/v) Laurylmaltosid) gewaschen.

Die Elution der Proteine erfolgte durch zweimalige Zugabe von je 300 μl Elutionspuffer, 10 minütiger Inkubation im Drehrad und anschließender Zentrifugation für 1 min bei

1.000 xg. Die Fällung des Eluats wurde mit der Methanol-Chloroform-Methode (siehe Kapitel 2.5.6) durchgeführt. Final wurden die Proteine in Lämmli-Ladepuffer ohne reduzierendes Agenz aufgenommen und bei nur 50 °C für 5 min erhitzt. Dieses Vorgehen sollte einem Ablösen der schweren Antikörperkette vorbeugen, da diese aufgrund ihres Molekulargewichts bei einer späteren *Western-Blot* Analyse stören würde.

Äquilibrierungspuffer

1 mM	Salzsäure
------	-----------

Kopplungspuffer

200 mM	Natriumhydrogencarbonat
500 mM	Natriumchlorid
pH 8,3	

Puffer A

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 M	Natriumchlorid
pH 8,0	

Puffer B

100 mM	Essigsäure
500 mM	Natriumchlorid
pH 4,0	

Lysepuffer

100 mM	Natriumchlorid
5 mM	6-Aminocapronsäure
50 mM	Imidazol pH 7,0
1 mM	AEBSF
1x	PI-Mix

Elutionspuffer

2 % (w/v)	SDS
-----------	-----

Analytische TAP

Die TAP-Methode wurde in Anlehnung an Puig *et al.* (2001) [153] und Rigaut *et al.* (1999)[154] durchgeführt. Katrin Mäbert etablierte in ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung diese Methode für Om14p-TAP [134]. An dieser Stelle sei das Vorgehen, der Vollständigkeit wegen, noch einmal dargestellt:

Da der TAP-tag durch die Zymolyasebehandlung der enzymatischen Mitochondrienisolation wahrscheinlich abgespalten wird [134, 153] mussten die Mitochondrien durch eine mechanische Präparation im präparativen Maßstab (siehe Kapitel 2.5.2) gewonnen werden. Um eine Degradation der Proteine zu unterbinden, wurden alle Schritte bei 4 °C

bzw. auf Eis durchgeführt.

500 μg mit Proteine wurden in 200 μl TAP-Puffer mit 1 % (w/v) Digitonin (Verhältnis Detergenz-/ Proteinmenge von 4 : 1) für 20 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation (20 min, 18.000 xg) wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde zu 50 μl IgG-SepharoseTM (GE Healthcare), die zuvor 3x mit TAP-Puffer gewaschen wurde, gegeben. Zur Bindung der TAP-getaggten Proteine an die IgG-beads wurde der Ansatz 2 h mit einem Drehrad (*Rotator SB3*, Stuart) inkubiert.

Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation (500 xg, 2 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschrte der *beads* mit 1 ml TAP-Puffer inklusive 0,1 % (w/v) Digitonin. Danach wurden die *beads* in 200 μl TAP-Puffer mit 0,1 % (w/v) Digitonin aufgenommen und mit 2 μl (20 U) AcTEVTM Protease (Invitrogen) versetzt. Der *Tobacco Etch Virus* (TEV) Protease-Verdau erfolgte für 2 h bei 16 °C im Thermoblock (Eppendorf).

Die IgG-SepharoseTM wurde im Anschluss abzentrifugiert (500 xg, 2 min). Der Überstand mit dem verkürzten Fusionsprotein Om14p-CBP und dessen interagierende Proteine wurde zu 50 μl , in Calmodulin-Puffer (mit 2 mM CaCl_2) äquilibrierter, Calmodulin-SepharoseTM gegeben. Die IgG-beads wurden ein zweites Mal mit 200 μl TAP-Puffer (inkl. 0,1 % (w/v) Digitonin) gewaschen und erneut sedimentiert. Der Überstand wurde ebenfalls zu den Calmodulin-beads gegeben. Danach wurde zu diesem Ansatz 600 μl Calmodulin-Puffer mit 7 mM CaCl_2 pipettiert. Die Bindung des Calmodulin-Bindepeptides (CBP) an die Calmodulin-SepharoseTM erfolgte während einer zweistündigen Inkubation im Drehrad.

Anschließend wurden die *beads* mittels Zentrifugation (500 xg, 2 min) sedimentiert. Die AcTEVTM Protease wurde durch drei Waschschrte mit jeweils 1 ml Calmodulin-Puffer (mit 2 mM CaCl_2) entfernt. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 30 μl 2x Lämmli-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.5.9) und einer Inkubation bei 95 °C für 5 min. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei RT wurde die Sepharose erneut sedimentiert. Der Überstand konnte für anschließende Proteinnachweise verwendet werden.

TAP-Puffer

100 mM	Natriumchlorid
20 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 mM	AEBSF
1x	PI-Mix

Calmodulin-Puffer

TAP-Puffer und:	1 mM	Imidazol
	1 mM	Magnesiumacetat
	10 mM	β -Mercaptoethanol (frisch hinzugegeben)
	0,1 % (w/v)	Digitonin

Präparative TAP

Für die massenspektrometrische Analyse des Om14p-TAP-Eluates wurde analog der analytischen TAP (siehe oben) verfahren. Alle Lösungen wurden jedoch mit dH₂O (Reinigungsgrad für HPLC geeignet, AppliChem) hergestellt und steril filtriert. Für den präparativen Maßstab wurden 4 mg mechanisch isolierte Mitochondrien lysiert. Zur Erhöhung der Effizienz wurden die Mitochondrien auf vier Ansätze à 1 mg verteilt und mit jeweils 100 µl IgG-SepharoseTM inkubiert.

Nach der zweistündigen Inkubation des Proteingemisches mit den Calmodulin-*beads* wurde dieses einmal mit 1 ml Calmodulin-Puffer mit 2 mM CaCl₂ und zweimal mit 1 ml Calmodulin-Puffer mit 0,1 mM CaCl₂ gewaschen. Anschließend wurde zu den *beads* 100 µl Elutionspuffer gegeben. Nach 2-minütigem Rotieren im Drehrad folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 500 xg. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Elution der Proteine von den *beads* wurde mit 200 µl Elutionspuffer wiederholt und die Rotationszeit auf 10 min verlängert. Die Proteine in den gesammelten Überständen wurden anschließend mit der Methanol-Chloroform-Methode (siehe Kapitel 2.5.6) gefällt.

Elutionspuffer

200 mM	Kaliumacetat pH 7,4
20 mM	Tris/HCl pH 7,4
20 mM	EGTA pH 7,9
1 mM	Imidazol
1 mM	Magnesiumacetat
10 mM	β-Mercaptoethanol (frisch hinzugegeben)
0,1 % (w/v)	Digitonin
1 mM	AEBSF
1x	PI-Mix

2.5.9 Eindimensionale (1D) Proteinauftrennungen**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) [155] angewandt.

30 %-ige Acrylamidlösung

29 % (w/v)	Acrylamid
1 % (w/v)	Bisacrylamid

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
-------	-----------------

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
-------	-----------------

Elektrodenpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

6x Lämmli-Ladepuffer

300 mM	Tris/HCl pH 6,8
10 % (w/v)	SDS
30 % (v/v)	Glycerin (87 %)
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
100 mM	DTT (frisch zugesetzt)

Die Proteinproben wurden mit Lämmli-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Proteinmarker wurde, wenn nicht anders angegeben, *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet. Die Gelläufe erfolgten im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V.

Herstellung von Standardgelen

Die Gelelektrophorese mit definierten Trenngelkonzentrationen erfolgte in vertikalen Doppelgelsystemen (*PerfectBlue™ Twin S* und *Twin ExW S*, Peqlab). Dabei wurden 12 oder 15 %-ige Trenngele in Kombination mit einem 4 %-igen Sammelgel verwendet. Das 8 %-ige Trenngel (*Spacer-Gel*) wurde für die 2D BN - SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.5.10) benötigt.

Komponente	Trenngele			Sammelgel
	8 %	12 %	15 %	4 %
30 %-ige Acrylamidlösung	2,6 ml	4 ml	5 ml	0,65 ml
dH ₂ O	4,8 ml	3,35 ml	2,35 ml	3,05 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	—
Sammelgelpuffer	—	—	—	1,25 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml

Herstellung von Gradientengelen

Für eine scharfe Bandentrennung im Größenbereich von ca. 10 bis 200 kDa wurden lineare Gradientengele mit einem 8-20 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel in einer *SE Ruby 600* Kammer (Amersham Biosciences) angefertigt. Die beiden Polyacrylamidlösungen des Trenngels wurden hierfür auf Eis vorbereitet. Anschließend wurden 13 ml der

8 %-igen Lösung in die Reservoirkammer des Gradientenmischers (*SG15*, Hoefer) und 13 ml der 20 %-igen Lösung in die Mischkammer gegeben. Das Gradientengel wurde mit einer Schlauchpumpe (*Reglo Digital*, Ismatec®) mit maximaler Pumpgeschwindigkeit von oben gegossen und zur Glättung der Gelkante vorsichtig mit ddH₂O überschichtet.

Komponente	Trenngel 8 %	Trenngel 20 %	Sammelgel 4 %
30 %-ige Acrylamidlösung	4 ml	10 ml	1,95 ml
dH ₂ O	7 ml	1 ml	9,15 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	—
Sammelgelpuffer	—	—	3,75 ml
10 % (w/v) SDS	150 μ l	150 μ l	150 μ l
10 % (w/v) APS	75 μ l	75 μ l	75 μ l
TEMED	7,5 μ l	7,5 μ l	15 μ l
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml	15 ml

2.5.10 Zweidimensionale (2D) Proteinauftrennungen

Mit 2D Proteinauftrennungen können effiziente Auftrennungen ganzer Proteome erzielt werden. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren genutzt.

Isoelektrische Fokussierung (IEF) - SDS-PAGE

Bei der 2D IEF - SDS-PAGE erfolgt zunächst eine Proteinauftrennung nach dem isoelektrischen Punkt, gefolgt von einer Separierung nach dem Molekulargewicht der Proteine. Diese Methode wurde nach Görg *et al.* (2000) [156] mit Chemikalien und Geräten von GE Healthcare durchgeführt.

Probenvorbereitung für die 1. Dimension

Die zu analysierenden mt Proteine (je Probe 150- 200 μ g) wurden in je 50 μ l IEF-Puffer mit 10 mM DTT für 10 min auf Eis aus den Membranen gelöst. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (13.000 xg, 10 min, 4 °C) vom nicht gelösten Material getrennt und mit je 200 μ l IPG-Puffer versetzt.

IEF-Puffer

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 % (w/v)	CHAPS
2 % (v/v)	Pharmalyte pH 3- 10

IPG-Puffer

IEF-Puffer und:	0,002 % (w/v)	Bromphenolblau in 50 mM Tris
	1,25 % (v/v)	<i>De-streak</i> Reagenz

1. Dimension - IEF

Die Proben wurden gleichmäßig in einen *Stripholder* pipettiert. Die *Immobiline DryStrip* Gele (13 cm, pH 3-10, nicht linear) wurden mit der Acrylamidseite nach unten vorsichtig in den *Stripholder* gelegt, so dass die Probenlösung luftblasenfrei und gleichmäßig über die gesamte Gellänge verteilt wurde. Anschließend wurde das Gel mit ca. 3 ml *Cover fluid* überschichtet. Ü.N. (mind. 12 h) quollen die Proben passiv ins Acrylamidgel bei RT ein.

Die IEF erfolgte im *Ettan IPGphor II* System mit 50 μ A pro Streifen und finalen 18 kWh in folgenden vier Schritten:

Schritt	Spannung	Zeit
1 (konstant)	500 V	1 h
2 (graduell)	1.000 V	1 h
3 (graduell)	8.000 V	2,5 h
4 (konstant)	8.000 V	0,75 h

Probenvorbereitung für die 2. Dimension

Nach der IEF wurde der Acrylamidstreifen für 15 min in 5 ml Äquilibriumspuffer mit 50 mg DTT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgt eine zweite Inkubation für 15 min mit 5 ml Äquilibriumspuffer inklusive 125 mg Iodacetamid.

Äquilibriumspuffer

75 mM	Tris/HCl pH 8,8
6 M	Harnstoff
29,3 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
0,002 % (w/v)	Bromphenolblau in 50 mM Tris

2. Dimension - SDS-PAGE

Der äquilibrierte Streifen wurde in einer *PerfectBlue™ Twin ExW S* Kammer (Peqlab) luftblasenfrei auf ein 15 %-iges Trenngel (siehe Kapitel 2.5.9) gelegt und in 0,5 %-iger (w/v) Agarose (in Elektrodenpuffer mit 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) eingebettet. Dabei wurde auch eine Tasche für den Proteinmarker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas) berücksichtigt. Die SDS-PAGE von zwei Gelen erfolgte ü. N. bei 10 V und 3 mA und anschließend für weitere 1,5 h bei 150 V und 60 mA.

2D Blue-Native (BN) - SDS-PAGE

Mit der 2D BN - SDS-PAGE werden Proteine im ersten Schritt unter nativen Bedingungen aufgetrennt, so dass funktionelle Proteinkomplexe erhalten bleiben. In der zweiten Dimension werden die Komplexuntereinheiten nach ihrem Molekulargewicht separiert. Die BN-PAGE erfolgte unter Standardbedingungen nach Schägger (2001) [157].

Gradientengel-Herstellung

Das Gießen des Gradientengels erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers (*SG15*, Hoefer), einem Rührer und einer Schlauchpumpe (*Reglo Digital*, Ismatec®). Es wurden vertikale Elektrophoresekammern der Firma Amersham Pharmacia Biotech (*mini VE complete*) verwendet. In dieser Arbeit wurden Trenngel mit einem Gradienten von 3–13 % Polyacrylamid in Kombination mit einem 3 %-igem Sammelgel angewandt, die auf Eis nach folgendem Schema hergestellt wurden:

Komponente	Trenngel 3 %	Trenngel 13 %	Sammelgel 3 %
40 %-ige Acrylamidlösung	0,375 ml	1,625 ml	0,375 ml
3x Gelpuffer	1,67 ml	1,67 ml	1,67 ml
Glycerin (87 %)	—	0,8 ml	—
HPLC-H ₂ O	2,933 ml	0,894 ml	2,925 ml
TEMED	2 μ l	1 μ l	5 μ l
10 % (w/v) APS	20 μ l	10 μ l	25 μ l
Gesamtvolumen	5 ml	5 ml	5 ml

40 %-ige Acrylamidlösung

38,95 % (w/v)	Acrylamid
1,05 % (w/v)	N,N-Methylen-bis-acrylamid

3x Gelpuffer

75 mM	Imidazol pH 7,0
1,5 M	6-Aminocaprinsäure

Für das Gießen des Gels wurden 3,25 ml der 3 %-igen Trenngellösung in die Reservoirkammer und 3,25 ml der 13 %-igen Trenngellösung in die Mischkammer des Gradientenmischers vorgelegt. Bei der Pumpe wurden folgende Parameter eingestellt: 1x Pumpleistung und Geschwindigkeitsstufe 10 (Pumpgeschwindigkeit ca. 750 μ l/min). Das Gel wurde von oben gegossen und mit HPLC-H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gradientengels wurde das 3 %-ige Sammelgel hergestellt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Die Auspolymerisierung erfolgte in feuchtem Milieu ü. N. bei RT.

Probenvorbereitung

Jeweils 200 μg enzymatisch isolierte und Gradienten-gereinigte Mitochondrien wurden in 20 μl Lysepuffer mit 4 % Digitonin (Detergenz- / Proteinmenge von 4 : 1) für 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (18.000 xg, 15 min, 4 °C) von nicht solubilisiertem Material abgetrennt, mit 4 μl 6x Ladepuffer versehen und auf das Gradientengel aufgetragen.

Lysepuffer

100 mM	Natriumchlorid
5 mM	6-Aminocaprinsäure
50 mM	Imidazol pH 7,0
1 mM	AEBSF
1x	PI-Mix

6x Ladepuffer

0,01 % (v/v)	Ponceau S
5 % (v/v)	Glycerin (87 %)

1. Dimension - BN-PAGE

Die Elektrophoresekammer wurde zur Kühlung in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gestellt und mit Anodenpuffer und Kathodenpuffer A gefüllt. Als Proteingrößenstandard wurde das *High molecular weight gel filtration calibration kit* (GE Healthcare) oder der native *NativeMark™ unstained* Proteinmarker (Invitrogen) verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde der Gellauf bei 90 V gestartet. Als die Lauffront des Ladepuffers die Hälfte des Gels erreicht hatte, wurde der Kathodenpuffer A durch den Kathodenpuffer B ersetzt und der Gellauf bei 10 V ü. N. fortgesetzt.

Anodenpuffer

25 mM	Imidazol pH 7,0	Lagerung bei 4 °C
-------	-----------------	-------------------

Kathodenpuffer A

50 mM	Tricin	
7,5 mM	Imidazol pH 7,0	
0,02 % (w/v)	Coomassie® Blue G-250	
pH 7,0 mit HCl einstellen		Lagerung bei 4 °C

Kathodenpuffer B

50 mM	Tricin	
7,5 mM	Imidazol pH 7,0	
0,002 % (w/v)	Coomassie® Blue G-250	
pH 7,0 mit HCl einstellen		Lagerung bei 4 °C

2. Dimension - SDS-PAGE

Die zweite Dimension erfolgte in Form einer modifizierten SDS-PAGE (Vgl. Kapitel 2.5.9). Dafür wurden die einzelnen Spuren der BN-PAGE mit einem Skalpell ausgeschnitten, für 30 min in frisch hergestelltem SDS-Puffer inkubiert und anschließend kurz mit HPLC-H₂O überspült. Die Gelstreifen wurden waagrecht zwischen die Glasplatten für die SDS-PAGE gelegt und die Gießapparatur nach Anleitung des Herstellers aufgebaut. Bis zu einer Höhe von ca. 1 cm unterhalb des Gelstreifens wurde ein 12 %-iges Trenngel eingefüllt und mit ddH₂O überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde bis zur Kante des Gelstreifens der ersten Dimension ein 8 %-iges *Spacer*-Gel gegossen und ebenfalls mit ddH₂O überschichtet. Der Gelstreifen wurde nach Festwerden des *Spacer*-Gels vorsichtig und möglichst luftblasenfrei auf das *Spacer*-Gel geschoben. Nach dem Entfernen des Wassers, wurde der Gelstreifen in 0,5 % (w/v) Agarose (in 2x Elektrophoresepuffer) eingebettet und eine Tasche zum Auftragen des Molekulargewichtsmarkers eingebracht. Die Elektrophorese wurde unter den bereits beschriebenen Bedingungen (siehe Kapitel 2.5.9) durchgeführt.

SDS-Puffer

1 % (w/v)	SDS
1 mM	AEBSF
5 mM	TCEP

2D Difference In Gel Elektrophoresis (2D DIGE)

Mit der 2D DIGE werden die Proteine ebenfalls in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteine vor der Auftrennung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden und dadurch bis zu drei Proben in einem Gel gleichzeitig analysiert und miteinander verglichen werden können. Dies reduziert nicht nur den Arbeitsaufwand sondern auch die Variation durch die Nutzung mehrerer Gele. In dieser Arbeit wurden sämtliche Arbeitsmaterialien für diese Methode sowie die Arbeitsanweisung *2D Electrophoresis* von GE Healthcare genutzt.

Probenvorbereitung

Pro zu analysierendem Hefestamm wurden 50 µg enzymatisch isolierte und zweifach Gradienten-gereinigte mt Proteine in 10 µl Lysepuffer mit 30 mM Tris (pH 8,5) für 30 min auf Eis lysiert. Parallel erfolgte das Koppeln der Proteine mit den Fluoreszenzfarbstoffen. Dazu wurde jeder Probe 1 µl CyTM-Farbstoff (Cy2TM, Cy3TM bzw. Cy5TM, 200 µM, gelöst in wasserfreiem DMF) zugegeben. Das Markieren mit den CyTM-Farbstoffen wurde durch Zugabe von 1 µl L-Lysin (10 mM) und Inkubation auf Eis für weitere 5 min gestoppt. Anschließend wurden pro Gel drei unterschiedlich markierte Proben miteinander

vermischt. Jeweils 100 μg mt Proteine wurden zusätzlich mit Lysepuffer solubilisiert und als nicht markierte Proteine zum markierten Probengemisch zur Erhöhung der Proteinmenge auf 450 μg hinzugegeben. Der Ansatz wurde final in 250 μl 2x IPG-Puffer aufgenommen.

Lysepuffer

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 % (w/v)	CHAPS

2x IPG-Puffer

Lysepuffer und:	2 mM	DTT
	4 % (v/v)	Pharmalyte pH 3-10
	0,004 % (w/v)	Bromphenolblau

1. Dimension - IEF

Die IEF für die 2D DIGE erfolgte analog zur 1. Dimension der IEF - SDS-PAGE (siehe Seite 46). Die hier verwendeten *Immobiline DryStrip* Gele hatten allerdings eine Länge von 24 cm und einen nicht linearen pH-Auftrennungsbereich von 3-11. Der Lauf sollte final mindestens 35 kWh in folgenden drei Schritten erreicht haben:

Schritt	Spannung	Zeit
1 (konstant)	200 V	1 h
2 (graduell)	1.000 V	2 h
3 (konstant)	8.000 V	6 h

Herstellung der SDS-Gele für die 2. Dimension

Für die 2. Dimension wurden bis zu sechs 12%-ige SDS-Polyacrylamidgele in einem *Ettan DALTsix Large Vertical* System nach Herstellerangaben von oben gegossen. Die Gele wurden mit 1%-igem SDS überschichtet und für mindestens 4 h zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

Komponente	Trenngel 12 %
40 % Acrylamid	135 ml
Trenngelpuffer	112,5 ml
10 % (w/v) SDS	4,5 ml
HPLC-dH ₂ O	195,6 ml
10 % APS	2,25 ml
TEMED	157,5 μl

40 %-ige Acrylamidlösung

38,95 % (w/v)	Acrylamid
1,05 % (w/v)	N,N-Methylen-bis-acrylamid

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
-------	-----------------

2. Dimension - SDS-PAGE

Vor dem Start der zweiten Dimension wurden die Gelstreifen direkt nach der IEF in Elektrodenpuffer (siehe SDS-PAGE, Seite 43) gespült, anschließend zunächst in je 10 ml Äquilibriumspuffer (siehe 2D IEF - SDS-PAGE, Seite 46) mit 100 mg DTT und final in je 10 ml Äquilibriumspuffer mit 250 mg Iodacetamid auf einem Schüttler für jeweils 15 min inkubiert.

Die IEF-Gelstreifen wurden auf die Trenngele der 2. Dimension luftblasenfrei aufgelegt und in 0,5 %-iger (w/v) Agarose (in Elektrodenpuffer mit 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) eingebettet. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 °C mit den angegebenen Puffern für zunächst 45 min mit 50 mA bzw. 2 W pro Gel und anschließend ü. N. mit 1 W pro Gel für ca. 16 h.

2x Kathodenpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

1x Anodenpuffer

25 mM	Tris pH 8,3
-------	-------------

Analyse der 2D DIGE-Gele

Für die Auswertung der 2D DIGE-Gele wurden alle drei Fluorophore eines Gels mit dem Fluoreszenzscanner (*Typhoon Trio*, GE Healthcare) visualisiert (100 µm Pixelgröße). Mit der *Software* (*ImageQuant 5.2*, Molecular Dynamics) wurde kontrolliert, dass bei allen drei *Laserscans* ungefähr gleich große Signalintensitäten im Bereich von 70.000 bis 90.000 a. u. erreicht wurden. Die Analysen der 2D DIGE-Gele hinsichtlich Proteinmengen erfolgte mit der *Software Delta2D 4.1* (Decodon).

Zur Demaskierung interessanter Proteine wurden die Gele nach dem *Scannen* mit colloidalem Coomassie® gefärbt (siehe Kapitel 2.5.11), die entsprechenden Protein-*Spots* mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (siehe Kapitel 2.5.12) identifiziert.

2.5.11 Proteinfärbungen im Polyacrylamid (PAA) -Gel

Colloidale Coomassie® - Färbung

Zur Visualisierung sämtlicher Proteine in einem SDS-PAA-Gel wurde eine modifizierte Proteinfärbung mit colloidalem Coomassie® nach Neuhoﬀ *et al.* (1988) [158] durchgeführt. Die Proteine in einem zu färbenden Gel wurden zunächst für mindestens 30 min fixiert und anschließend zwei bis drei Tage in der Färbelösung bei 4 °C inkubiert. Das Gel wurde mittels *Scannen* dokumentiert und gegebenenfalls getrocknet. Dafür wurde es zunächst mit dH₂O gewaschen, etwa 30 min in Trockenlösung inkubiert und anschließend im Gelrockner entwässert.

Fixierlösung

10 % (v/v)	Essigsäure
40 % (v/v)	Ethanol

5 % (w/v) Coomassie® Stammlösung

1 g	Coomassie® Blue G-250 in 20 ml ddH ₂ O lösen
-----	---

Färbe-Stammlösung

100 g	Ammoniumsulfat
12 ml	Phosphorsäure (85 %)
20 ml	Coomassie® Stammlösung (5 %)
ad. 1 l	ddH ₂ O

colloidale Coomassie® Färbelösung

1 l	Färbe-Stammlösung
250 ml	Methanol
gut mischen und anschließend filtern	

Trockenlösung

5 % (v/v)	Glycerin
20 % (v/v)	Ethanol

Färbung von glykosylierten Proteinen

Die Färbung glykosylierter Proteine in einem SDS-PAA-Gel erfolgte mit dem *Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Als Positivkontrolle diente der mitgeführte *CandyCane™ Glycoprotein Molecular Weight Standard* (Invitrogen).

2.5.12 Massenspektrometrie (MS)

Die Identifikation von unbekanntem Proteinen aus PAA-Gelen erfolgte mittels MS durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hoflack (*Biotechnology Center* der Technischen Universität Dresden). Zu untersuchende Proteinbanden oder *-spots* wurden (wie in Czupalla

et al. (2003) [159] beschrieben) aus dem entsprechenden PAA-Gel herausgeschnitten, gewaschen, *in-gel* reduziert, S-alkyliert und mit Trypsin (Promega) verdaut.

Matrixunterstützte Laserdesorption/ionisation mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF/TOF)

MALDI-TOF/TOF Messungen erfolgten mit dem *Ultraflex* Massenspektrometer (Bruker Daltonics). Die Aufnahme der Spektren und die Generierung der Peaklisten wurden analog zu Czupalla *et al.* (2006) [160] ausgeführt.

NanoLC-MS/MS

NanoLC-MS/MS Experimente wurden mit dem *UltiMate3000* nanoHPLC System (Dionex), welches mit einer *PepMap C18* analytischen Säule (3 μm , 100 \AA , 15 cm x 75 μm i. d.) ausgestattet und direkt mit der Nanoelektrosprayquelle (Proxeon) eines *LTQ Orbitrap XL* Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war, durchgeführt. Peptide wurden mit einem 80 min linearen Gradienten von 5–45 % Acetonitril in 0,1 % Ameisensäure bei 200 nl/min eluiert. Massenspektren wurden in einem Daten-abhängigen Modus mit einem MS Aufnahme-*Scan* (Auflösung von 60.000) in der *Orbitrap* erlangt. MS/MS-Spektren der acht stärksten Vorläuferionen wurden mit der *LTQ* gemessen.

MS-Datenauswertung

MS-Rohdaten wurden mit der *Proteome Discoverer 1.2.0.208* Software verarbeitet. Datenbankrecherchen wurden für MALDI-TOF/TOF mit der *in-house Mascot* Serverversion 2.1 (Matrix Sciences Ltd.) durchgeführt. Für die *LTQ Orbitrap XL* Daten wurde die *Proteome Discoverer* Anwendung mit *Sequest*-Algorithmus verwendet. Folgende Suchkriterien wurden festgelegt: (i) Taxonomie: *S. cerevisiae*; (ii) Enzymspezifität: Trypsin; (iii) Massengenauigkeit: 10 ppm für Vorläuferionenmassentoleranz (*Orbitrap*), 50 ppm für Peptidmassenfingerringdruck und 0,8 Da für Fragmentionenanalyse; (iv) fixe und variable Modifikationen: Cystein-Carbamidomethylierung, Methionin-Oxidierung und Asparagin- sowie Glutamin-Deamidierung; (v) maximal eine fehlende Schnittstelle; (vi) Datenbanken: NCBI und SwissProt.

2.5.13 *Western-Blot*

Transfer von Proteinen aus einem PAA-Gel auf eine PVDF-Membran

Nachdem die Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgte ein Transfer der Proteine mittels *semi-dry Western-Blot* auf eine PVDF-Membran (*Immobilon[®] -P*, Porengröße: 0,45 μm , Millipore).

Das Gel wurde vor dem Zusammenbau des *Blots* für ca. 10 min in Transferpuffer äquili-

briert. Die Membran wurde mit Methanol in einen hydrophoben Zustand versetzt und anschließend zusammen mit dem Filterpapier (Dicke: 1,5 mm, Roth) mit Transferpuffer getränkt. Auf die Anode der Blotapparatur (*PerfectBlue™ Sedec™ M*, Peqlab) wurden luftblasenfrei zuerst vier Lagen Filterpapier, dann die Membran, anschließend das SDS-Gel und abschließend wieder vier Lagen Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei maximal 25 V. Die angelegte Stromstärke berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Stromstärke [mA]} = \text{Fläche des SDS-Gels [cm}^2\text{]} \times 1,5 \text{ mA}$$

Transferpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	Tris
20 % (v/v)	Methanol
0,01 % (w/v)	SDS

Immunologischer Proteinnachweis mit Meerrettich-Peroxidase (*HRP*) gekoppelten Antikörpern

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer der Proteine für mindestens 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit schwenkenden Bewegungen für eine Stunde mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 2.5) bei RT inkubiert und danach dreimal 5 min lang mit TBS/T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem *HRP*-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2.5) für 30 min bei RT. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal 15 min lang in TBS/T gewaschen. Die Detektion wurde mit Hilfe des *Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System* sowie dem *Amersham™ Hyperfilm™ ECL* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers in der Dunkelkammer durchgeführt.

TBS/T

20 mM	Tris/HCl pH 7,6
137 mM	Natriumchlorid
0,1 % (v/v)	Tween 20

Blockierungslösung

5 % (w/v)	Magermilchpulver in TBS/T
-----------	---------------------------

Immunologischer Proteinnachweis mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern

Die Inkubation mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern erfolgte analog der mit *HRP*-gekoppelten Antikörpern, zunächst mit einem Protein- bzw. *tag*-spezifischen primären Antikörper, gefolgt von einem *Cy5™*-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2.5). Die Detektion sowie die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde mit dem

Fluoreszenzscanner (*Typhoon Trio*, GE Healthcare) und der Software (*ImageQuant 5.2*, Molecular Dynamics) durchgeführt. Zur Klärung, ob Signalunterschiede einer statistischen Signifikanz unterliegen, wurde ein zweiseitiger t-Test gegen eine Konstante [161] mit folgender Formel durchgeführt:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s} \sqrt{n} \quad \text{und} \quad |t| > t(FG, \alpha) \rightarrow \text{Ablehnung von } H_0$$

\bar{x} ... arithmetisches Mittel der Stichprobe

FG ... Freiheitsgrad = n - 1

μ_0 ... Mittelwert der Kontrolle = 100 %

α ... gewünschtes Signifikanzniveau

s ... Standardabweichung

H_0 ... Nullhypothese ($\mu_{Test} = \mu_0$)

n ... Stichprobenumfang

Stripping von Membranen

Bevor eine Detektion mit einem weiteren Antikörper erfolgen konnte, wurden die bereits gebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Dafür wurde die Membran für 30 min bei 55 °C in *Stripping*-Puffer unter leichtem Schwenken im Hybridisierungsöfen (*Hybridizer HB-1.000*, UVP Laboratory Products) inkubiert und anschließend dreimal für 15 min mit TBS/T gewaschen. Danach konnte, wie oben beschrieben, die Membran erneut blockiert und mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden.

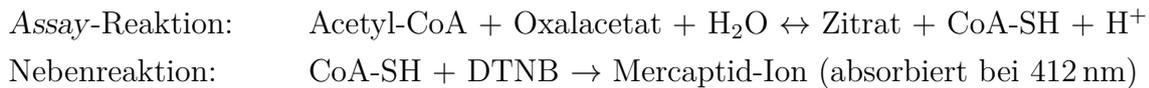
Stripping-Puffer

62,5 mM	Tris/HCl pH 6,7
2 % (w/v)	SDS
100 mM	β -Mercaptoethanol (frisch hinzugeben)

2.5.14 Bestimmung der Zitratsynthase-Aktivität

Die Aktivitätsmessung der Zitratsynthase erfolgte im Spektrophotometer *Infinite® 200* mit der Software *i-Control™ 1.1* (Tecan) bei 25 °C durch Messung der Konzentration von CoA-SH bei 412 nm in Anlehnung an Graybill *et al.* (2007) [162].

Je *well* einer transparenten 96-*well* Platte wurden 200 μ l TE-Puffer mit 10 μ l Oxalacetat (10 mM in TE-Puffer, pH 8), 30 μ l Acetyl-CoA (5 mM in TE-Puffer, pH 8) und 10 μ l DTNB (10 mM in 1 M Tris/HCl pH 8) versetzt. Durch die Zugabe von 10 μ l enzymatisch isolierten Mitochondrien (1 μ g/ μ l) wurde die Reaktion gestartet. Die Absorption bei 412 nm wurde in Intervallen von 20 s 5 min lang gemessen. Die linearen Kurvenanstiege gaben Auskunft über die Reaktivität der Zitratsynthase der jeweiligen Proben und dienten zur Normierung der ATP-Messung (siehe Kapitel 2.5.15).

**TE-Puffer**

50 mM	Tris/HCl pH 8
2 mM	EDTA pH 8

2.5.15 Nachweis von mt ATP

Die Messung von mt ATP erfolgte im Plattenlesegerät *Infinite[®] 200* mit der Software *i-ControlTM 1.1* (Tecan) bei 25 °C durch Messung der Lumineszenz. Das Lumineszenzsignal wurde hierbei durch das Kit *ATP Glow Juice* (kundenspezifische Anfertigung ohne Detergenz) der Firma PJK erzeugt.

In jedes zu messende *well* einer weißen 96-*well* Platte wurden 20 μl Mitochondrienpuffer sowie 5 μl enzymatisch isolierte Mitochondrien (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vorgelegt. Der *ATP Glow Juice* (inkl. dem Substrat D-Luciferin) wurde 10 min vor der Messung mit der *firefly* Luciferase versetzt. Nachdem jedem *well* 100 μl dieses Gemisches hinzugefügt wurden, erfolgte eine Lumineszenzmessung (10 Zyklen à 15 s). Zur Aktivierung der Atmungskette wurden innerhalb von 25 s je 0,6 μl β -NADH (100 mM) zu den Proben gegeben und weitere 10 Zyklen à 15 s gemessen. Danach erfolgte die Zugabe des ATP-Synthase-Substrates in Form von jeweils 0,6 μl ADP (1 mM) innerhalb von 25 s. Die für die Auswertung entscheidende Lumineszenzmessung wurde für 30 Zyklen à 10 s aufgenommen.

Die linearen Kurvenanstiege aus den ersten 2 min nach der ADP-Zugabe wurden mit Hilfe von *Microsoft[®] Office Excel 2003* ermittelt und prozentual vom Wildtyp (entspricht 100 %) angegeben. Die zuvor gemessene Reaktivität der Zitratsynthase (siehe Kapitel 2.5.14) der einzelnen mt Proben wurde als Normierungsgrundlage gewählt. Signifikanzberechnungen wurden analog zu Kapitel 2.5.13 durchgeführt.

Um die kurzen Messunterbrechungen von nur 25 s zu gewährleisten, wurden maximal fünf Proben gleichzeitig vermessen. Sämtliche Puffer und Reagenzien wurden mit ATP-freiem Wasser (PJK) hergestellt.

Assay-Reaktion:



Zur Evaluation des ATP-Assays wurden folgende Inhibitoren eingesetzt:

- Oligomycin (Endkonzentration 20 $\mu\text{l/ml}$)
- CCCP (Endkonzentration 0,4 mM)
- BKA (Endkonzentration 10 μM ; Mitochondrienpuffer pH 4)

Mitochondrienpuffer

650 mM	Sorbitol
10 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

Kapitel 3

Ergebnisse

Die mt OM von *S. cerevisiae* verfügt über vier abundante Proteine: Por1p, Tom70p, Om14p und Om45p [125–127]. Während die Porinpore (Por1p) und das Rezeptorprotein des TOM-Komplexes (Tom70p) bereits detailliert untersucht wurden, fehlen sämtliche Hinweise und experimentelle Belege zur Funktion von Om14p und Om45p. Ziel dieser Arbeit war es, Informationen über die beiden bisher funktionell unbekanntem mt Proteine Om14p und Om45p der Hefe *S. cerevisiae* zu erlangen.

3.1 Molekulare Charakterisierung von Om14p & Om45p

Da für die Proteine Om14p und Om45p keine authentischen Antikörper zur Verfügung standen, mussten für anschließende molekulare Charakterisierungen beide Proteine mit einem Epitop-*tag* versehen werden. Ein solcher *tag* kann N- oder C-terminal an ein Protein fusioniert werden. N-terminale Epitop-*tags* beeinflussen mit recht hoher Wahrscheinlichkeit den Proteinimport von mt Proteinen, da am N-Terminus häufig die mt Signalsequenzen, wie z. B. die MTS [163], lokalisiert sind. Zudem kann durch den Selektionsmarker einer N-terminal eingefügten Integrationskassette die Promotorregion beeinträchtigt werden. Obwohl bei einem Einsatz von C-terminalen *tags* nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Funktion, Membrantopologie sowie der Import von mt Proteinen beeinflusst wird [164–166], fiel die Wahl dennoch auf C-terminale Epitop-*tags*. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit [132] wurde der offene Leserahmen (ORF) von *OM14* bereits mit der kodierenden Sequenz für den dreifachen HA-*tag* C-terminal fusioniert. Der anschließend getestete Klon war allerdings in seiner Respirationsfähigkeit beeinträchtigt [132, Abb. 4.4]. Ein ebenfalls *OM14*-cMyc erzeugter Klon zeigte zwar keine Wachstumsbeeinträchtigungen [132, Abb. 4.4] dafür allerdings ein diskussionsanregendes SDS-PAGE-Separationsprofil sowie eine duale Lokalisierung des Fusionsproteins

[132, Abb. 4.5]. Dieses Phänomen könnte durch den großen (ca. 12 kDa) cMyc-tag in neunfacher Wiederholung im Gegensatz zum vergleichsweise kleinen Protein (14 kDa) hervorgerufen worden sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte Om14p erneut C-terminal mit dem dreifachen HA-tag (MW von ca. 3 kDa) fusioniert und ein in seinem Wachstum unbeeinträchtigter Klon identifiziert werden. Damit parallele Untersuchungen (wie z. B. Co-IPs) beider OM-Fusionsproteine erfolgen können, sollte Om45p (welches ein größeres MW von 45 kDa aufweist) mit dem cMyc-tag in neunfacher Wiederholung versehen werden.

3.1.1 Generierung von Fusionsproteinen

Der ORF von *OM14* wurde 3'-seitig mit der kodierenden Sequenz des HA-tags in dreifacher Wiederholung *in frame* fusioniert. Dazu wurde eine Integrationskassette, bestehend aus der Sequenz des Epitop-tags gefolgt von einer Terminatorsequenz sowie dem Selektionsmarker *Sphis5⁺*, aus dem Vektor pUZV108 (siehe Tabelle 2.1) mittels SFH-PCR amplifiziert. Die dafür genutzten *Primer* wiesen 5'-seitig 42 zur Integrationsstelle homologe Nukleotide auf, wobei das Stopcodon ausgelassen wurde. 17 Nukleotide am 3'-Ende der *Primer* waren komplementär zu den flankierenden Bereichen der Integrationskassette auf dem Plasmid (vgl. Tabelle 2.2). Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, gereinigt und in den haploiden Wildtypstamm BY4741 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf MM-Platten ohne Histidin. Der korrekte Einbau der Integrationskassette durch homologe Rekombination wurde mittels diagnostischer PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen einer Bachelorarbeit [144] generierte Linda Hickmann unter meiner Anleitung zudem den Stamm *OM45-cMyc* und den Hefestamm *OM14-HA OM45-cMyc*, der beide Fusionsproteine bildet.

Die Expression der jeweiligen Fusionsproteine wurde mittels *Western-Blot* Analyse in Gesamtproteinproben nachgewiesen (Abb. 3.1). Der schon vorhandene Stamm *OM14-cMyc* [132] wurde dabei als Vergleich mitgeführt.

Alle drei Fusionsproteine konnten im erwarteten Molekulargewichtsbereich (Om14p-cMyc: 27 kDa, Om14p-HA: 18 kDa und Om45p-cMyc: 57 kDa) durch eine Proteinbande in den entsprechenden Hefestämmen nachgewiesen werden. Da die Detektionssignale der Epitop-tags nicht im Wildtypstamm und jeweils auch nur in den entsprechenden Stämmen in der korrekten Höhe nachweisbar waren, handelt es sich um einen spezifischen Nachweis der Fusionsproteine.

Bevor die generierten Fusionsproteine molekular analysiert werden konnten, musste sichergestellt werden, dass die jeweiligen tags die mt Lokalisierung der Proteine sowie deren Funktion nicht beeinträchtigen.

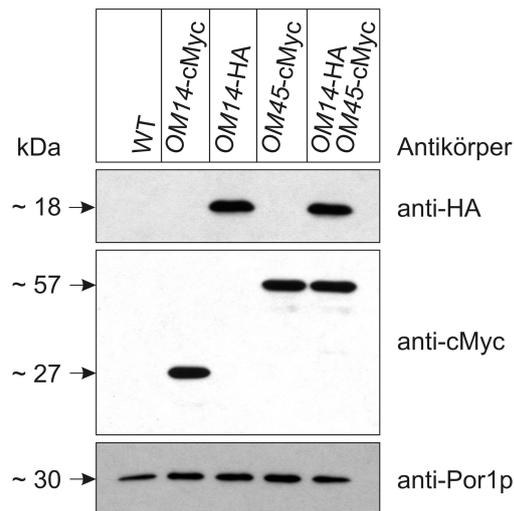


Abbildung 3.1: Expressionsnachweis der Fusionsproteine

Die Hefestämme *OM14-cMyc*, *OM14-HA*, *OM45-cMyc* und *OM14-HA OM45-cMyc* sowie der Wildtypstamm (WT) wurden in YPE-Medium kultiviert. Jeweils 20 μg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Durch *Western-Blot* und *HRP*-gekoppelte Antikörper wurde die Expression der Fusionsproteine immunologisch nachgewiesen.

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine wurden die Hefestämme in nicht-fermentierbarem YPE-Medium kultiviert, die Zellen enzymatisch aufgeschlossen und die hochreine mt Fraktion durch zweimalige Saccharose-Gradientenzentrifugation isoliert. An der OM über elektrostatische oder ionische Wechselwirkungen assoziierte periphere Proteine wurden durch eine anschließende Behandlung mit 1 M NaCl unter osmotisch stabilisierenden Bedingungen entfernt. Die während der Präparation aus den Fraktionen entnommenen Aliquots wurden mittels *Western-Blot* und spezifischen Antikörpern gegen die Epitop-*tags* sowie gegen die zytoplasmatische Phosphoglyceratkinase (Pgk1p), die Porinpore der OM (Por1p) und gegen die in der Matrix lokalisierten Zitratsynthase (Cit1p) immundekoriert (Abb. 3.2).

Die Identität der mt Fraktionen konnte durch den jeweiligen Nachweis der mt Kontrollproteine Por1p sowie Cit1p eindeutig belegt werden. Da Pgk1p nur in den zytoplasmatischen Fraktionen detektiert werden konnte, zeigt dies, dass die mt Fraktionen frei von zytoplasmatischen Kontaminationen sind. Die in der Matrix lokalisierte Zitratsynthase (Cit1p) wurde bei dem Hefestamm *OM45-cMyc* (Abb. 3.2 B) zusätzlich in sehr geringen Konzentrationen im Zytoplasma nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass einige Mitochondrien bei der Präparation aufgebrochen wurden. Die häufig aufgetretenen niedermolekularen Banden von Cit1p lassen einen Proteinabbau vermuten.

Die beiden Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc weisen eine mit dem Kontrollprotein Por1p identische Verteilung auf und sind daher eindeutig mt lokalisiert (Abb. 3.2 A und B). Bei Om45p-cMyc fallen die zahlreichen niedermolekularen Banden auf, die auf eine Proteindegradation bzw. eine Proteininstabilität hinweisen.

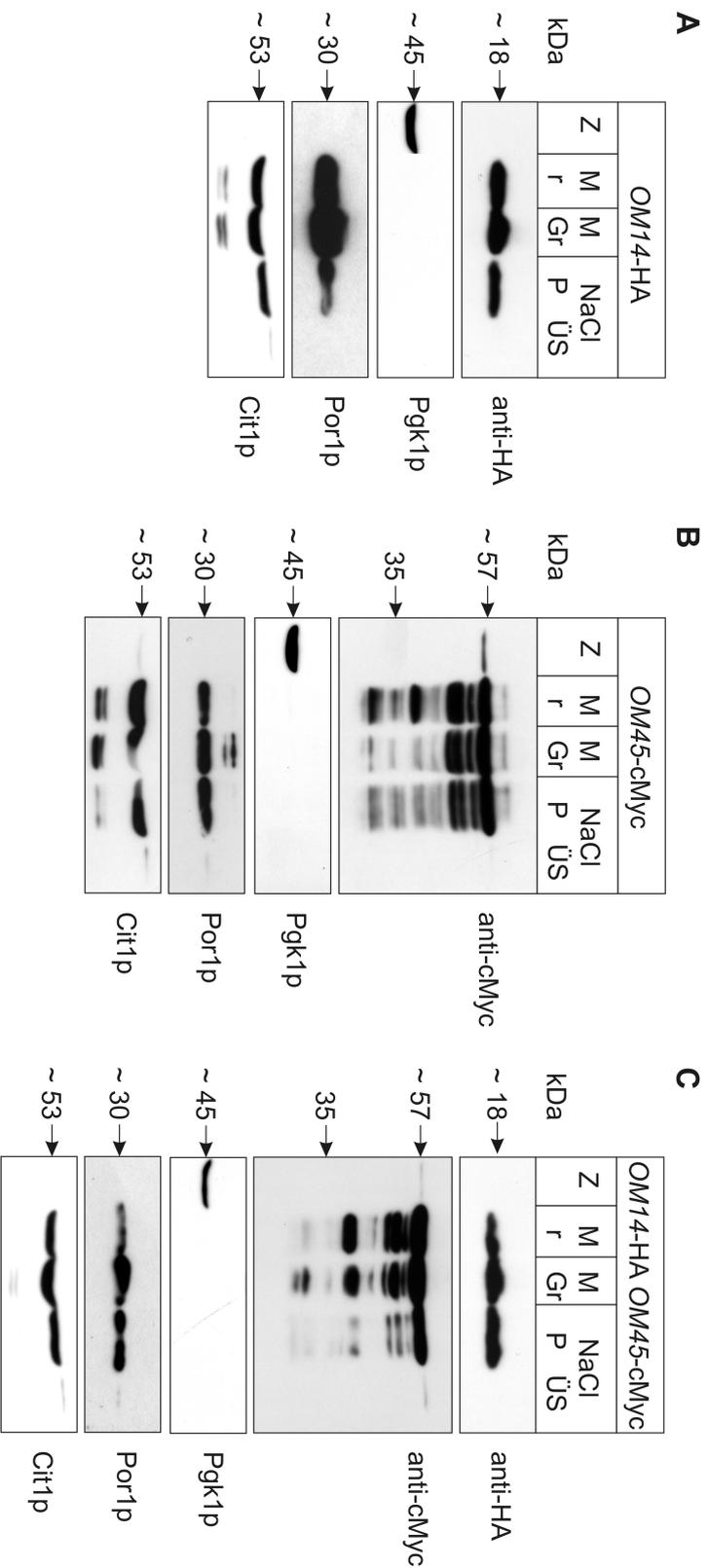


Abbildung 3.2: Lokalisationsnachweis der Fusionsproteine

Die Hefestämme *OM14-HA* (A), *OM45-cMyc* (B) und *OM14-HA OM45-cMyc* (C) wurden in YPE kultiviert und deren Mitochondrienfraktion enzymatisch isoliert. Jeweils 20 µg zweifach Gradienten-gereinigter Mitochondrien wurden anschließend in 1 M NaCl inkubiert. Auf ein 12%-iges SDS-PAA-Gel wurden je 20 µg der Zytoplasmafraktion (Z), Mitochondrienfraktion vor (M r) und nach (M Gr) der Gradientenzentrifugation, Mitochondrienfraktion nach der NaCl-Behandlung (NaCl P) sowie des TCA-gefällten Überstandes nach der NaCl-Behandlung (NaCl ÜS) aufgetragen. Der Nachweis der Fusions- sowie der Kontrollproteine erfolgte über HRP-gekoppelte Immundetektion mit spezifischen Antikörpern.

Die Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc im doppelt *getaggtten* Stamm (Abb. 3.2 C) weisen jeweils das gleiche Detektionsmuster wie in ihren einzeln *getaggtten* Stämmen auf und sind demzufolge auch in diesem Hefestamm mt lokalisiert.

Da die Funktion beider OM-Proteine bisher nicht bekannt ist, steht kein Funktionalitätsnachweis, der eine Beeinträchtigung durch den jeweiligen Epitop-*tag* ausschließen könnte, zur Verfügung.

Wachstumsanalysen der generierten Stämme unter fermentativen und nicht-fermentativen Bedingungen auf Festmedium sowie in Flüssigmedium (Abb. B.1 und B.2 im Anhang B) weisen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtypstamm auf. Es können daher keine dominant negativen Effekte aufgrund der Epitop-*tags* nachgewiesen werden.

Um eine Auswirkung des Epitop-*tags* auf die Proteinfunktion allerdings ausschließen zu können, müsste ein entsprechender Deletionsstamm, im Gegensatz zum Stamm mit dem Fusionsprotein, eine Wachstumsbeeinträchtigung aufweisen. Für diese Untersuchungen wurden die beiden Deletionsstämme $\Delta om14$ und $\Delta om45$ (vgl. Tabelle 2.9) von Euroscarf bezogen. Der Doppeldeletionsstamm $\Delta om14 \Delta om45$ wurde ausgehend von $\Delta om14$ durch Integration der *KIURA3*-Kassette in den ORF von *OM45* erzeugt. Der Nachweis des korrekten Einbaus der Deletionskassette erfolgte mittels diagnostischer PCR (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum der Deletionsstämme ist in den Abbildungen B.3 und B.4 dargestellt. Alle drei Deletionsmutanten zeigten bei den hier getesteten Bedingungen keinen vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyp.

Ein Einfluss der Epitop-*tags* HA und cMyc auf die Funktion der Proteine Om14p und Om45p kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch der korrekte Einbau der Integrationskassetten, die Expression und die mt Lokalisierung der Fusionsproteine gezeigt werden konnten, wurden die erzeugten Hefestämme *OM14*-HA, *OM45*-cMyc und *OM14*-HA *OM45*-cMyc für weitere Untersuchungen verwendet.

3.1.2 Membrantopologie von Om45p

Om45p ist mit einer einzigen, am N-Terminus befindlichen, TMD in der mt verankert [127, 135]. In welches Kompartiment das Protein ragt, ist jedoch nicht sicher belegt (siehe Einleitung Abschnitt 1.3). Um die Topologie von Om45p zu überprüfen, wurde die Sensitivität von C-terminal *getaggtten* Om45p-cMyc gegenüber den Serinproteasen Trypsin und Proteinase K in Gegenwart und Abwesenheit von Triton X-100 in intakten Mitochondrien untersucht (Abb. 3.3 und 3.4).

Om45p-cMyc ist nach einer Trypsinbehandlung von frisch enzymatisch isolierten Mitochondrien mit der hohen Enzymkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ noch nachweisbar, bei Zugabe des Membran lysierenden Agens Triton X-100 jedoch nicht (Abb. 3.3). Dies belegt, dass Om45p-cMyc nicht *per se* trypsinresistent ist und es kann geschlussfolgert

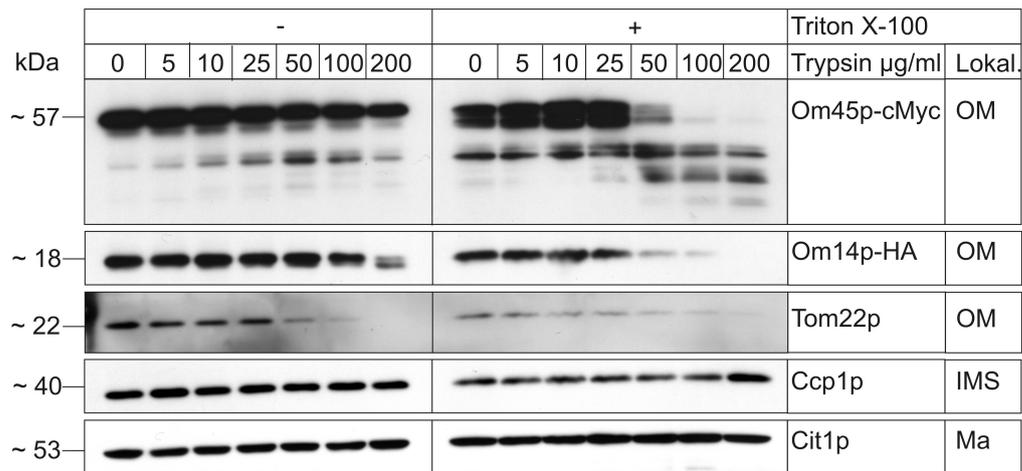


Abbildung 3.3: Sensitivität von Om45p-cMyc gegenüber Trypsin

Jeweils 20 μg frisch enzymatisch isolierte mt Proteine des Hefestammes *OM14-HA Om45-cMyc* wurden mit der angegebenen Trypsinkonzentration in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von Triton X-100 für 15 min auf Eis inkubiert. Die Aktivität von Trypsin wurde durch Zugabe der Protease Inhibitoren AEBSF und PI-Mix gestoppt. Das Proteingemisch wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch *HRP*-gekoppelte Immundetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Lokalisation (Lokal.) der Vergleichsproteine ist angegeben: mt äußere Membran (OM), mt Intermembranraum (IMS), mt Matrix (Ma)

werden, dass die mt OM den C-terminalen Epitop-tag vor einem proteolytischen Abbau schützt. Om45p-cMyc müsste demzufolge in den mt IMS ragen.

Das Fusionsprotein Om14p-HA weist gegenüber Trypsin ein mit Om45p-cMyc identisches Verhalten auf, was darauf hinweist, dass der C-Terminus von Om14p-HA ebenfalls im IMS lokalisiert ist.

Eine Aussage über die Membrantopologie eines Proteins durch Analyse der Trypsinsensitivität ist durch die Überlagerung mit dem teilweise sehr ineffizienten Trypsinabbau einiger Proteine erschwert. Die Endopeptidase Trypsin schneidet aminosäurespezifisch C-terminal nach Arginin und Lysin [167]. Diese Aminosäuren sind zwar ubiquitär in jedem Protein vorhanden, können aber durch Proteinfaltung, Glykosylierungen oder Disulfidbrücken sehr häufig für Trypsin nicht angreifbar sein [168]. Dies ist auch bei den in Abb. 3.3 gewählten Kontrollproteinen Tom22p, Ccp1p und Cit1p der Fall. Alle drei Proteine sind nach Lyse der mt Membranen auch bei hohen Trypsinkonzentrationen mit unveränderten MWs nachweisbar. Eine sichere Aussage hinsichtlich der Membrantopologie von Om45p kann durch dieses Experiment daher nicht getroffen werden.

Der Einsatz der Sequenz-unspezifisch schneidenden Proteinase K [168] sollte eindeutigere Ergebnisse liefern (Abb. 3.4).

Zur Definition der geeigneten Proteasekonzentration zur Analyse der Sensitivität mt Proteine gegenüber Proteinase K wurde das Verhalten von mt Kontrollproteinen untersucht. Das Matrixprotein Cit1p sowie das IM-Protein Cox2p sind bis zu einer Proteinase K

Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ detektierbar, nach Membransolubilisierung mit Triton X-100 hingegen nicht mehr. Nur mt Proteine, die durch die OM vor einem proteolytischen Abbau geschützt werden, können bei dieser Enzymkonzentration nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet das lösliche Protein des IMS (Ccp1p), welches nach Aufbrechen der OM mit Triton X-100 bei dieser Konzentration noch immer deutlich detektiert werden konnte. Ccp1p ist daher kein geeignetes Kontrollprotein für dieses Experiment.

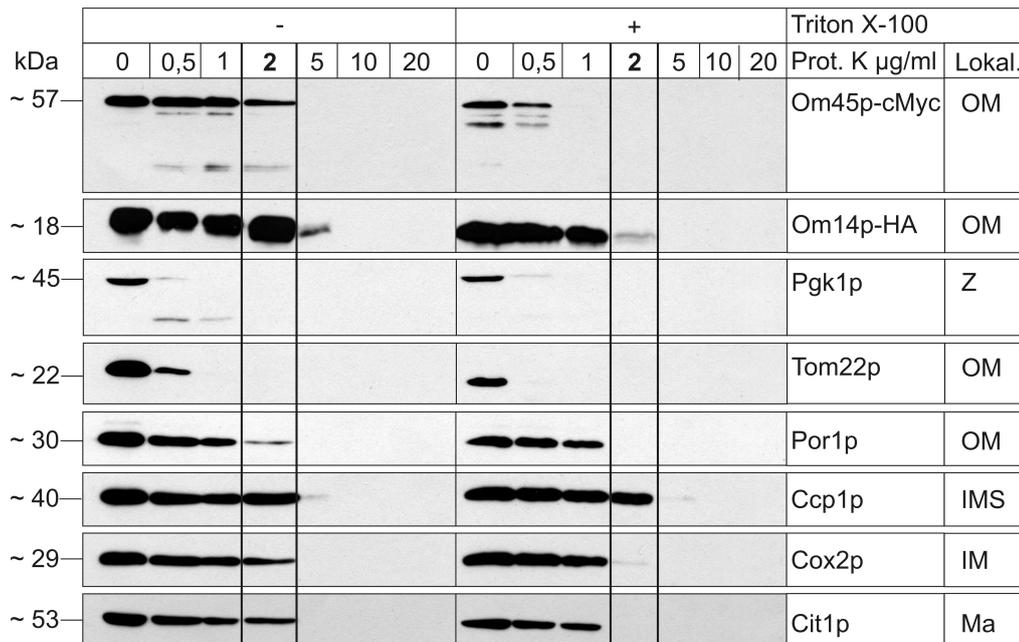


Abbildung 3.4: Sensitivität von Om45p-cMyc gegenüber Proteinase K

Jeweils 25 μg frisch enzymatisch isolierte mt Proteine des Hefestammes *OM14-HA OM45-cMyc* wurden mit der entsprechenden Konzentration von Proteinase K (Prot. K $\mu\text{g}/\text{ml}$) in An- (+) oder Abwesenheit (-) von Triton X-100 für 15 min auf Eis inkubiert. Die Aktivität der Proteinase K wurde durch Zugabe der Protease Inhibitoren AEBSF und PI-Mix gestoppt. Das Proteingemisch wurde mittels *Western-Blot* und *HRP*-gekoppelter Immundetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die entscheidende Proteasekonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist hervorgehoben und die jeweilige Lokalisation (Lokal.) der Vergleichsproteine ist angegeben: Zytoplasma (Z), mt äußere Membran (OM), mt Intermembranraum (IMS), mt innere Membran (IM), mt Matrix (Ma)

Das zytoplasmatische Protein Pgk1p zeigt wie erwartet eine sehr hohe Sensitivität gegenüber der Proteinase K. Auch ohne die Zugabe von Triton X-100 ist Pgk1p bei einer Enzymkonzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kaum noch detektierbar. Das Rezeptorprotein des mt TOM-Komplexes (Tom22p), mit einem ins Zytoplasma exponierten N-terminalen Bereich [169], ist wie erwartet ebenfalls sensitiv gegenüber Proteinase K (hier ab einer Proteasekonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht mehr nachweisbar).

Das OM-Kontrollprotein Por1p ist bei der entscheidenden Proteinase K Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Abwesenheit von Triton X-100 nachweisbar, bei Detergenzanwesenheit jedoch nicht. Die daraus abgeleitete Resistenz von Por1p entspricht der eines β -barrel Proteins in der mt OM.

Die Fusionsproteine Om45p-cMyc und Om14p-HA sind ebenfalls gegenüber Proteinase K resistent, so dass ihre Epitop-*tags* im IMS exponiert sein müssen.

Die Ergebnisse der Proteinase K-Behandlung von intakten Mitochondrien bestätigen die Daten von Riezman *et al.* (1983) [126], wonach Om45p in den IMS zu ragen scheint (schematische Darstellung in Abb. 3.5). Zusätzlich bestätigt die Proteinase K-Resistenz von Om14p-HA die Untersuchungen von Burri *et al.* (2006) [125], dass der C-terminale Teil von Om14p im IMS lokalisiert ist.

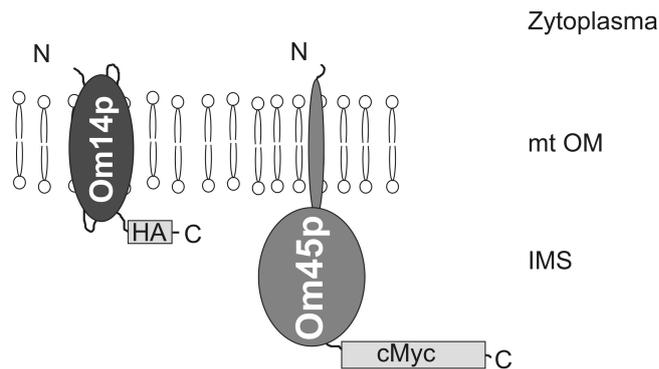


Abbildung 3.5: Schema der Membrantopologie von Om14p und Om45p

Die Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc sind schematisch (nicht maßstabsgetreu) mit ihrer Verankerung in der mt OM dargestellt.

3.1.3 Posttranslationale Modifikationen

Das Separationsprofil der Proteine Om14p und Om45p nach einer SDS-PAGE wies oftmals höher molekulare Proteinbanden auf. Bei Om14p-HA ist ein leiterähnliches Muster mit einer zweiten majoren Proteinbande bei etwa 40 kDa besonders auffällig (siehe Abb. 3.6, Abb. 3.8 und Diplomarbeit von Mäbert (2011) [134, Abb. 4-14 bzw. 4-16]). Diese Beobachtung scheint nicht spezifisch für die Anwesenheit des HA-*tags* zu sein, denn auch bei den anderen Epitop-*tags* wie cMyc [132] und TAP [134] trat dieses Bandenmuster auf. Die Detektion von Om45p-cMyc zeigte häufig neben dem erwarteten Signal bei ca. 57 kDa eine weitere abundante Bande bei ca. 60 kDa (vgl. Abb. 3.6 und Abb. 3.8).

Höher molekulare Proteinbanden können u. a. auf eine unzureichende Reduktion von intra- und / oder intermolekularen Disulfidbrücken zurückzuführen sein. So weisen z. B. Multimere eines Proteins oder gefaltete Proteine eine andere Laufform im SDS-PAA-Gel auf, als vollständig reduzierte und denaturierte Proteine. Dies konnte als Ursache in vorherigen Arbeiten durch die Anwendung verschiedener Reduktionsmittel für Om14p-cMyc allerdings schon weitestgehend ausgeschlossen werden [132].

Diverse posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierung und Phosphorylierung von Proteinen, führen ebenfalls zu veränderten Laufformen in einer SDS-PAGE und sollten daher in Bezug auf die beiden OM-Proteine untersucht werden.

Phosphorylierungen

Ob die verschiedenen Laufformen von Om14p und Om45p durch Phosphorylierungen zu erklären sind, sollte durch den Einsatz der λ Protein Phosphatase (λ -PP; Kapitel 2.5.7) analysiert werden. Die Entfernung von Phosphatresten eines Proteins durch eine Phosphatase sollte theoretisch zu einer Verschiebung des MW der Proteinbande im SDS-PAA-Gel führen. Um eine bessere Auflösung der Proteinbanden zu erreichen, wurden für die Separation längere Trenngele verwendet. Dies wurde durch den Einsatz der SDS-PAA-Gelkammer *SE 600 Ruby* (Amersham Biosciences) realisiert.

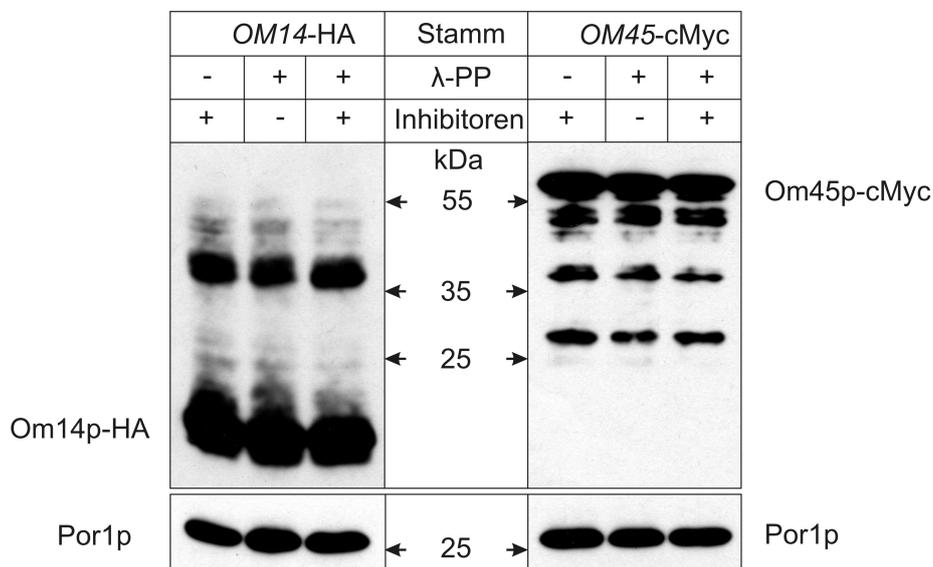


Abbildung 3.6: Eindimensionale Phosphorylierungsstudien

Die mt Fraktion der Hefestämme *OM14-HA* und *OM45-cMyc* wurde mechanisch isoliert. Jeweils 20 μ g der mt Proteine wurden mit (+) oder ohne (-) λ Protein Phosphatase (λ -PP) und den Phosphataseinhibitoren für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend sofort mit Lämmli-puffer bei 95 °C reduziert und denaturiert. Nach einer 15 %-igen SDS-PAGE wurden die Proteine Om14p-HA, Om45p-cMyc und Por1p mittels *Western-Blot* analysiert.

In Abb. 3.6 sind bei beiden OM-Proteinen keine Unterschiede der Proteinbanden mit oder ohne λ -PP Behandlung zu erkennen. Auch bei Por1p, von dem eine Phosphorylierung bekannt ist [170], ist keine Verschiebung der Proteinbande durch einen λ -PP Verdau nachweisbar. Die Aktivität der eingesetzten Phosphatase ist bei dieser Untersuchung daher nicht gesichert feststellbar.

Das MW von Phosphatresten ist sehr gering, so dass eine Abtrennung dieser nur dann zu einer sichtbaren Veränderung des MW des Proteins führt, wenn die Proteinphosphorylierung eine Struktur- bzw. Konformationsänderung des Proteins zur Folge hat. Für solch einen Einfluss der putativen Proteinphosphorylierung von Om14p, Om45p

und Por1p liefert dieses Experiment keinen Hinweis. Eindeutigere Anhaltspunkte, die für eine Proteinphosphorylierung sprechen, ergeben sich eher aus 2D Analysen, da die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen zu einer meist sichtbaren Änderung des isoelektrischen Punktes (pI) führt.

Für 2D Untersuchungen wurden Mitochondrien des Hefestammes *OM14-HA OM45-cMyc* enzymatisch isoliert und mit zweifacher Gradientenzentrifugation gereinigt. Jeweils 150 μg mit Digitonin solubilisierte Mitochondrienfraktionen wurden für 30 min mit λ -PP inkubiert, anschließend mit einer IEF - SDS-PAGE (Kapitel 2.5.10) aufgetrennt und mit HRP-gekoppelten Antikörpern analysiert (Abb. 3.7).

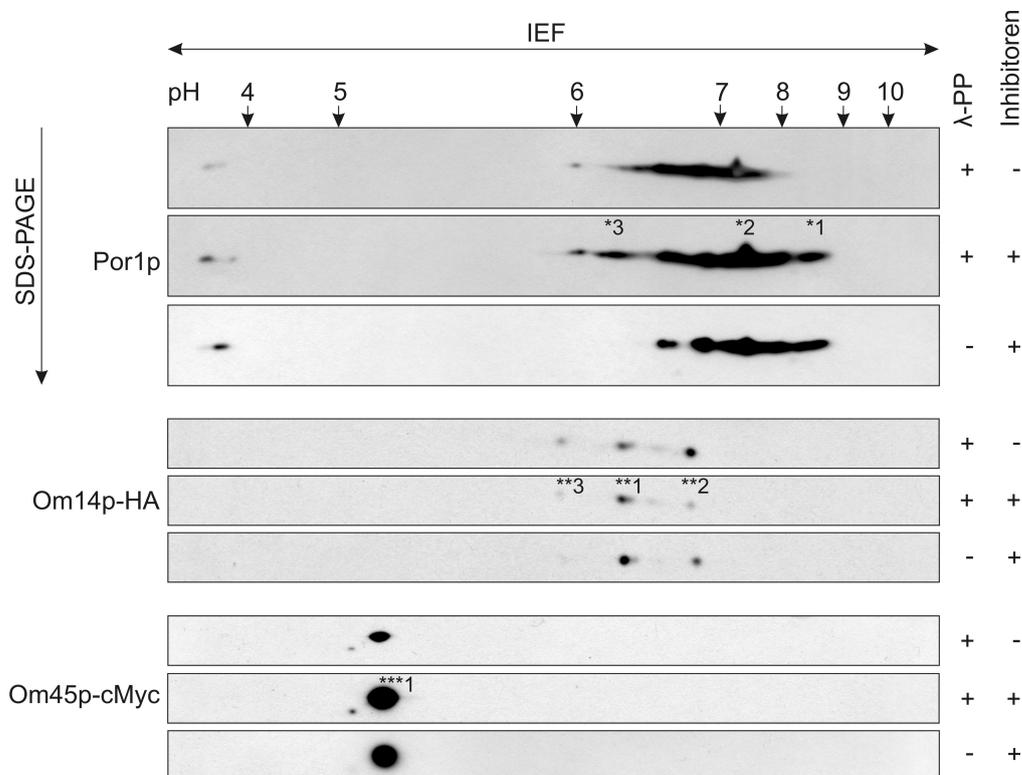


Abbildung 3.7: Zweidimensionale Phosphorylierungsstudien

Die mt Fraktion des Hefestammes *OM14-HA OM45-cMyc* wurde enzymatisch isoliert und durch zweifache Saccharose-Gradientenzentrifugation gereinigt. 600 μg mt Proteine wurden mit 4% (w/v) Digitonin (Verhältnis Detergenz-/Proteinmenge 4:1) versetzt und mit der Methanol-Chloroform-Methode gefällt. Anschließend wurden drei Ansätze mit jeweils 150 μg mt Proteinen mit (+) oder ohne (-) λ Protein Phosphatase (λ -PP) bzw. Phosphataseinhibitoren für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einer weiteren Methanol-Chloroform-Fällung der Proteine erfolgte eine isoelektrische Fokussierung (IEF) mit 13 cm langen *Immobiline Dry Strip* Gelen (pH 3-10, nicht linear). Eine anschließende Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine erfolgte mittels 15%-iger SDS-PAGE. Durch HRP-gekoppelte Immundetektion wurden die Proteine Por1p, Om14p-HA und Om45p-cMyc mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Por1p hat ein theoretisches MW von 30,4 kDa und einen pI von 7,7¹. Nach der 2D IEF - SDS-PAGE erschien Por1p in mehreren Proteinformen mit gleichem MW aber unterschiedlichem pI (6-8,5; Abb. 3.7 *). Die λ -PP war bei diesem Experiment aktiv, denn es konnte ein verändertes Proteinmuster der Positivkontrolle Por1p bei Einsatz des Enzyms im Vergleich zu den Ansätzen ohne Enzym bzw. bei Enzyminhibierung nachgewiesen werden. Nach der Inkubation mit λ -PP (in Abwesenheit der Phosphataseinhibitoren) wurde die basische Form (*1) von Por1p nicht mehr nachgewiesen und die Signalintensität der mittleren Formen (*2) nahm zu. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei dem Protein-Spot *1 um das phosphorylierte Por1p und bei *2 um dephosphorylierte Porine handeln könnte. Theoretisch führt die Dephosphorylierung eines Proteins zu einer pI-Verschiebung in den basischen Bereich, was in diesem Fall genau invers wäre. Während der IEF bzw. deren Probenvorbereitung werden die Proteine jedoch nicht vollständig denaturiert, so dass eine Dephosphorylierung auch zu einer Konformationsänderung führen kann. Dadurch wäre es möglich, dass andere Aminosäuren, die dem Protein einen niedrigeren pI verleihen, nach außen exponiert werden. Die Spots mit einem pI von ca. 6-6,3 (*3) wurden in Gegenwart der λ -PP detektiert, allerdings mit und ohne Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren, so dass über diese Por1p-Formen keine Aussagen getroffen werden können.

Om14p-HA (MW: 17,9 kDa, pI: 6,57¹) wurde in drei verschiedenen Formen mit gleichem MW aber unterschiedlichen pI-Werten von etwa 5,9; 6,4 und 6,8 detektiert (Abb. 3.7 **). Unter Einwirkung der λ -PP im Vergleich zu den anderen beiden Ansätzen, ohne λ -PP bzw. in Gegenwart der Phosphataseinhibitoren, nimmt die Intensität des Protein-Spots **1 ab und die von **2 zu. Da Form **1 einen saureren pI als Form **2 hat, sind dies zwei Hinweise dafür, dass Spot **1 eine phosphorylierte und **2 eine dephosphorylierte Form von Om14p-HA darstellen könnte. Spot **3 erscheint bei Einsatz der λ -PP etwas verstärkt und ist demzufolge möglicherweise ebenso eine nicht phosphorylierte Form von Om14p-HA.

Das Fusionsprotein Om45p-cMyc (MW: 55,25 kDa, pI: 4,92¹) konnte bei diesen Untersuchungen nur durch einen Spot mit einem pI von ca. 5,2 nachgewiesen werden (**1). Die Intensität dieses Proteinsignals wird durch Inkubation mit λ -PP schwächer, so dass diese Proteinform phosphoryliert sein könnte. Es fehlt allerdings ein Spot, der die dephosphorylierte Proteinform darstellen würde. Dies könnte durch eine Proteininstabilität erklärt werden. Niedermolekulare Banden von Om45p-cMyc, die diese Vermutung unterstützen würden, wurden jedoch nicht nachgewiesen. Eine dephosphorylierte Form von Om45p-cMyc könnte aber auch einen pI < 4 aufweisen, so dass sie durch die angewandte Methode nicht mehr nachweisbar wäre.

¹ Die Berechnungen wurden mit dem *tool Compute pI/Mw* von ExPASy durchgeführt [171].

funktioniert hat (Abb. 3.8 Glykoproteinfärbung M2).

Porin wurde mit einem authentischen Antikörper in beiden Hefestämmen mit ca. 30 kDa nachgewiesen (Abb. 3.8 ***). Die Färbung von glykosylierten Proteinen zeigt in diesem Gelbereich, wenn auch recht schwach, zwei deutliche Proteinbanden, die wahrscheinlich auf Porin zurückzuführen sind.

Om14p-HA wurde im Stamm *OM14*-HA mit einem apparenten MW von ca. 18 kDa detektiert (Abb. 3.8 *). Bei dem Blot fällt erneut die zweite majore Bande mit ca. 40 kDa sowie das schon erwähnte Leitermuster auf. Im Hefestamm *OM45*-cMyc liegt Om14p in seiner authentischen Form mit 14 kDa vor und kann nicht detektiert werden. Im Coomassie® gefärbten Gel sind die eigentlich abundanten Om14p-Banden [125–127], wahrscheinlich aufgrund der schwachen Färbung im niedermolekularen Bereich, nicht von den anderen Proteinen zu unterscheiden. Die Glykoproteinfärbung zeigt im Bereich von 14–18 kDa keine deutlichen Signale, was auch auf die geringen Proteinkonzentrationen zurückzuführen sein kann.

Om45p (45 kDa) hat in seiner *getaggten* Form ein MW von ca. 57 kDa. Dieser Unterschied ist im Coomassie® gefärbten Gel aufgrund der Proteinabundanz sichtbar (Abb. 3.8 **). Die Immundetektion von Om45p-cMyc zeigt das schon bekannte Separationsprofil. Das Glykoprotein gefärbte Gel zeigt mehrere Signale in einem Molekularbereich, die sowohl den Om45p-cMyc-Laufformen (***) als auch denen von Om14p-HA (*) entsprechen könnten. Allerdings sind keine Unterschiede zwischen beiden Hefestämmen zu erkennen, so dass die Signale keinem Protein eindeutig zugeordnet werden können. Diese Signale können auch von ganz anderen Proteinen stammen, da bei der Untersuchung mechanisch isolierte Mitochondrien eingesetzt wurden. Diese erhöhen den Gehalt von glykosylierten Proteinen extrem, da die Proben sehr wahrscheinlich stark mit zytoplasmatischen und ER-Proteinen kontaminiert sind.

Konkrete Aussagen über die Glykosylierung von Om14p und / oder Om45p lassen sich mit dieser Methode nicht treffen. Für eine genauere Proteinzuzuordnung sollte die Analyse mit hoch reinen Mitochondrien und anschließender 2D IEF - SDS-PAGE wiederholt werden.

Für die zweidimensionale Auftrennung wurden Mitochondrien aus dem Hefestamm *OM14*-HA *OM45*-cMyc enzymatisch isoliert und mit zweifacher Gradientenzentrifugation von zytoplasmatischen und ER-Kontaminationen gereinigt. 200 µg der mt Fraktion wurden mit Digitonin solubilisiert und einer 2D IEF - SDS-PAGE (Kapitel 2.5.10) unterzogen (Abb. 3.9).

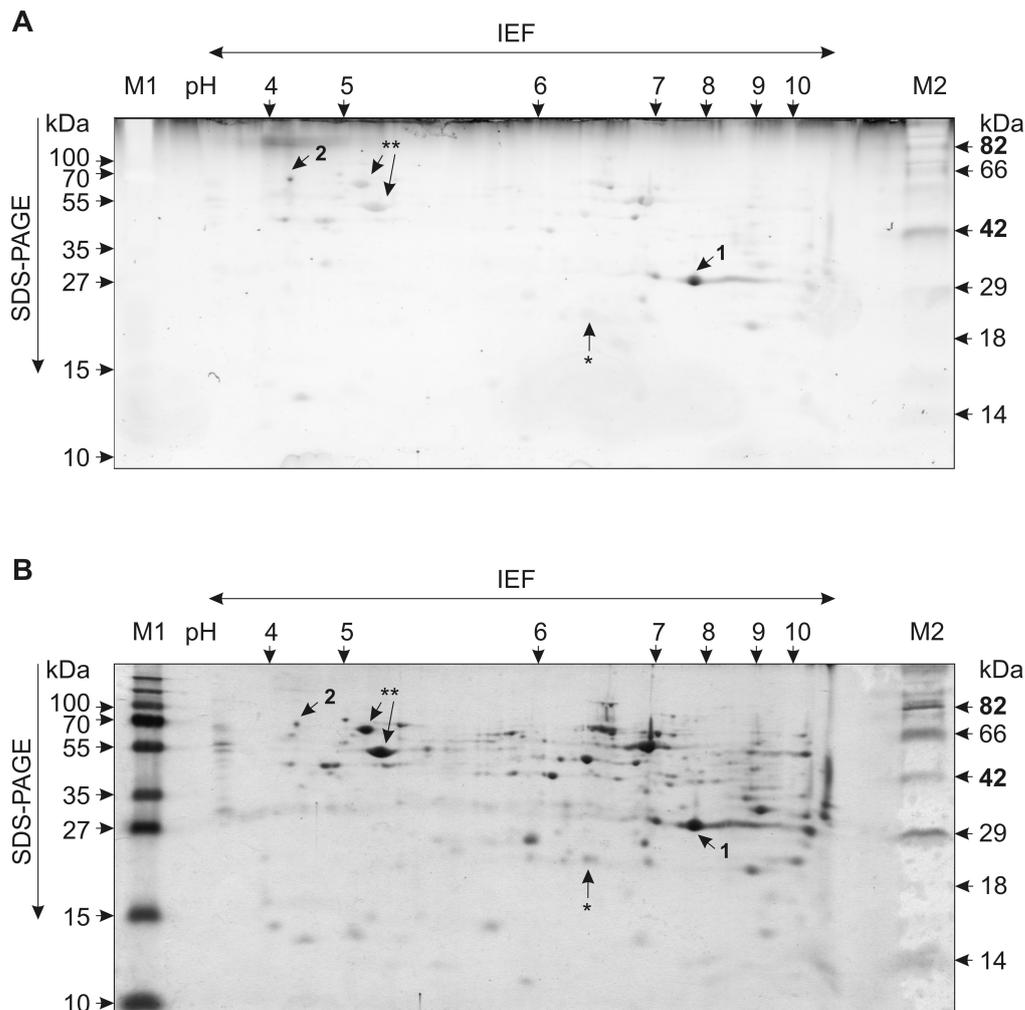


Abbildung 3.9: Zweidimensionale Glykosylierungsstudien

Die Mitochondrien des Hefestammes *OM14-HA OM45-cMyc* wurden enzymatisch isoliert und mit zweifacher Saccharose-Gradientenzentrifugation gereinigt. 200 μg der mt Fraktion wurden mit 4% (w/v) Digitonin (Verhältnis Detergenz-/Proteinmenge 4:1) solubilisiert. Lösliche Proteine wurden anschließend mit der Methanol-Chloroform-Methode gefällt. Nach einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) in einem 13 cm langem *Immobiline DryStrip Gel* (pH 3-10, nicht linear) erfolgte eine zweite Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht mittels 15%-iger SDS-PAGE. Als Größenstandards wurden *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (M1) und *CandyCane™ Glycoprotein Molecular Weight Standard* (M2, Größenangaben der Glykoproteine fett dargestellt) verwendet. Das Gel wurde mit einer Glykoproteinfärbung (A) analysiert und anschließend mit colloidalem Coomassie® (B) gefärbt.

Die Färbung glykosylierter Proteine hat anhand des Glykosylierungsmarkers (M2) nicht ganz erwartungsgemäß funktioniert (Abb. 3.9 A). Zwei der drei glykosylierten Markerproteine wurden nur schwach angefärbt und die 18 kDa-Bande (Avidin) ist gar nicht zu erkennen. Ein Blick auf das anschließend Coomassie® gefärbte Gel (Abb. 3.9 B) zeigt jedoch, dass Avidin auch nur sehr schwach im Marker M2 vorhanden war. Bei der Markerfärbung (M2) wird auch deutlich, dass eine relativ hohe Hintergrundfärbung von nicht glykosylierten Proteinen erfolgt ist.

Trotz der eingeschränkten Aussagefähigkeit dieser Glykoproteinfärbung fielen dennoch zwei deutlich gefärbte Protein-Spots beim Betrachten der 2D aufgetrennten mt Pro-

teine auf (Abb. 3.9 A, 1 u. 2). Da es sich bei beiden *Spots* um Proteine mit hohen Konzentrationen handelt (Vgl. mit Coomassie[®] gefärbtem Gel, Abb. 3.9 B), ist die Glykoproteinfärbung scheinbar irreführend. Ebenfalls abundante Proteine wie z. B. die mit ** gekennzeichneten *Spots* oder die im Bereich von pI: 6-7 und MW: 42-82 kDa liegenden Proteine zeigen allerdings wesentlich schwächere Signale nach der Glykoproteinfärbung. Die Glykosylierungssignale der *Spots* 1 und 2 können demzufolge nicht mit hohen Proteinkonzentrationen erklärt werden, sondern scheinen tatsächlich durch eine Färbung von Zuckerresten bedingt zu sein.

Eine massenspektrometrische Identifizierung der Proteine 1 und 2 (durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Prof. Hoflack; *Biotechnology Center* der Technischen Universität Dresden) zeigte, dass es sich bei *Spot* 1 um Por1p und bei *Spot* 2 um das ER-Protein Pdi1p handelt (MALDI-TOF/TOF Daten siehe Tabelle C.1 im Anhang C). Der Hinweis einer Poringlykosylierung in der Bäckerhefe aus den 1D Untersuchungen (Abb. 3.8) wird durch diese 2D Studie demzufolge bestätigt.

Aufgrund der, durch die vorangegangenen 2D Phosphorylierungsstudien, bekannten theoretischen MWs, den pIs sowie der Separationsprofile der zu charakterisierenden Proteine (vgl. Abb. 3.7) kann geschlussfolgert werden, wo die Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc nach der 2D Auftrennung ungefähr zu detektieren sind.

Om14p-3HA hat ein theoretisches MW von 17,9 kDa und einen pI von 6,57¹. Das MW von Om45p-9cMyc beträgt 55,25 kDa und der theoretische pI liegt bei 4,92¹. Da es sich bei beiden Proteinen um abundante OM-Proteine handelt, sollten sie im Coomassie[®] gefärbten Gel sichtbar sein (Abb. 3.9 B). Om14p-HA könnte dem mit * und Om45p-cMyc den mit ** markierten *Spots* entsprechen. Die Abundanz der potentiellen Om45p-cMyc *Spots* im Coomassie[®] gefärbten Gel entspricht der von Por1p (*Spot* 1). Jedoch weisen diese *Spots* im Glykoprotein gefärbten Gel deutlich schwächere Signalstärken im Vergleich zu Por1p auf, so dass angenommen werden kann, dass es sich im Gelbereich von Om45p-cMyc um eine Hintergrundfärbung handelt. Im Auftrennungsbereich von Om14p-HA ist kein Signal von glykosylierten Proteinen zu erkennen, so dass eine Glykosylierung von Om14p eher ausgeschlossen werden kann.

Mit der 2D IEF - SDS-PAGE konnten erste Hinweise für eine Phosphorylierung von beiden OM-Proteinen erlangt werden, eine Glykosylierung unter den gegebenen Versuchsbedingungen wird aufgrund der durchgeführten Glykoproteinfärbung eher ausgeschlossen.

¹ Die Berechnungen wurden mit dem *tool Compute pI/Mw* von ExPASy durchgeführt [171].

3.1.4 Molekulare Organisation von Om14p & Om45p

Durch eine native Proteinauftrennung können Aussagen über die molekulare Organisation von Protein-Protein-Interaktionen getroffen werden. Für diesen Zweck wurden zweifach Gradienten-gereinigte mt Proteine eines Hefestammes, der die *getaggt* Versionen der Proteine Om14p und Om45p co-exprimiert, mit einer 2D BN - SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.10).

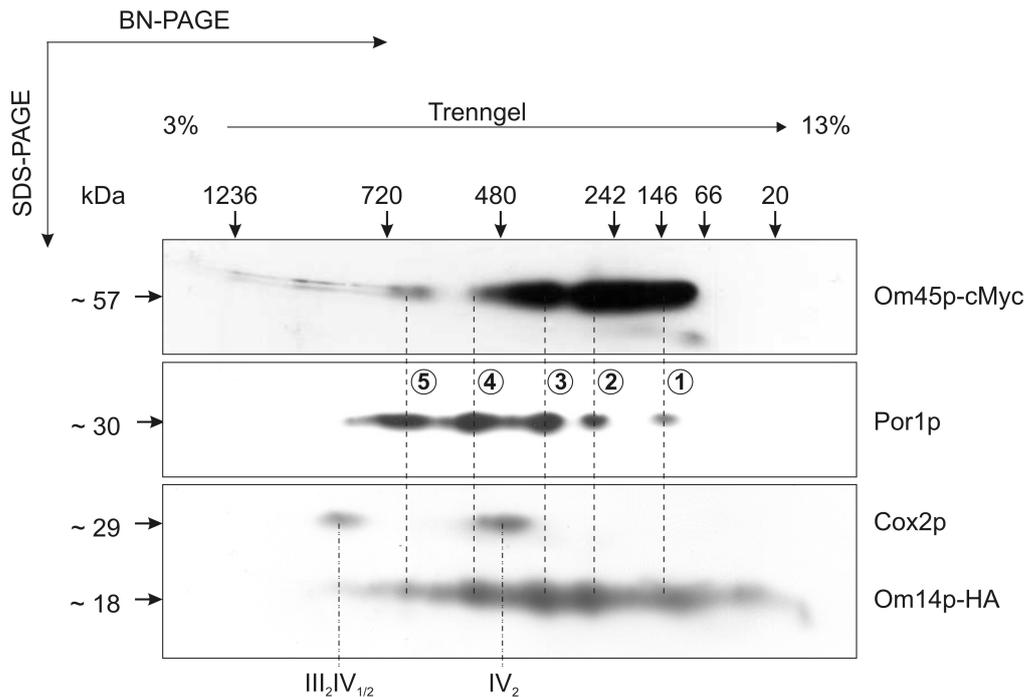


Abbildung 3.10: Molekulare Organisation von Om14p und Om45p

200 μ g enzymatisch isolierte, Gradienten-gereinigte und mit 4% (w/v) Digitonin (Verhältnis Detergenz-/Proteinmenge 4:1) behandelte mt Proteine des Stammes *OM14-HA OM45-cMyc* wurden mittels BN-PAGE in einem 3-13%-igen Gradientengel und anschließend durch eine 12%-ige SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte eine Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen die Epitop-tags HA und cMyc sowie gegen die Proteine Por1p und Cox2p. IV_2 : Dimer des mt Atmungsketten-Komplexes IV; $III_2IV_{1/2}$: Suprakomplexe der mt Atmungskette

Die detektierten Signale von Cox2p, einer UE von COX, liegen im erwarteten Bereich der mt Atmungsketten-Suprakomplexe $III_2IV_{1/2}$ (750 und 1000 kDa) und des Dimers von COX (440 kDa) [173]. Dies bestätigt zum einen die erfolgreiche Lyse und zum anderen die effiziente native 2D Auftrennung der Membranproteine.

Der Nachweis von Porin mit einem spezifischen Antikörper ließ fünf deutliche Por1p-Signale erscheinen. Sie weisen MWs von ungefähr 145 [1], 300 [2], 420 [3], 550 [4] und 700 kDa [5] auf (Zuordnung siehe Abb. 3.10). Diese Signale deuten auf heterogene Assemblierungsformen von Porin in unterschiedlichen Komplexen hin. Ähnliche Nachweise der Porinformen eins bis drei wurden auch von Claypool (2009) [174] und Krimmer *et al.* (2001) [175] mit 6-12/16%-igen BN-PAGEs erbracht.

Die Detektion von Om14p-HA und Om45p-cMyc erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen den jeweiligen Epitop-*tag*. Das Separationsprofil von Om14p-HA weist punktuelle Akkumulationen im Bereich von 40 bis 700 kDa auf und ähnelt dem von Por1p interessanterweise sehr stark (vgl. gestrichelte Linien zur Zuordnung in Abb. 3.10). Für Om45p-cMyc wurden starke Signale im Bereich von 70 bis 500 kDa und schwächere im Bereich von 700 kDa nachgewiesen. Dies deckt ebenfalls den Signalbereich von Por1p und Om14p ab. Om14p und Om45p scheinen beide Bestandteile von höhermolekularen Proteinkomplexen zu sein.

Aufgrund der überlappenden Proteinsignale von Por1p, Om14p und Om45p kann vermutet werden, dass zumindest ein Teil der drei mt OM-Proteine in gemeinsamen Komplexen organisiert vorliegt. Aus diesem Grund stehen Analysen hinsichtlich Proteininteraktionen zwischen Por1p, Om14p und / oder Om45p im zweiten Teil dieser Arbeit im Vordergrund.

3.2 Interaktionsstudien von Om14p & Om45p

Die mt OM-Proteine Om14p, Om45p und Por1p weisen ähnlich hohe *steady state level* auf [125–127]. Die Analyse der molekularen Organisation der OM-Proteine (vgl. Abschnitt 3.1.4) zeigte zudem, dass zumindest eine Subpopulation der Proteine vermutlich in gemeinsamen Proteinkomplexen assoziiert vorliegt. Der Vermutung, dass Om14p und Om45p mit der Porinpore der mt OM interagieren, sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

3.2.1 Protein-Interaktionsstudien mittels TAP & Co-IP

Eine *ex vivo* Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen ist z. B. die Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP). Durch ihre zwei aufeinander folgenden Reinigungsschritte ist diese Methode sehr spezifisch. Katrin Mäbert etablierte in ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung die TAP für das OM-Protein Om14p [134].

Bei der TAP verwendete Frau Mäbert mechanisch isolierte Mitochondrien des Hefestammes *OM14-TAP*, der Om14p mit einem TAP-Epitop-*tag* exprimiert. Als Negativkontrolle wurden mt Proteine des Wildtypstammes in einem parallelen Ansatz mitgeführt. Beide mt Lysate wurden den zwei spezifischen, aufeinander folgenden Schritten der TAP-Methode unterzogen (Kapitel 2.5.8). Proben der initialen mt Lysate und der finalen Eluate wurden mittels *Western-Blot* analysiert (Abb. 3.11 A).

Die *HRP*-gekoppelte immunologische Detektion mit Antikörpern gegen die Calmodulin-Bindedomäne (CBD) des TAP-Epitop-*tags* führte bei der Lysatprobe des TAP-markierten Stammes, im Gegensatz zur Probe des Wildtypstammes, zu einem Signal mit dem erwarteten MW von ca. 34 kDa, welches dem Fusionsprotein Om14p-TAP entspricht. Die Verlagerung des Signals zu einem niedrigeren MW (ca. 19 kDa) im finalen Eluat ist durch die erfolgreiche Spaltung des TAP-Epitop-*tags* durch die AcTEVTM-Protease zu erklären und deutet damit zugleich auf die Effizienz der angewandten Methode hin.

Die mit diesem Antikörper zusätzlich nachweisbaren Signale bei etwa 50 kDa sind in den Fraktionen beider Eluate sichtbar. Dieses Signal kommt durch den verwendeten sekundären Antikörper zustande, der an die co-eluierten schweren Ketten der IgGs der ersten Affinitätsmatrix binden kann.

Por1p wurde mit Om14p-TAP co-präzipitiert und im finalen Eluat des TAP-markierten Hefestammes nachgewiesen. Dies weist deutlich auf eine physikalische Interaktion zwischen den Proteinen Por1p und Om14p hin.

Die Spezifität des durchgeführten Experiments wird durch die nicht nachweisbaren hydrophoben Membranproteine der OM (Tom22p) und IM (Cox2p) in beiden Eluatensichergestellt.

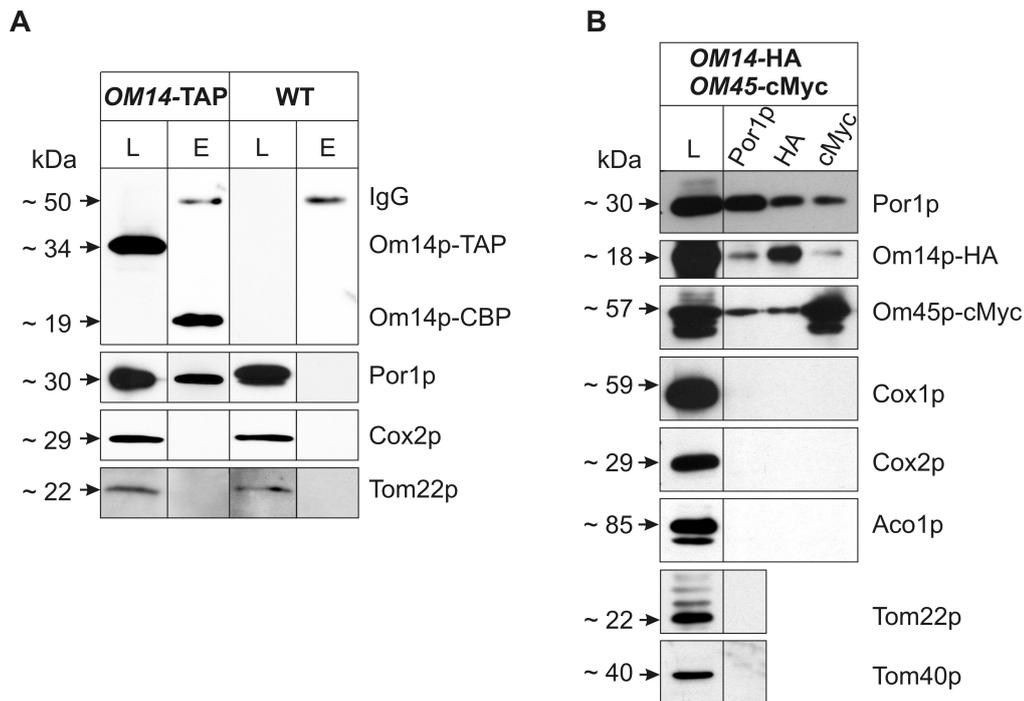


Abbildung 3.11: Protein-Interaktionsstudien

Interaktionen von Om14p, Om45p und Por1p wurden mittels TAP (**A**) und Co-IP (**B**) analysiert. Für die TAP wurden jeweils 500 μg Proteine aus mechanisch isolierten Mitochondrien des *OM14-TAP* Stammes bzw. des Wildtyps (WT) mit 1 % (w/v) Digitonin (4:1) lysiert und den zwei aufeinander folgenden TAP-Affinitätsschritten unterzogen. Für die Co-IP Experimente wurden 500 μg enzymatisch isolierte und Gradienten-gereinigte Mitochondrien des Stammes *OM14-HA OM45-cMyc* mit 0,625 % (w/v) Laurylmaltosid (2,5:1) lysiert. Die mt Proteine wurden mit den immobilisierten Antikörpern gegen Por1p, HA- oder cMyc-tag inkubiert. Proteine der Eluate (E) und ein Aliquot der entsprechenden Lysate (L) wurden mit einer 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die anschließende Immundetektion wurde mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Abbildungsteil **A** stammt aus der Diplomarbeit von Frau Mäbert (2011) [134, Abb. 4-10] und wurde modifiziert.

Ein weiterer unabhängiger Beweis für eine Interaktion zwischen Om14p und Por1p stammt von Co-Immunopräzipitations- (Co-IP) Experimenten. Diese sind ebenso *ex vivo* Experimente zum Nachweis von Proteininteraktionen. Die Co-IP ist allerdings aufgrund ihres einmaligen Reinigungsschrittes etwas unspezifischer als die TAP-Methode. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Versuchsbedingungen für mt OM-Proteine optimiert (siehe Kapitel 2.5.8).

Für die Co-IP wurden enzymatisch isolierte und Gradienten-gereinigte Mitochondrien des Hefestammes, der *OM14-HA* und *OM45-cMyc* co-exprimiert, mit 0,625 % (w/v) Laurylmaltosid solubilisiert. Die mt Proteine wurden mit immobilisierten Antikörpern, die entweder gegen Por1p, HA- oder den cMyc-Epitop-tag gerichtet waren, inkubiert (Abb. 3.11 B).

Die jeweilige Bindung der drei Proteine an ihre spezifischen Antikörper konnte durch die entsprechende immunologische Detektion bestätigt werden.

Neben Por1p enthielt das Eluat der Por1p-Antikörper-Matrix auch die Proteine Om14p-

HA und Om45p-cMyc. In den entsprechenden Experimenten mit immobilisierten Antikörpern gegen den HA- oder cMyc-Epitop-*tag*, die Om14p bzw. Om45p präzipitieren, wurden ebenfalls alle drei Proteine co-eluiert. Dies bestätigt die Existenz von einem oder mehreren heteromeren Proteinkomplexen.

Die hydrophoben Proteine der IM (Cox1p und Cox2p) und der OM (Tom22p und Tom40p) sowie das lösliche Matrixprotein Aco1p konnten in den einzelnen Eluaten mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern nicht nachgewiesen werden, wobei die Detektion von Tom22p und Tom40p nur bei dem Ansatz mit immobilisierten Por1p-Antikörpern durchgeführt wurde. Dies bezeugt die Spezifität der durchgeführten Co-IPs, denn Proteinkontaminationen durch unzureichende Solubilisierungen der mt Membranen können weitestgehend ausgeschlossen werden.

Durch drei unabhängige Experimente (2D BN - SDS-PAGE, TAP und Co-IP) kann geschlussfolgert werden, dass die Proteine Om14p, Om45p und Por1p miteinander interagieren und einen OM-Komplex bilden. Dieser erstmals identifizierte OM-Komplex sollte durch weitere Untersuchungen näher charakterisiert werden.

Für die folgenden Analysen des OM-Komplexes wurden die Deletionsstämme $\Delta om14$ *OM45-cMyc*, $\Delta om45$ *OM14-HA*, $\Delta por1$ *OM14-HA* sowie $\Delta por1$ *OM45-cMyc* (siehe Tabelle 2.9) generiert. Dazu wurden die ORFs von *OM14* bzw. *OM45* der von Euroscarf bezogenen Einzelmutanten mit den kodierenden Sequenzen der HA- bzw. cMyc-Epitop-*tags in frame* analog zu *OM14-HA* (siehe Kapitel 3.1.1) fusioniert. Die korrekte Integration der *tag*-Kassetten ins jeweilige Hefegenom sowie die Proteinexpression wurde mit diagnostischer PCR bzw. *Western-Blot* dokumentiert (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich des Hefewachstums mit dem Wildtypstamm bei fermentativen und nicht-fermentativen Bedingungen ist in den Abb. B.5 und B.6 im Anhang B dargestellt. Aus diesen kann entnommen werden, dass die Stämme $\Delta om14$ *OM45-cMyc* und $\Delta om45$ *OM14-HA* sich stets wie der Wildtypstamm bzw. die Einzelmutanten $\Delta om14$ und $\Delta om45$ verhalten.

Die beiden Stämme, in denen *POR1* deletiert wurde ($\Delta por1$ *OM14-HA* sowie $\Delta por1$ *OM45-cMyc*), wachsen in fermentierbaren Medien im Vergleich zum Wildtypstamm langsamer, erreichen jedoch später die gleiche Biomasse. In nicht-fermentierbaren Medien wachsen diese Stämme ebenfalls langsamer, erlangen aber im analysierten Zeitraum die Biomasse des Wildtypstammes nicht. Diese Beobachtungen treten ebenfalls bei der Einzelmutante $\Delta por1$ auf (Vgl. B.3 und B.4) und wurden für die nicht-fermentierbaren C-Quellen Glycerin und Laktat auch mehrfach beschrieben [120, 176–178]. Das verzögerte Wachstum der Stämme $\Delta por1$ *OM14-HA* und $\Delta por1$ *OM45-cMyc* liegt daher höchst wahrscheinlich nicht am Epitop-*tag*.

3.2.2 Abhängigkeit der Proteinstabilität von Komplexpartnern

Die erfolgreiche Komplexassemblierung von Proteinuntereinheiten ist oft eine Voraussetzung für deren Stabilität. Nicht assemblierte UEs werden hingegen oftmals abgebaut. Untersuchungen des mt Prohibitinkomplexes [179] und des mt Atmungskettenkomplex III [180] dokumentieren z. B. die Abhängigkeit von einzelnen Komplexpartnern untereinander. Der Verlust einer strukturellen Komplex-UE kann die gesamte Komplexassemblierung stören und zu reduzierten *steady state* Konzentrationen von nicht assemblierten UEs führen. Aussagen über die *steady state* Konzentration der drei mt OM-Proteine in Abwesenheit von Komplex-UEs sollten Hinweise auf die Assemblierungsform des OM-Komplexes liefern.

Für die Analyse der *steady state* Konzentrationen wurden jeweils 10 μg mechanisch isolierte mt Proteine der entsprechenden Deletionsstämme mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und einer semiquantitativen Analyse (Kapitel 2.5.13) mittels Immundetektion mit Cy5TM-gekoppelten sekundären Antikörpern unterzogen. Die Fluoreszenzsignale wurden mit der Signalintensität des entsprechenden Signals von Cox2p, welches als unabhängige Kontrolle fungierte, normiert und die Werte mit dem Wildtypsignal (100 %) in Relation gesetzt (Abb. 3.12).

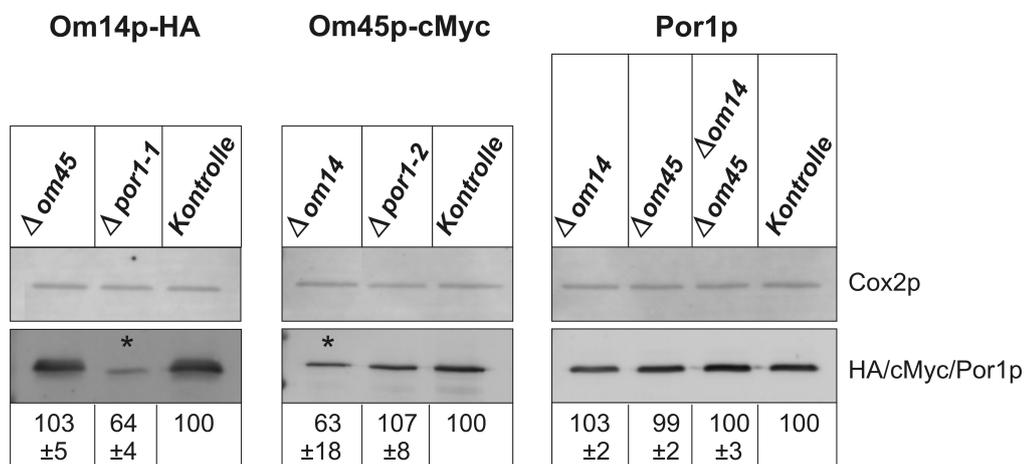


Abbildung 3.12: Steady state Proteinkonzentrationen der OM-Proteine in Deletionsstämmen

Jeweils 10 μg mechanisch isolierte mt Proteine der Deletionsstämme $\Delta om14$ OM45-cMyc, $\Delta om45$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM14-HA ($\Delta por1-1$), $\Delta por1$ OM45-cMyc ($\Delta por1-2$), $\Delta om14 \Delta om45$ und des Stammes OM14-HA OM45-cMyc (Kontrolle) wurden in einem 15 %-igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse des *Western-Blots* erfolgte mit spezifischen primären und Cy5TM-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Fluoreszenzsignale wurden mit der Software *Image Quant 5.2* quantifiziert. Die Werte wurden mit der Intensität des entsprechenden Cox2p Signals normiert und mit dem Kontrollwert (100 %) korreliert. * Fluoreszenzsignal mit signifikantem Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,01$; $n \geq 3$)

Die *steady state* Konzentration von Om14p ist bei Abwesenheit von Por1p signifikant, auf etwa 60 %, reduziert. Im Gegensatz dazu, hat das Fehlen von Om45p keinen Effekt auf die Abundanz von Om14p. Im inversen Szenario jedoch, d. h. wenn Om14p nicht vorhanden ist, verringert sich die *steady state* Konzentration von Om45p signifikant um ca. 40 %. Eine Deletion von *POR1* hat hingegen keinen Einfluss auf Om45p. Zudem fällt auf, dass die Konzentration von Por1p weder durch eine Einzel- noch durch eine Doppeldeletion von *OM14* und *OM45* beeinflusst wird.

Om45p scheint demzufolge nur eine akzessorische Rolle zuzukommen, da dessen Abwesenheit keinen Einfluss auf die anderen Komplex-UEs hat. Demgegenüber wird ein Ausfall von Por1p und Om14p weniger toleriert, wobei offenbar Om45p von Om14p und Om14p von Por1p abhängig sind. Por1p ist unabhängig von beiden OM-Proteinen stabil nachweisbar und scheint deswegen die Rolle der zentralen Komplexkomponente einzunehmen.

Die vermuteten Abhängigkeiten der einzelnen Komplex-UEs müssten sich auch auf die molekulare Organisation der Protein-Protein-Interaktionen auswirken. Mittels 2D BN - SDS-PAGE von Deletionsmutanten sollten diese im nächsten Schritt analysiert werden.

3.2.3 Molekulare Organisation der OM-Proteine bei fehlenden Komplexuntereinheiten

Durch die vorangegangenen Analysen wird davon ausgegangen, dass zumindest ein Teil der drei OM-Proteine Om14p, Om45p und Por1p in einem gemeinsamen Komplex organisiert vorliegt. Ein weiterer Beleg dafür wäre der Nachweis einer Störung der Komplexassemblierung, wenn eine UE fehlt. Zur Untersuchung der molekularen Organisation der OM-Proteine bei Abwesenheit einzelner Interaktionspartner wurden 2D BN - SDS-PAGEs mit enzymatisch isolierten und Gradienten-gereinigten Mitochondrien von Deletionsstämmen durchgeführt (Abb. 3.13).

In den oberen Spuren der drei Teilabbildungen sind jeweils die Separationsprofile der drei OM-Proteine im Kontrollstamm mit den beiden *getaggt* Om14p und Om45p-Varianten (*OM14-HA OM45-cMyc*) dargestellt (vgl. auch Abb. 3.10). Diese Separationsprofile ändern sich bei Abwesenheit von Om45p wie erwartet kaum (Abb. 3.13 A und C), was vielmehr auf eine Nebenfunktion als auf eine zentrale Rolle innerhalb des Komplexes von Om45p hinweist.

Im Gegensatz dazu führt eine Deletion von *POR1* zu einer deutlichen Verschiebung der Signale von Om14p und Om45p zu MWs unterhalb von 150 kDa (Abb. 3.13 A und B, untere Spur). Dies weist darauf hin, dass die hoch molekularen Komplexe (markiert mit

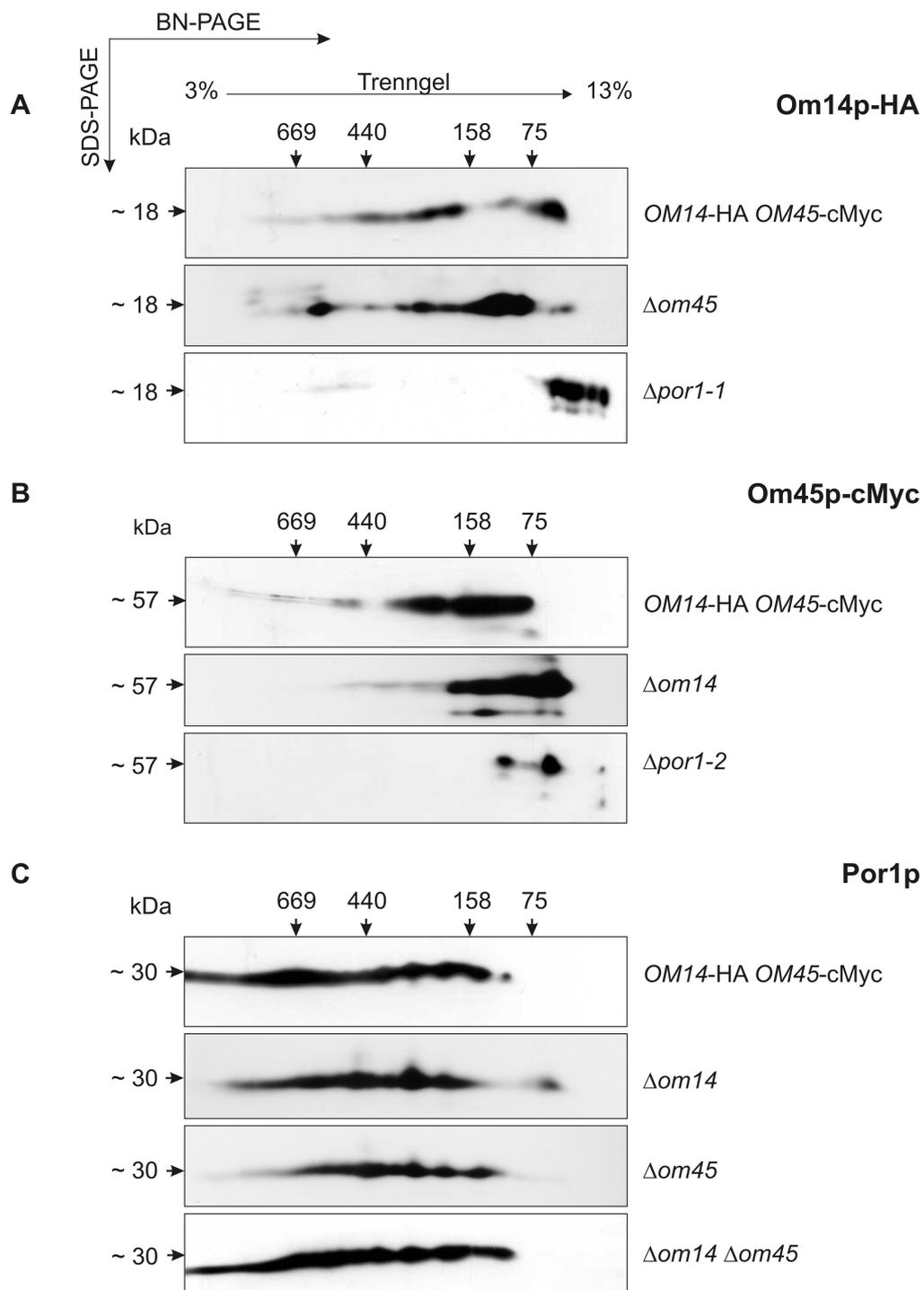


Abbildung 3.13: Molekulare Organisation der OM-Proteine in Deletionsstämmen

200 μ g enzymatisch isolierte und Gradienten-gereinigte Mitochondrien der Deletionsstämmen $\Delta om45$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM14-HA ($\Delta por1-1$), $\Delta om14$ OM45-cMyc, $\Delta por1$ OM45-cMyc ($\Delta por1-2$), $\Delta om14 \Delta om45$ und des Kontrollstammes OM14-HA OM45-cMyc wurden mit 4% (w/v) Digitonin (4:1) lysiert. Proteinkomplexe mit hohem Molekulargewicht wurden mittels BN-PAGE in einem 3-13%-igem Gradientengel elektrophoretisch separiert. Die Untereinheiten der Proteinkomplexe (Om14p in (A), Om45p in (B) und Por1p in (C)) wurden durch eine zweite Dimension mit denaturierenden Bedingungen (12%-ige SDS-PAGE) und anschließendem *Western-Blot* visualisiert.

[2 - 5] in Abb. 3.10) entweder nicht mehr gebildet oder abgebaut wurden.

Om14p wird bei Fehlen von Porin mit vier Signalen nachgewiesen, die MWs kleiner als 75 kDa aufweisen (Abb. 3.13 A). Diese könnten durch Bildung von Homomultimeren von Om14p und / oder durch Interaktionen mit Om45p erklärt werden.

Om45p wurde in Abwesenheit von Por1p in zwei deutlichen Proteinformen mit ca. 60 und 120 kDa detektiert (Abb. 3.13 B). Diese Signale könnten als die mono- und dimere Form von Om45p gedeutet werden. Heteromere aus Om14p und Om45p in Abwesenheit von Por1p können vermutlich ausgeschlossen werden, weil Om14p im Bereich des höher molekularen Protein-*Spots* mit etwa 120 kDa von Om45p nicht mehr nachweisbar ist.

Eine Deletion von *OM14* zeigt interessanterweise auch einen Einfluss auf die Komplexintegrität, da die hoch molekularen (> 200 kDa) Komplexe von Om45p in Abwesenheit von Om14p nur sehr schwach detektiert werden konnten (Abb. 3.13 B, mittlere Spur). Die Bildung der Porinkomplexe wird durch eine Deletion von *OM14* allerdings nicht beeinträchtigt (Abb. 3.13 C). Ebenso zeigt eine Doppeldelation von *OM14* und *OM45* keinen Effekt auf das Separationsprofil von Por1p.

Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass Por1p als zentrales Gerüst für den OM-Komplex fungiert. Om14p scheint die Bindung von Om45p an Por1p zu vermitteln.

3.2.4 Protein-Interaktionsstudien von Deletionsmutanten

Wie in den Abschnitten 3.2.2 und 3.2.3 gezeigt, hat die Deletion von *POR1* und *OM14* signifikante Auswirkungen auf die *steady state* Konzentration und die molekulare Organisation von Om14p und Om45p. Um die physikalische Interaktion der OM-Proteine näher zu untersuchen, wurden Co-IP Experimente mit mt Lysaten in Abwesenheit einzelner Komplex-UE durchgeführt.

Für diese Analysen wurde ein weiterer Stamm generiert, bei dem *POR1* deletiert und die ORFs *OM14* und *OM45* C-terminal mit der Sequenz eines Epitop-*tags* versehen wurden ($\Delta por1$ *OM14*-HA *OM45*-cMyc, vgl. Tabelle 2.9). Der hierfür genutzte Ausgangsstamm $\Delta por1$ *OM45*-cMyc wurde mit der Integrationskassette *3HA-KIURA3*, die mittels SFH-PCR mit komplementären Enden zum ORF *OM14* versehen wurde, transformiert. Die korrekt erfolgte homologe Rekombination wurde mit diagnostischer PCR und die Proteinexpressionen mittels *HRP*-gekoppelter Immundetektion verifiziert (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum des Hefestammes im Vgl. zum Wildtypstamm kann den Abb. B.5 und B.6 im Anhang B entnommen werden. Dabei wurde festgestellt, dass sich der erzeugte Stamm $\Delta por1$ *OM14*-HA *OM45*-cMyc von den in Kapitel 3.2.2 schon beschriebenen Porindeletionsstämmen nicht unterscheidet.

Bei den Co-IP Untersuchungen (Kapitel 2.5.8) wurden die entsprechenden Antikörper immobilisiert und mit mt Lysaten der Deletionsmutanten inkubiert. Die erfolgreiche Immobilisierung der Antikörper gegen den HA- (für Om14p) und cMyc-Epitop-tag (für Om45p) sowie gegen Por1p und die nachfolgende Bindung der entsprechenden Köderproteine konnte mittels *Western-Blot* bestätigt werden (Abb. 3.14).

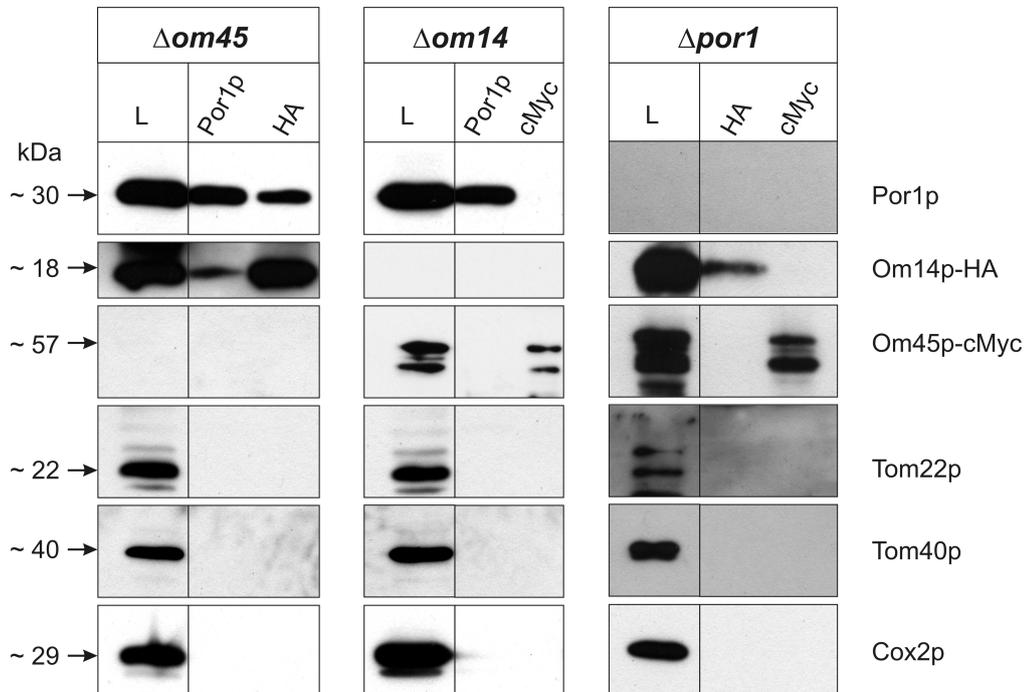


Abbildung 3.14: Interaktionsstudien mit Deletionsmutanten

Mit mt Lysaten der Deletionsstämmen $\Delta om45$ *OM14*-HA (linke Darstellung), $\Delta om14$ *OM45*-cMyc (mittlere Darstellung) und $\Delta por1$ *OM14*-HA *OM45*-cMyc (rechte Darstellung) wurden Co-IPs in Kombination mit den angegebenen immobilisierten Antikörpern gegen Por1p, HA- oder cMyc-tag durchgeführt. Final eluierte Proteine und ein Aliquot des entsprechenden Überstandes der lysierten Mitochondrien (L) wurden mittels 12%-iger SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die *HRP*-gekoppelte Immundetektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Por1p, Om14p-HA und Om45p-cMyc. Als Kontrolle wurden die Membranproteine Tom22p, Tom40p und Cox2p detektiert.

Trotz einer Deletion von *OM45* können, wie durch das Ergebnis der 2D BN - SDS-PAGE von Deletionsmutanten (siehe Abschnitt 3.2.3) erwartet, Om14p und Por1p mit immobilisierten Antikörpern gegen Por1p bzw. gegen den HA-tag co-präzipitiert werden (Abb. 3.14, linker Teil). Dies verstärkt die Vermutung, dass beide Proteine unabhängig der Gegenwart von Om45p miteinander interagieren.

Dass Om45p für die Komplexassemblierung Om14p zu benötigen scheint, wird dadurch experimentell untermauert, dass Om45p in Abwesenheit von Om14p nicht mit Por1p-Antikörpern aus dem Lysat isoliert werden konnte (Abb. 3.14, mittlerer Teil). Mit anti-cMyc-Antikörpern gelang ebenfalls keine Co-Präzipitation.

Im Gegensatz zur Co-IP mit mt Lysaten des Wildtypstammes (vgl. Abb. 3.11 B) gelingt keine Co-Präzipitation von Om45p und Om14p, wenn *POR1* deletiert wurde (Abb. 3.14, rechter Teil). Dadurch konnte mit einer von der 2D BN - SDS-PAGE (Abb. 3.13) unabhängigen Methode bestätigt werden, dass Om14p und Om45p ohne Por1p keinen heteromeren Subkomplex ausbilden.

Die Spezifität der Co-IP-Ergebnisse wird durch die nicht vorhandenen Detektionssignale der hydrophoben Proteine der OM (Tom22p und Tom40p) und der IM (Cox2p) mit den entsprechenden Antikörpern in den Co-IP Eluaten deutlich.

3.2.5 Identifizierung des Om14p-assoziierten Proteoms

Zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner des mt OM-Komplexes (bestehend aus Por1p, Om14p und Om45p) sollte eine präparative TAP mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt werden.

Initiale Studien zeigten, dass Om14p-TAP während einer enzymatischen Mitochondrienisolation nicht stabil ist [134]. Wahrscheinlich ist das der Gegenwart von kontaminierenden Enzymen des Zymolyase-Mix zuzuschreiben, die den TAP-Epitop-tag des Fusionsproteins proteolytisch abtrennen. Ein solches Phänomen wurde schon von Puig *et al.* (2001) [153] publiziert. Aus diesem Grund wurde die präparative TAP mit mechanisch isolierten Mitochondrien des Hefestammes *OM14*-TAP durchgeführt [134]. Um Kontaminationen identifizieren zu können, wurde in einem parallelen Ansatz eine Probe des Wildtypstammes mitgeführt. Proteine der finalen Eluate wurden in einem 8-20 %-igen Gradienten-SDS-PAA-Gel separiert und mit colloidalem Coomassie® gefärbt. Die sichtbaren Proteinbanden der Spur von *OM14*-TAP wurden ausgeschnitten und den MALDI-TOF/TOF Analysen der Arbeitsgruppe von Prof. Hoflack (*Biotechnology Center* der Technischen Universität Dresden) unterzogen (Abb. 3.15 A). Ergänzend zu den Arbeiten von Frau Mäbert erfolgten zusätzlich nano-LC-MS/MS Untersuchungen zur Identifizierung schwächerer Proteinbanden und MALDI-TOF/TOF Analysen der Wildtypprobe von Gelbereichen, die denen der sichtbaren Proteinbanden von *OM14*-TAP entsprachen.

Im Kontrollansatz (Wildtypprobe) konnten keine Proteine des OM-Komplexes bzw. auch keine anderen mt Proteine nachgewiesen werden. Die drei abundanten Banden (Abb. 3.15 A: 4/I, 12/II und 16/III; MS-Daten im Anhang C der Tabelle C.2), die in beiden Spuren auftraten, resultierten aus Kontaminationen durch die im ersten TAP-Affinitätsschritt verwendete IgG-Matrix (schwere und leichte Kette von IgG1) und durch Aprotinin, ein Trypsininhibitor, welcher eine Komponente des genutzten PI-Mix darstellt. Der PI-Mix wurde zusammen mit AEBSF während der gesamten TAP-Prozedur eingesetzt,

da Vorstudien zeigten, dass diese Proteaseinhibitoren die TEV-Spaltung nicht inhibieren [134].

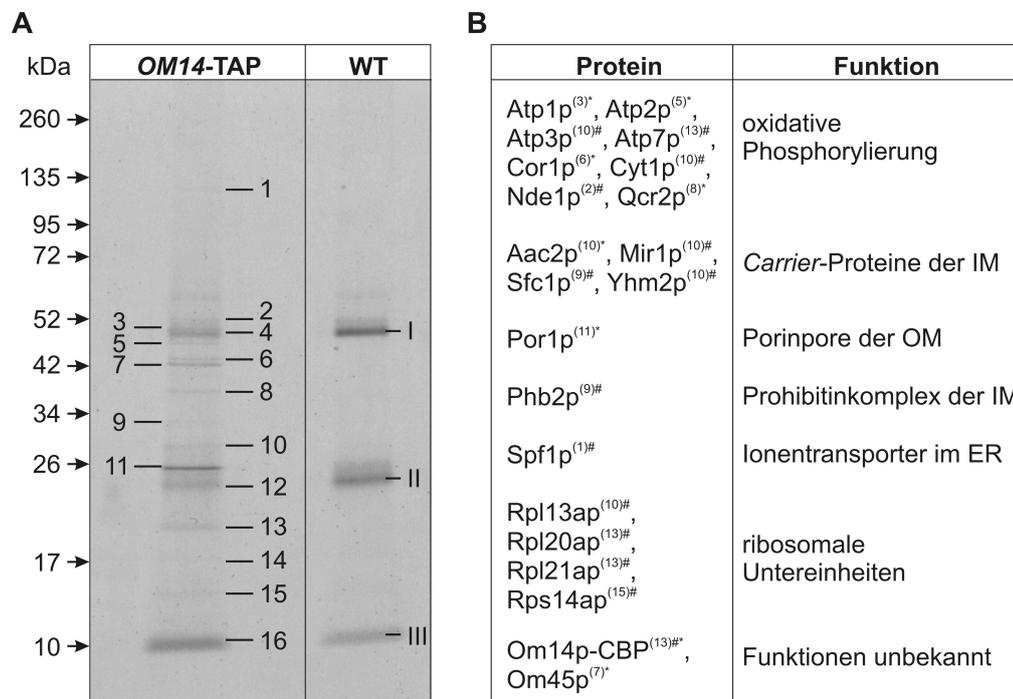


Abbildung 3.15: Mitochondriales Interaktom von Om14p

(A) Die TAP-Methode wurde in einem präparativen Maßstab mit jeweils 4 mg mechanisch isolierten Mitochondrien des Stammes *OM14-TAP* und des Wildtyps (WT) durchgeführt [134, Abb. 4-11, modifiziert]. Die eluierten Proteine wurden in einem 8-20 %-igen Gradienten-SDS-PAA-Gel elektrophoretisch separiert, wobei *Spectra*TM als Marker genutzt wurde. Die Proteine wurden mit colloidalem Coomassie[®] gefärbt und die nummerierten Banden (arabische Zahlen für *OM14-TAP* Spur und römische Zahlen für Wildtypproben) wurden mittels MS identifiziert (Daten siehe Tabelle C.2 im Anhang C). (B) Mit Om14p-TAP co-eluierte Proteine. Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Proteinbanden im Gel (A). Informationen über die Proteine stammen aus der Datenbank SGD. * Daten stammen von MALDI-TOF/TOF Analysen und sind signifikant ($p < 0,05$) mit einem PMF-Wert > 59 (entnommen aus Mäbert (2011) [134, Tabelle 4-2]; # ergänzte Daten, durch nano-LC-MS/MS Analysen erhalten, mit einer 1 %-igen FDR und mindestens zwei nachgewiesenen unikaten Peptiden

In Abb. 3.15 B ist eine Liste der 20 identifizierten Proteine dargestellt, die mit Om14p-TAP co-präzipitiert und identifiziert werden konnten (MS-Daten in Tabelle C.2 im Anhang C).

Wie durch die vorangegangenen Co-IP Ergebnisse (Abschnitt 3.2.1) erwartet, wurde mit dem Köderprotein Om14p-CBP ebenfalls Om45p und Por1p co-eluiert. Dies dokumentiert die Funktionalität der präparativen TAP-Prozedur.

Unter den zusätzlich eluierten Proteinen befinden sich vier Mitglieder der Familie der MCs, die verschiedene Metabolite durch die mt IM transportieren (siehe Einleitungskapitel 1.2.4 *Metabolit- und Ionen-transport*; sowie [59, 80]). Ein weiteres identifiziertes Protein der mt IM, Phb2p, ist eine UE des stark konservierten 1,0-1,4MDa großen

Prohibitinkomplexes [181]. Weitere acht Proteine der IM können funktionell der mt oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden.

Neben den Proteinen der mt IM wurde ein weiterer Ionentransporter mit Om14p-TAP co-präzipitiert. Dieser Transporter wird Spf1p bzw. Cod1p genannt und befindet sich in der Membran des ERs [182]. Des Weiteren wurden vier ribosomale Proteine des Zytoplasmas im Eluat von Om14p-TAP identifiziert. In der Proteinbande 14 konnte kein bekanntes Hefeprotein nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der identifizierten Interaktionspartner des OM-Komplexes bzw. als Spezifitätsnachweis der Methode sollten präparative TAPs mit dem Köderprotein Om45p bzw. mit einem potentiell unabhängigen Protein der mt OM durchgeführt werden. Dazu wurden die Hefestämme *OM45-TAP* und *TOM22-TAP* (siehe Tab. 2.9) analog zum Stamm *OM14-TAP* (siehe Mäbert (2011) [134]) generiert. Eine präparative TAP-Analyse war mit beiden Stämmen allerdings nicht durchführbar, da der TAP-tag in beiden Fällen offenbar mit der Proteinfunktion interferierte. So zeigte *OM45-TAP* ein reduziertes respiratorisches Wachstum und das Fusionsprotein war sowohl zytoplasmatisch als auch mt lokalisiert. Die Transformanten von *TOM22-TAP* wuchsen im Vergleich zum Wildtypstamm extrem langsam und ein Expressionsnachweis von Tom22p-TAP war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

3.3 Phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten

Bisherige Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten $\Delta om14$, $\Delta om45$ und $\Delta om14 \Delta om45$ mit unterschiedlichen C-Quellen und Temperaturen ließen keinen zum Wildtypstamm abweichenden Phänotyp erkennen (Vgl. Abb. B.3 und B.4 sowie [125, 127, 132]). Da der Funktionsausfall eines bzw. mehrerer Proteine nicht notwendigerweise in einem sichtbaren Einfluss auf das Wachstum resultieren muss, wurden detaillierte subzelluläre bzw. molekulare Untersuchungen der mt Morphologie, der mt Proteome und zweier mt Transportprozesse in Abwesenheit jeweils eines oder beider zu charakterisierenden OM-Proteine durchgeführt.

3.3.1 Mitochondriale Morphologie

Basierend auf der Kenntnis, dass eine wesentliche Funktion von Proteinen der mt OM die Beteiligung an mt Teilungs- und Fusionsprozessen ist (siehe Einleitungskapitel 1.2.1), wurde überprüft, ob sich die Deletion von *OM14* und / oder *OM45* auf die mt Morphologie auswirkt.

Zur Visualisierung der Mitochondrien wurden die zu untersuchenden Deletionsstämme, der Wildtypstamm sowie mt Teilungs- und Fusionsmutanten mit dem Plasmid pYX142-mtGFP (siehe Tab. 2.1) transformiert. Das Plasmid enthält u. a. die kodierende Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP), welche N-terminal mit einer mt Matrix-Zielsequenz versehen wurde. Die Mitochondrien der Transformanden sind dadurch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die Abb. 3.16 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der untersuchten Hefestämme im Vergleich zum Wildtypstamm (WT).

In der Wildtyphefe ist eindeutig das charakteristische mt Netzwerk zu erkennen. Als Beleg der Nachweisbarkeit von Störungen der mt Morphologie konnten in der mt Fusionsmutante $\Delta fzo1$ nur kleine punktuelle Mitochondrien nachgewiesen werden. Zellen der Teilungsmutante $\Delta fis1$ wiesen hingegen ein kaum verzweigtes mt Kompartiment auf. Die Beobachtungen dieser Kontrollstämme entsprechen den Angaben in der Literatur [5, 183–185].

Die Mitochondrien der Deletionsstämme $\Delta om14$, $\Delta om45$ (Daten nicht gezeigt) sowie $\Delta om14 \Delta om45$ weisen keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp auf, sondern verfügen über das normale mt Netzwerk.

Interessanterweise konnte in der Mutante $\Delta por1$ eine mt Form nachgewiesen werden, die vergleichbar mit der mt Morphologie der Teilungsmutante $\Delta fis1$ ist. Die Arbeitsgruppe von Westermann berichtete ebenfalls von einer abnormalen mt Morphologie des

Deletionsstammes $\Delta por1$ in *S. cerevisiae* [186]. Es wird daher die Vermutung aufgestellt, dass Porin bei mt Teilungsprozessen von *S. cerevisiae* beteiligt ist.

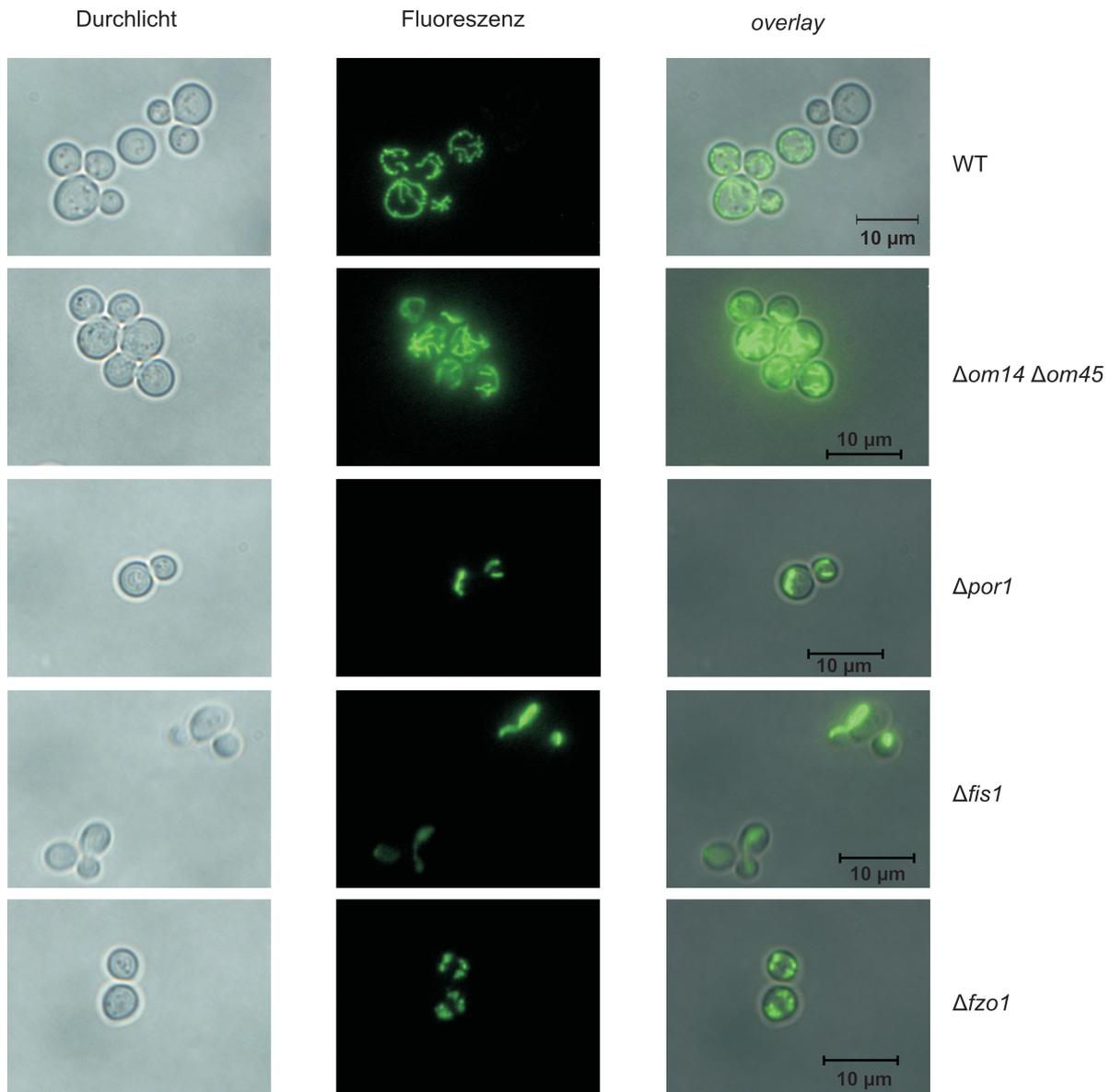


Abbildung 3.16: Analyse der mt Morphologie unter fermentativen Bedingungen

Die Deletionsmutanten $\Delta om14 \Delta om45$, $\Delta por1$, $\Delta fis1$ und $\Delta fzo1$ sowie der Wildtypstamm (WT) wurden mit dem Plasmid pYX142-mtGFP transformiert. Transformanten wurden auf Minimalmedium mit Glukose selektiert, ü. N. kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Aufnahme, wobei $n \geq 7$.

Da die Gene *OM14* sowie *OM45* bei den hier gewählten fermentativen Bedingungen (MM mit Glukose zur Plasmidselektion) im Wildtyp kaum exprimiert werden [141] könnte die Bedeutsamkeit der OM-Proteine erst auf nicht-fermentierbarem Medium sichtbar werden. Aus diesem Grund sollte die Expression der OM-Gene durch Einsatz der C-Quelle Ethanol im Wildtypstamm induziert und dessen mt Morphologie mit der der Deletionsmutanten verglichen werden.

Aufgrund des generell eingeschränkten Wachstums der Hefen in MM mit Ethanol wurde für die mt Morphologieuntersuchungen mit respiratorischen Bedingungen das Vollmedium mit Ethanol (YPE) verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst in MM mit Glukose zur Aufrechterhaltung der Plasmidselektion vorkultiviert und anschließend in YPE Medium transferiert. Nach sechs Stunden Inkubation erfolgte die mikroskopische Analyse (Abb. 3.17).

Der Wildtypstamm (WT) sowie die Kontrollstämme $\Delta fzo1$ und $\Delta fis1$ weisen die erwarteten mt Morphologien analog der vorangegangenen Untersuchung in MM mit Glukose auf (Vgl. Abb. 3.16).

Bei $\Delta por1$ ist auch bei nicht-fermentativen Bedingungen ein abnormales mt Muster nachweisbar, welches sich in einigen wenigen mt Akkumulationen äußert.

Die Mutante $\Delta om14$ zeigt ein dem Wildtyp vergleichbares, normales mt Netzwerk, wodurch die vorangegangenen Untersuchungen von Mäbert (2011) [134] bestätigt werden. Eine Deletion von *OM45* führt jedoch zu einer deutlichen Veränderung der mt Morphologie, die durch wenige punktuelle mt Formen gekennzeichnet ist. Diese punktuelle Verteilung erinnert dabei an die Fusionsmutante $\Delta fzo1$, wobei die vergleichsweise geringere Anzahl an fluoreszierenden *Spots* auffällt.

Das mikroskopische Bild der Doppeldeletion $\Delta om14 \Delta om45$ ähnelt dem der Einzelmutante $\Delta om45$, wobei das mt Netzwerk auf einige wenige Bereiche reduziert ist. Auffallend ist jedoch, insbesondere im Unterschied zur Fusionsmutante $\Delta fzo1$, dass die Ausdehnung der punktuellen Signale wesentlich stärker ist und diese daher –im Einzelnen betrachtet– eher an die mt *Cluster* einer Teilungsmutante erinnern. Möglicherweise ist dies ein Anzeichen einer lokalen Imbalance an mt Teilungs- und Fusionsvorgängen, wobei zwar einige separate mt Bereiche generiert werden können, diese jedoch infolge einer ineffizienten Teilung zu mt *Clustern* akkumulieren.

Obgleich der beschriebene mt Phänotyp in Abwesenheit von Om45p (und Om14p) nicht in allen Zellen einheitlich beobachtet werden konnte (in ca. 50% der Zellen entsprachen die Aufnahmen eher der mt Wildtyp-Morphologie), so spricht das Ergebnis für eine Funktion von Om45p unter nicht-fermentativen Bedingungen. Die inhomogene Ausprägung der mt Morphologie innerhalb der Zellpopulation könnte durch unterschiedliche Wachstumsphasen begründet werden. Insbesondere scheint die Anpassung an den Kohlenstoffwechsel von Glukose auf Ethanol (*diauxic shift*) nur von dem noch adaptionsfähigen Anteil der Population in der zur Verfügung stehenden Zeitspanne von ca. 6 h zu bewerkstelligen zu sein. Eine Funktion der Proteine im Zeitfenster der metabolischen Adaptation an die nicht-fermentative Lebensweise könnte daher diskutiert werden.

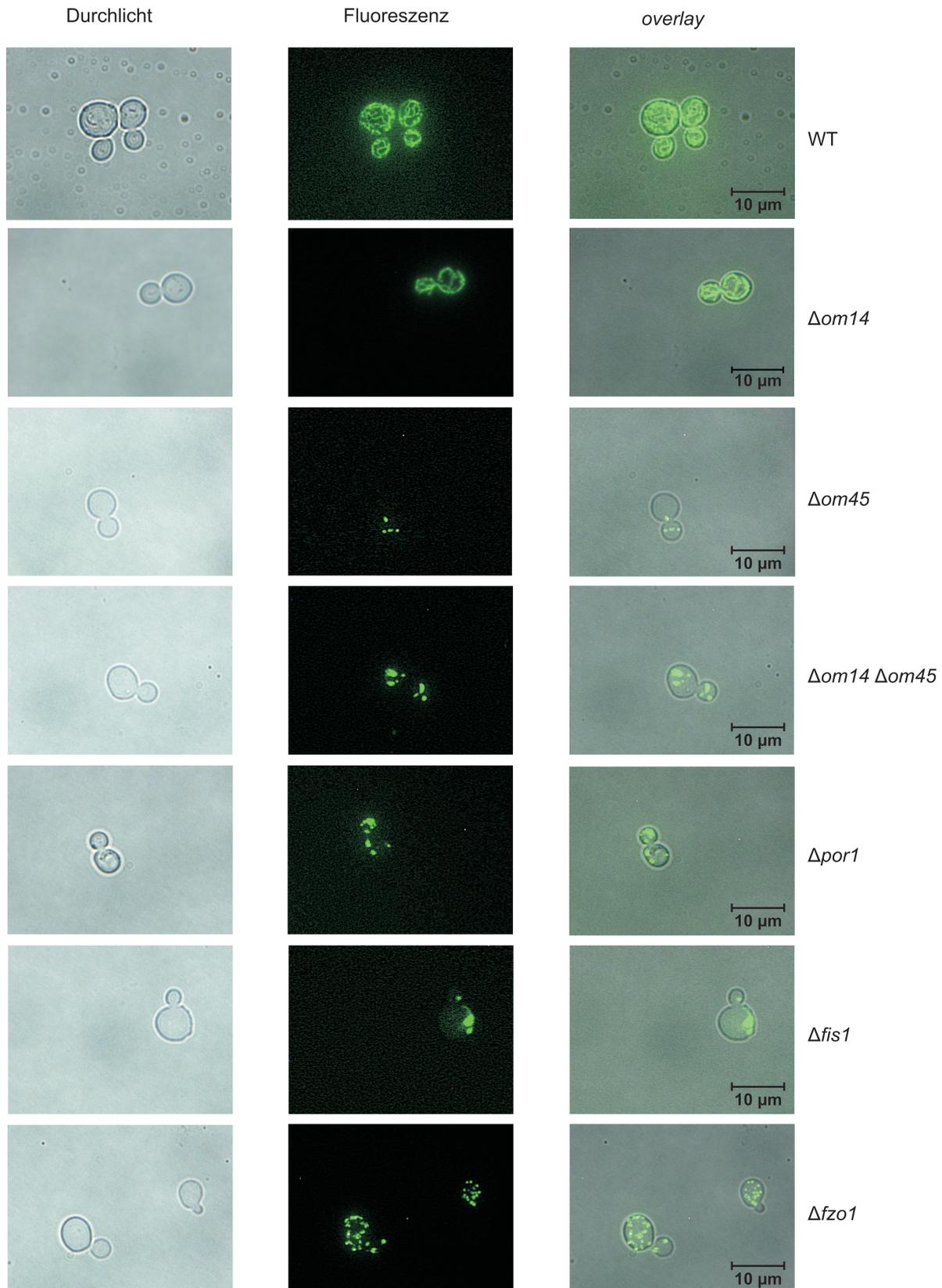


Abbildung 3.17: Analyse der mt Morphologie mit respiratorischen Bedingungen

Die Deletionsmutanten $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$, $\Delta por1$, $\Delta fis1$ und $\Delta fzo1$ sowie der Wildtypstamm (WT) wurden mit dem Plasmid pYX142-mtGFP transformiert. Transformanten wurden auf Minimalmedium selektiert und ü. N. kultiviert. Vor der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte eine weitere Kultivierung für 6 h in YPE. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Aufnahme, wobei $n \geq 7$.

3.3.2 Auswirkungen von *OM14* / *OM45*-Gendeletionen auf das mt Proteom

Zur Beantwortung der Frage, ob die Abwesenheit von Om14p und /oder Om45p einen Einfluss auf andere mt Proteine hat, wurden 2D IEF - SDS-PAGE Separationsprofile der Einzeldelentionsmutanten $\Delta om14$ und $\Delta om45$ sowie des Doppeldelentionsstammes $\Delta om14 \Delta om45$ mit dem des Wildtyphefestammes verglichen. Für eine zuverlässige Quantifizierung wurde der 2D DIGE Ansatz (Kapitel 2.5.10) gewählt.

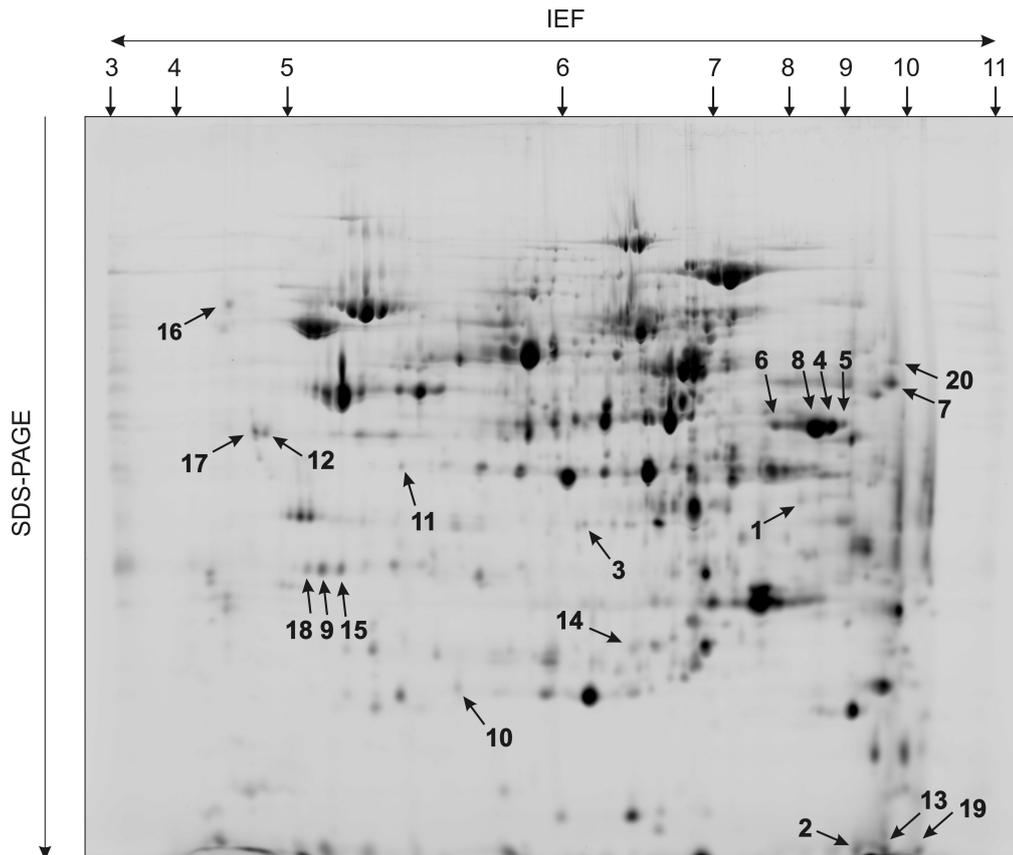


Abbildung 3.18: Analyse des mitochondrialen Proteoms

50 μg enzymatisch isolierte und zweifach Gradienten-gereinigte mt Proteine wurden fluoreszenzmarkiert und entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte (IEF, pH 3-11, nicht linear) separiert. Anschließend wurden die Proteine in einer zweiten Dimension entsprechend ihrer Molekulargewichte in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignale der markierten Proteine wurden mit einem *Typhoon Trio Scanner* detektiert und mittels der *Delta2D 4.0 Software* analysiert und quantifiziert. Mit dem 2D DIGE Verfahren wurden die mt Proteome der Deletionsstämme $\Delta om14$, $\Delta om45$ bzw. $\Delta om14 \Delta om45$ mit dem des Wildtypstammes verglichen. Eine Aufnahme des mt Wildtypproteoms ist exemplarisch dargestellt. Die nummerierten Proteinsignale wiesen bei den Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp mindestens eine zweifache Veränderung der Signalintensität auf und wurden mittels MALDI-TOF/TOF MS identifiziert.

Eine mit der 2D DIGE-Methode aufgetrennte, enzymatisch isolierte und zweifach Gradienten-gereinigte Mitochondrienfraktion wies im Durchschnitt etwa 500 Proteinsignale auf (Vgl. Abb. 3.18, exemplarische Darstellung einer Wildtypprobe). Bei einem Vergleich der Fluoreszenzsignale der Deletionsstämme mit denen des Wildtypstammes

fielen 20 Protein-*Spots* auf, die einen Fluoreszenzintensitätsunterschied von mindestens zweifach aufwiesen (nummerierte Proteinsignale in Abb. 3.18). Diese Proteine wurden mittels MALDI-TOF/TOF MS identifiziert (MS-Daten in Tab. C.3 im Anhang C).

Zunächst wurde der Fokus der Analysen auf die Abhängigkeit der OM-Proteine untereinander gelegt: Om45p wurde interessanterweise in vier verschiedenen, horizontal angeordneten, Proteinsignalen (5, 4, 8 und 6 in Abb. 3.18) mit pI-Werten von ca. 9,0 / 8,8 / 8,6 und 7,8 nachgewiesen. Diese verschiedenen Formen von Om45p könnten durch posttranslationale Modifikationen des Proteins, wie z. B. Proteinphosphorylierung (Vgl. Kapitel 3.1.3), hervorgerufen werden. Die Fluoreszenzintensitäten der Om45p-*Spots* waren erwartungsgemäß in der Einzel- ($\Delta om45$) sowie in der Doppelmutante ($\Delta om14 \Delta om45$) stark reduziert (- 5,8 bis - 24,6 bzw. - 4,5 bis - 16,0). Im Deletionsstamm $\Delta om14$ wiesen die Signale von Om45p eine um etwa 50 % reduzierte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtypstamm auf (Vgl. Tab. C.3). Dies stimmt mit den 1D Analysen der *steady state* Konzentration von Om45p im Deletionsstamm $\Delta om14$ überein (Vgl. Abb. 3.12).

Mittels MS-Untersuchungen des Protein-*Spots* 13 (Vgl. Abb. 3.18, sowie Tab. C.3) wurden zwei Proteine (Om14p und Pam17p) nachgewiesen. Die Co-Migration von Pam17p interferiert mit der Quantifizierung von Om14p, so dass zwar im Vergleich zum Wildtypstamm eine Reduktion des Fluoreszenzsignals in den Mutanten $\Delta om14$ und $\Delta om14 \Delta om45$ mit einem Faktor von - 2,7 bzw. - 3,0 ersichtlich ist, diese aber im Ausmaß nicht der einer Deletion entspricht (Vgl. Fluoreszenzsignalunterschiede von Om45p in dessen Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtypstamm in Tab. C.3). Zusätzlich war der Nachweis von Om14p in dem 12 %-igen SDS-PAA-Gel der 2D DIGE durch das niedrige MW von Om14p erschwert.

Unter den 20 mit MS analysierten Protein-*Spots*, die in den mt Proben der Deletionsstämme einen mindestens zweifachen Fluoreszenzintensitätsunterschied zur Wildtypprobe aufwiesen, konnte Porin nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich wird Porin durch die Abwesenheit von Om14p und / oder Om45p in seiner Abundanz nicht beeinflusst. Dies entspricht auch den vorangegangenen 1D Analysen der *steady state* Konzentrationen von Deletionsmutanten (Vgl. Abb. 3.12).

Eine weitere Fragestellung bei der Auswertung der 2D DIGE Untersuchung war, welche weiteren Änderungen das mt Proteom aufgrund des Fehlens der Proteine Om14p und / oder Om45p aufweist. In der Tabelle 3.1 sind die mittels MS identifizierten und in ihrer Konzentration veränderten (Grenzwert: zweifach) Proteine mit zusätzlichen Proteininformationen aufgelistet. Die Daten der Proteine Om14p und Om45p wurden dabei ausgelassen.

Tabelle 3.1: Veränderungen des mit Proteoms der Stämme $\Delta om14$, $\Delta om45$ und $\Delta om14 \Delta om45$ im Vergleich zum Wildtypstamm. Proteinsignale mit Veränderungen in ihrer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtypstamm (Grenzwert: zweifach; - verringert, + verstärkt) in 2D DIGE-Gelen (Abb. 3.18) wurden mit MALDI-TOF/TOF MS analysiert (Tab. C.3 im Anhang C). Subzelluläre Lokalisation: ER, Endoplasmatisches Retikulum; M, Mitochondrien (IMS, Intermembranraum; IM, innere Membran; MA, Matrix); Z, Zytoplasma; ZK, Zellkern; Δ , Änderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp ($n \geq 2$); ROS, reaktive Sauerstoffspezies

Spot-Nr.	Protein	Δ	Lokal.	Enzym / Funktion	Referenzen
$\Delta om14$ & $\Delta om14 \Delta om45$					
1	Tdh1p	-4,3 bzw. -18,2	Z	Isoenzym 1 der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, in YPE Glukoneogenese	[187]
3	Lsc1p	-3,1 bzw. -3,5	MA	α -UE der Succinyl-CoA Ligase, Zitratzyklus	[188]
2	Cbp4p	-3,2 bzw. -2,5	IM	spezifischer Assemblierungsfaktor des Atmungskettenkomplexes III	[189, 190]
$\Delta om45$ & $\Delta om14 \Delta om45$					
14	Prx1p	+2,3 bzw. +2,8	M	Thioredoxin Peroxidase, reduziert Hydroperoxide, oxidative Stressantwort	[191]
15	Ccp1p (vers. Formen)	-5,8 bis -2,3	IMS	Cytochrom c Peroxidase, baut ROS ab, oxidative Stressantwort	[192]
7	Tef2p	-4,8 bzw. -5,9	Z	Elongationsfaktor EF-1 α , Translation	[193]
nur in $\Delta om14 \Delta om45$					
10	Pst2p	-4,7	M	Flavodoxin-ähnliches Protein, oxidative Stressantwort	[194, 195]
11	Qcr2p	-3,7	IM	UE II des mt Atmungskettenkomplexes III, oxidative Phosphorylierung	[196]
12	Lsp1p	-3,4	Z	Komponente der Eiosomen, Endozytose und Hitzestressantwort	[197]
16	Pdi1p	-2,6	ER	Protein-disulfid-Isomerase, Bildung von Disulfidbrücken	[198]
17	Pil1p	-2,6	Z	Komponente der Eiosomen, Endozytose und Hitzestressantwort	[197]
19	Htb1p	-2,4	ZK	Histon H2B, Chromatinassemblierung	[199]
20	Hem14p	-2,3	IM	Protoporphyrinogen Oxidase, Häm biosynthese	[200, 201]

Insgesamt konnten 13 Proteine identifiziert werden, die durch die Gendeletionen *OM14* und / oder *OM45* beeinflusst werden. Darunter befanden sich sieben mt Proteine (Cbp4p, Ccp1p, Hem14p, Lsc1p, Prx1p, Pst2p und Qcr2p), wobei Ccp1p durch seine Lokalisation im IMS einem direkten Einfluss des OM-Komplexes unterliegen könnte.

Obwohl die Reinheit der enzymatisch isolierten und zweifach Gradienten-gereinigten mt Fraktion mit Antikörpern gegen das zytoplasmatische Protein Pgc1p bestätigt wurde (Vgl. Abb. 3.2), befinden sich unter den 13 untersuchten Proteinen auch 6, die laut Datenbanken nicht im Mitochondrium lokalisiert sind. Vier Proteine (Lsp1p, Pil1p, Tdh1p und Tef2p) befinden sich im Zytoplasma der Zelle, eins (Pdi1p) im ER und Htb1p im Zellkern. Diese Proteine könnten aufgrund einer starken Proteinkonzentration Kontaminationen der isolierten mt Fraktion darstellen. Die vier zytosolischen Proteine sind aber möglicherweise auch mit der mt OM assoziiert. Ein Nachweis der Proteine Lsp1p und Pil1p in isolierten und Gradienten-gereinigten mt Fraktionen erfolgte beispielsweise bereits durch Sickmann *et al.* (2003) [166] und Zahedi *et al.* (2006) [202]. Zudem könnten Proteine anderer Organellen funktionell mit dem Mitochondrium assoziiert sein. Dies spricht v. a. für Pdi1p, welches schon öfter in mt Proben identifiziert wurde (siehe Abb. 3.9 und 2D aufgetrennte mt Hefeproteomanalysen von Fountoulakis *et al.* (2002) [203] sowie Ohlmeier *et al.* (2004) [141]) und die Interaktion zwischen ER und Mitochondrium [27] bestätigen würde. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die identifizierten nicht-mitochondrialen Proteine eine duale oder andere als beschriebene Lokalisation aufweisen.

Zur besseren Übersicht, insbesondere zur Verdeutlichung von co-regulierten Proteinen, wurde zusätzlich eine Mengen-abhängige Darstellung, in Form eines Venn-Diagramms, der durch das Fehlen von Om14p und / oder Om45p beeinflussten Proteine gewählt (Abb. 3.19).

Auffallend ist, dass eine Deletion von *OM14* bzw. *OM45* zu keiner Überlappung von beeinflussten Proteinen führt. Om14p und Om45p können demzufolge keine redundanten Funktionen einnehmen. Aufgrund deren Interaktion sowie der Om45p-Abhängigkeit von Om14p scheinen beide Proteine vielmehr synergistische Rollen einzunehmen.

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Einzeldelationen sind alle Proteine mit veränderter Signalintensität auch im Doppeldeletionsstamm $\Delta om14 \Delta om45$ betroffen.

Fehlen beide OM-Proteine, so wurden sieben zusätzliche Proteine identifiziert, die in ihrer Abundanz mindestens um den Faktor zwei vom Wildtypstamm abweichen.

Gemeinsamkeiten der beeinflussten Proteine sowie Schlussfolgerungen zu den Proteinfunktionen von Om14p und Om45p werden im Diskussionsteil dieser Arbeit erörtert.

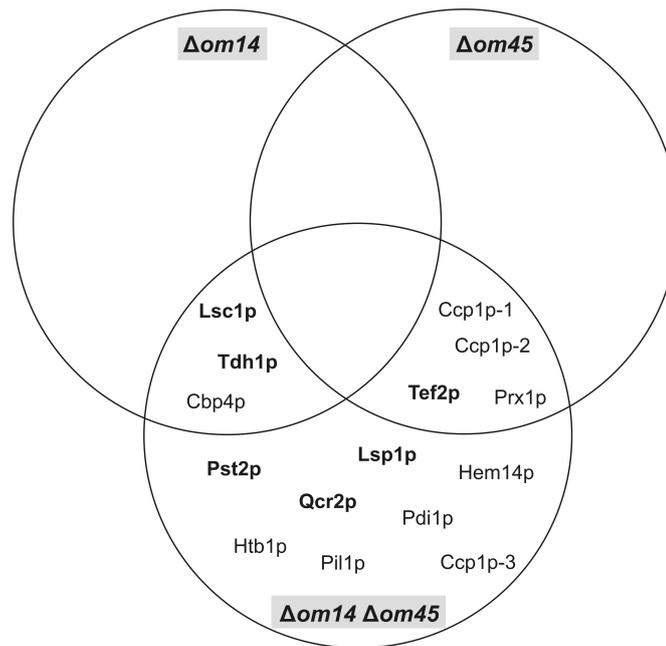


Abbildung 3.19: Mengen-abhängige Darstellung der durch OM14 und / oder OM45-Deletion beeinflussten Proteine

Die 13 mit MALDI-TOF/TOF MS identifizierte Proteine, die in den Deletionsstämmen $\Delta om14$, $\Delta om45$ bzw. $\Delta om14 \Delta om45$ im Vergleich zum Wildtypstamm Fluoreszenzsignalunterschiede größer zweifach aufwiesen sind in einem Venn-Diagramm Mengen-abhängig dargestellt. Fett gedruckte Proteinamen verdeutlichen Signalunterschiede mit einem Schwellenwert größer dreifach.

3.3.3 Mitochondrialer Transport von TBHP

Als funktionaler Test sollte der mt Import einer toxischen Substanz, deren Wirkort innerhalb der Mitochondrien liegt, analysiert werden. D. h. bei einer Importinterferenz, ausgelöst durch das Fehlen von mt Proteinen, sollte eine geringere Toxizität der Substanz ermittelt werden können.

Das starke Oxidationsmittel *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) führt zu einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase, Verarmung des Glutathion-Speichers und oxidiert funktionell wichtige SH-Gruppen sowie Fe-S-Cluster von verschiedenen mt Enzymkomplexen [204–207]. Zudem werden durch TBHP mt Membranlipide peroxidiert, was eine veränderte mt Membranintegrität und ein vermindertes Membranpotential zur Folge hat [208, 209].

Durch die zahlreichen v. a. mt Angriffspunkte von TBHP kann geschlussfolgert werden, dass TBHP gezielt in die Mitochondrien eindringt. Da die Porinpore für die verschiedensten Moleküle der Eintrittspunkt durch die mt OM ist, könnte der identifizierte OM-Komplex einen Einfluss auf den TBHP-Einlass haben. Die oxidativen Schädigungen durch TBHP führen ab einer bestimmten Konzentration zum Zelltod. Durch Wachstumsanalysen in Gegenwart von TBHP sollte geprüft werden, ob es Unterschiede der TBHP-Toleranz zwischen Deletionsmutanten und dem Wildtypstamm gibt (Abb. 3.20). Mit diesen Untersuchungen können indirekt Rückschlüsse auf den mt Import von TBHP gezogen werden.

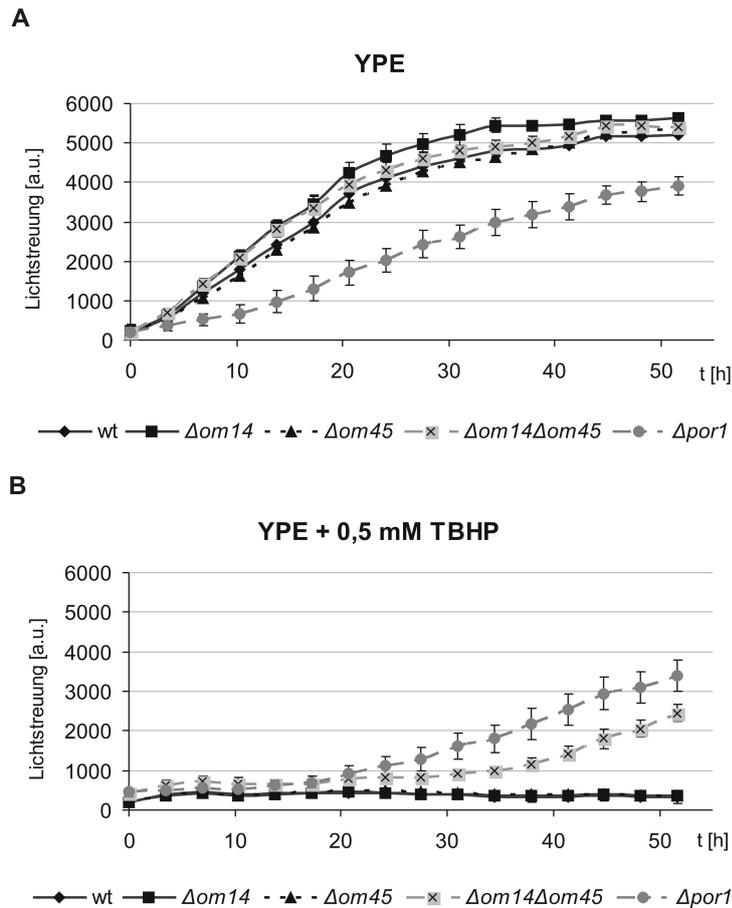


Abbildung 3.20: Hefewachstum in Gegenwart von TBHP

Der Wachstumsverlauf der Deletionsstämmen $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ und $\Delta por1$ sowie des Wildtyps (WT) wird durch die Lichtstreuung über der Zeit wiedergegeben. Die Kultivierung wurde mit jeweils 10^4 Zellen pro well einer 96-well-Platte mit je $200 \mu\text{l}$ nicht-fermentierbarem YPE in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von $0,5 \text{ mM}$ TBHP gestartet. Die Lichtstreuung wurde mit dem *NEPHELOstar Galaxy* aufgenommen. Es wurden drei unabhängige Nephelometerläufe mit jeweils drei Replikaten durchgeführt. Die Mittelwertabweichungen der einzelnen Messwerte sind dargestellt.

In YPE (ohne die Anwesenheit von TBHP, Abb. 3.20 A) wachsen die Deletionsstämmen $\Delta om14$, $\Delta om45$ und $\Delta om14 \Delta om45$ in vergleichbarer Weise wie der Wildtypstamm. Die Mutante $\Delta por1$ wächst langsamer und erreicht innerhalb der untersuchten 50 Kultivierungsstunden die Biomasse des Wildtyps nicht. Diese Beobachtungen entsprechen den Wachstumsanalysen in Abb. B.4 im Anhang B.

Befindet sich im YPE-Medium zusätzlich $0,5 \text{ mM}$ TBHP (Abb. 3.20 B), so führt dies beim Wildtyp und bei den Einzeldelentionsstämmen $\Delta om14$ und $\Delta om45$ gleichermaßen zu einer Wachstumsretardation.

Im Gegensatz dazu toleriert die Deletionsmutante $\Delta por1$ und in einem etwas geringeren Maße auch die Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ die Präsenz toxischer Konzentrationen von TBHP. Eine Erklärung könnte sein, dass der Import von TBHP in Abwesenheit

der Porinpore im Stamm $\Delta por1$ weniger effizient stattfindet und nur eine tolerierbare TBHP-Konzentration den mt Wirkort erreicht.

Das gleiche Szenario könnte auch für die Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ gelten, wobei nur die Abwesenheit beider Proteine (Om14p und Om45p) zur Beeinträchtigung des Imports von TBHP führt. Da die Einzeldelationen keine Auswirkungen zeigen, belegt dies das funktionelle Zusammenspiel der beiden OM-Proteine. Die Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine kooperative Funktion der Proteine Om14p und Om45p beim mt Metabolit-Import. Zudem wird eine funktionelle Verbindung zum Interaktionspartner Por1p angedeutet.

3.3.4 Mitochondrialer ADP / ATP-Transport

Die vorhergehenden Ergebnisse der Om14p / Om45p-Beteiligung am mt Metabolit-Import (Vgl. Kapitel 3.3.3) und die Daten zur Interaktion mit mt Transportproteinen (Aac2p, Mir1p, Sfc1p und Yhm2p; siehe Abb. 3.15) lassen vermuten, dass die OM-Proteine möglicherweise auch beim Austausch von mt bzw. zytoplasmatischen ATP und ADP beteiligt ist.

Um dieser Annahme nachzugehen, sollte das Wachstum der Deletionsmutanten bei Anwesenheit eines spezifischen Inhibitors des ADP / ATP-Transporters Aac2p im Vergleich zum Wildtypstamm untersucht werden.

Darüber hinaus war das Ziel dieser Arbeit, eine Nachweismethode zu etablieren, die es erlaubt, den Export von mt gebildetem ATP anhand isolierter Mitochondrien zu bestimmen.

Blockierung des ADP / ATP - Transporters Aac2p durch BKA

Ein spezifischer, nicht kompetitiver Inhibitor des ADP / ATP-Transporters (Aac2p) ist die lipophile Bongkreksäure (BKA). Sie ist in der Lage, in ihrer protonierten Form bei einem sauren pH-Wert, durch biologische Zellmembranen zu diffundieren und von der mt Matrixseite aus einen Komplex mit Aac2p einzugehen [101–103].

Wachstumsanalysen in Gegenwart von BKA unter nicht-fermentativen Bedingungen wurden analog zu Zeman *et al.* [103] auf YPGCE-Platten mit einem pH-Wert von vier durchgeführt (Abb. 3.21).

Bei dem Wachstum der untersuchten Deletionsstämme ohne Inhibitor ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Abb. 3.21). Lediglich $\Delta por1$ wächst auf YPGCE-Platten analog zu den bereits beschriebenen nicht-fermentierbaren Medien YPE und YPG etwas langsamer (Vgl. Abb. B.4).

In Gegenwart von $0,125 \mu\text{M}$ BKA sind nach drei Tagen im Unterschied zur Platte ohne BKA deutlich weniger Hefen auf den Platten nachweisbar. Alle Hefestämme wachsen

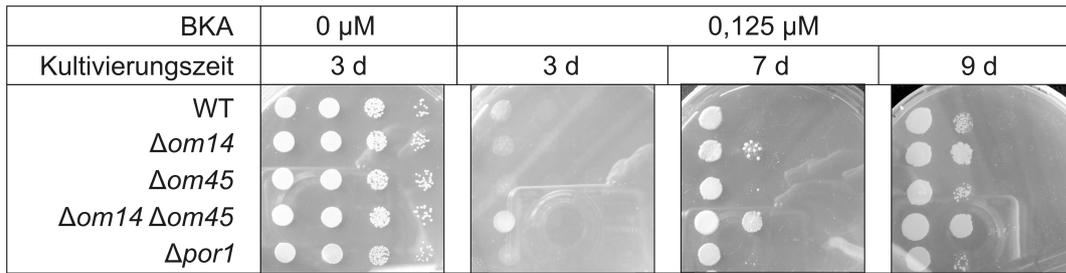


Abbildung 3.21: Hefewachstum in Gegenwart von BKA

Das Wachstum der Deletionsmutanten $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ und $\Delta por1$ sowie des Wildtypstamms (WT) wurde auf YPGCE-Platten (pH 4,0) mit der angegebenen BKA-Konzentration über einen Zeitraum von neun Tagen beobachtet. In jeder Zeile wurden initial jeweils 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 (von links nach rechts) Zellen aufgebracht. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30° C.

demzufolge wie erwartet bei BKA-Anwesenheit deutlich langsamer.

Bereits nach einer Inkubation von drei Tagen ist bei der höchst eingesetzten Zellkonzentration bei der Doppeldeletion $\Delta om14 \Delta om45$ jedoch ein Wachstum nachweisbar. Nach einer Inkubationszeit von sieben bzw. neun Tagen wird der Unterschied zwischen den getesteten Stämmen deutlicher sichtbar. Bei den Mutanten $\Delta om14$ und besonders ausgeprägt bei der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ sind bei einer initialen Zellzahl von 10^3 im Gegensatz zum Wildtypstamm deutliche bzw. größere Hefekolonien zu erkennen. Diese beiden Stämme wachsen demzufolge deutlich schneller als der Wildtyp und tolerieren höhere BKA-Konzentrationen.

Bei der Aufnahme der YPGCE-Platte mit 0,125 μM BKA nach sieben Tagen Kultivierung ist bei $\Delta om14$ zu erkennen, dass nicht alle Hefekolonien gleich schnell wachsen. Ca. 1% der Hefen wächst deutlich schneller, was an den größeren weißen Hefekolonien zu erkennen ist. Dieses Phänomen könnte durch genetische Unterschiede des Ausgangsmaterials, die zu einer verstärkten BKA-Toleranz führen, erklärt werden.

Dass $\Delta om14$ schneller als der Wildtypstamm, aber dennoch langsamer als die Doppelmutante wächst, liegt höchst wahrscheinlich daran, dass die Deletion von *OM14* auch zu einer ca. zweifachen Reduktion von *Om45p* führt (Vgl. Abb. 3.12 sowie Tab. C.3 im Anhang C).

Der hiermit beobachtete Phänotyp der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ weist erneut auf eine funktionelle Kooperation der Proteine *Om14p* und *Om45p* hin. Anders als bei der TBHP-Toleranz (Abb. 3.20) korreliert die hier nachgewiesene BKA-Toleranz der Doppelmutante jedoch nicht mit der von $\Delta por1$. Somit scheint in diesem Fall nicht die Porinimportpore *per se* betroffen zu sein. Vielmehr deutet sich eine spezifische Rolle von *Om14p* und *Om45p* in Bezug auf den ADP / ATP-Transporter *Aac2p* bzw. eine Verbindung mit dem Inhibitor BKA an.

Mitochondrialer ATP-Export

Die Messung von ATP erfolgt im Allgemeinen durch Verwendung einer Luciferase, die unter ATP-Verbrauch Luciferin zu Oxygluciferin umsetzt. Die dabei frei werdende Energie wird in Licht umgewandelt. Das messbare Lumineszenzsignal ist hierbei proportional zur ATP-Menge, wodurch Aussagen zum ATP-Gehalt einer Probe getroffen werden können [210, 211].

Die Fragestellung in dieser Arbeit war, ob mit dem Luciferase-System der ATP-Export von isolierten Mitochondrien ins umgebende Medium bestimmbar ist.

Etablierung einer Nachweismethode

Da die kommerziell verfügbaren ATP-Assays üblicherweise membranlysierende Detergenzien in den Puffern beinhalten, wurde zunächst in Zusammenarbeit mit der Firma PJK ein detergenzfreies System entwickelt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die isolierten Mitochondrien während der Messung intakt bleiben.

Die zu untersuchenden Mitochondrien wurden für die Messung in eine Vertiefung einer 96-well-Platte in einen osmotisch stabilisierenden Reaktionspuffer in Anwesenheit von Phosphationen vorgelegt und mit der Luciferase versetzt. Die dabei entstehende Lumineszenz ist auf noch vorhandenes ATP in den Proben zurückzuführen. Nachdem die Lumineszenzsignale stagnierten wurde durch Zugabe von β -NADH die mt Atmungskette aktiviert. Anschließend wurde exogenes ADP zugesetzt. In Abhängigkeit von ADP / ATP-Import- und Export- sowie ATP-Syntheseleistungen kann der extramitochondriale Anteil an ATP durch Messung der Lumineszenzsignale ermittelt werden. Dem Kapitel 2.5.15 kann der etablierte Versuchsverlauf entnommen werden.

Messungen von Wildtypproben in Kombination mit spezifischen Inhibitoren der mt Atmungskette oder des ADP / ATP-Transporters, Detergenzien sowie der Vergleich von Signalverläufen in Ab- und Anwesenheit von isolierten Mitochondrien sollten die Spezifität des Nachweisverfahrens dokumentieren (Abb. 3.22).

Um zu zeigen, dass die Lumineszenzsignale durch die eingesetzten Mitochondrien erzeugt werden, wurden ATP-Messungen mit bzw. ohne Mitochondrien durchgeführt (Abb. 3.22 A). Es ist deutlich zu erkennen, dass es in Gegenwart von Mitochondrien (rote und gelbe Kurve) nach ADP-Zugabe zu einem starken Lumineszenzanstieg kommt, wobei allerdings die Anstiege der gleichen Probe etwas schwanken. Die schwache Erhöhung des Signals in den Proben ohne Mitochondrien (blaue Kurven) ist wahrscheinlich durch teilweise mit ATP kontaminiertes ADP zu erklären, da mit erhöhten ADP-Konzentrationen auch höhere Lumineszenzwerte erzeugt wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Lumineszenzmessungen vor der ADP-Zugabe weisen keine deutlichen Signalanstiege auf. Aus diesen Daten kann daher geschlossen werden, dass mit dem durchgeführten

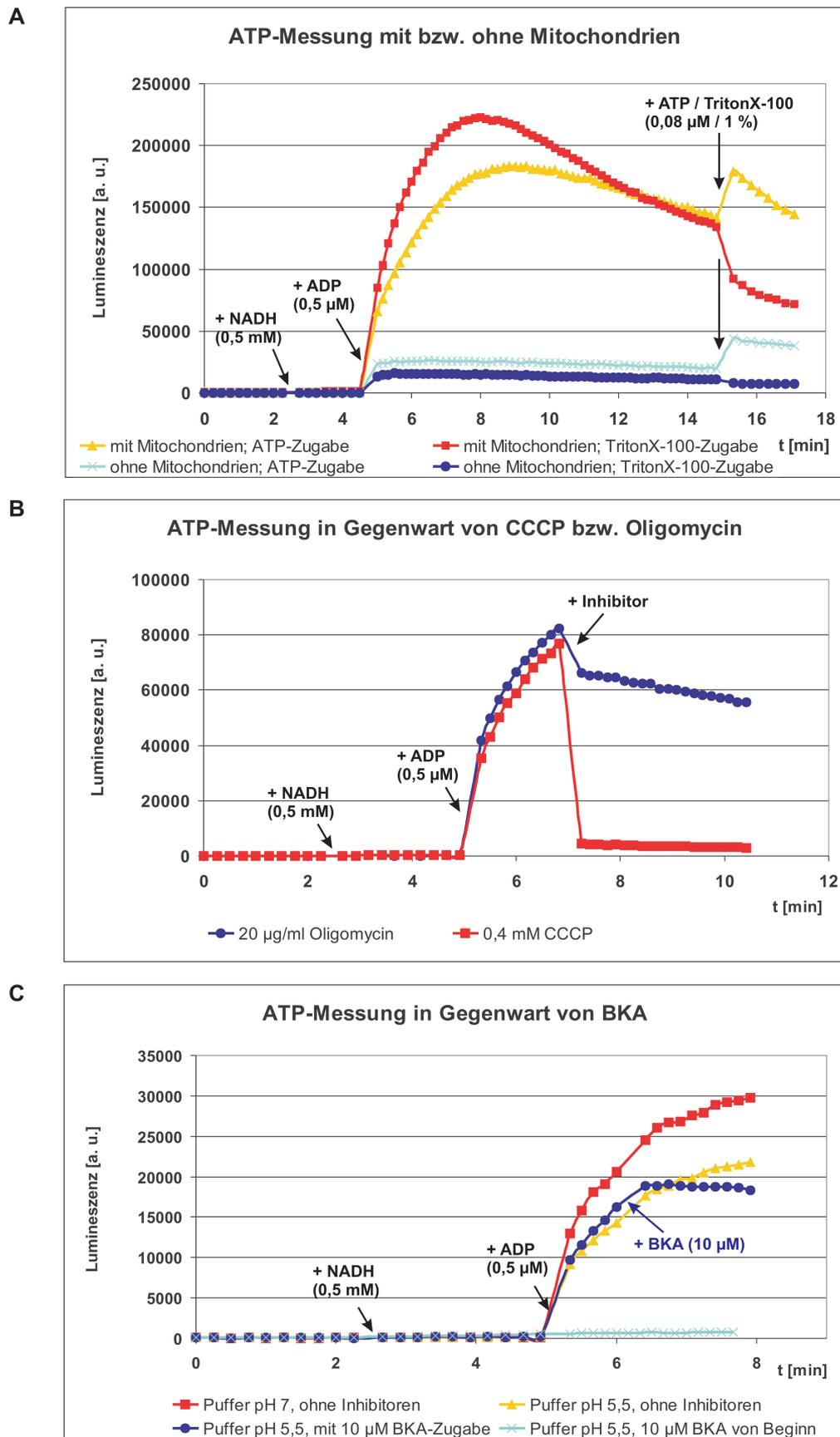


Abbildung 3.22: Evaluation des ATP-Nachweises

In den Vertiefungen einer 96-well Platte wurden jeweils $20\ \mu\text{l}$ Mitochondrienpuffer mit $5\ \mu\text{l}$ enzymatisch isolierten Mitochondrien ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) des Wildtypstammes sowie $100\ \mu\text{l}$ des mit Luciferase aktivierten *ATP Glow Juice* vorgelegt. Die ATP-Messungen erfolgten durch Aufnahme der Lumineszenz gegenüber der Zeit mit dem Gerät *Infinite[®] 200* (Tecan). Die Zeitpunkte sowie die Endkonzentrationen der hinzugegebenen Substrate (NADH und ADP) sowie Inhibitoren sind dargestellt.

Testverfahren ATP gemessen wird, das aus den Mitochondrien stammt.

Die Zugabe von ATP nach 15 minütiger Messung (Abb. 3.22 A, gelbe und hellblaue Kurve) führt erneut zu einem Lumineszenzanstieg. Dies macht deutlich, dass die Luciferase nach 15 min noch immer aktiv ist.

Die Zugabe des Detergenz TritonX-100 (Abb. 3.22 A, rote und dunkelblaue Kurve) führt zu einem Absinken des Lumineszenzsignals. Daraus könnte gedeutet werden, dass die mt ATP-Synthese direkt mit dem ATP-Export gekoppelt ist. Offenbar wird kein ATP in der mt Matrix gelagert, das durch das Aufbrechen der Mitochondrien gemessen werden würde.

Um zu belegen, dass die Lumineszenzsignale von einer *de novo* ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung stammen, wurden die Inhibitoren Oligomycin und CCCP eingesetzt. Das Ionophor CCCP zerstört das Membranpotential und führt dadurch zu einer Entkopplung der Protonenpumpmaschinerie von der ATP-Synthese [212]. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase indem es den Protonenfluss durch die F₀-Untereinheit blockiert [213].

Werden diese Inhibitoren während des linearen Signalanstiegs zu den Proben hinzugefügt, so kommt es bei beiden Substanzen sofort zu einem Absinken des Lumineszenzsignals (Abb. 3.22 B). Dies beweist, dass das gemessene ATP *de novo* synthetisiert wurde und auf die Aktivität der ATPase zurückgeführt werden kann. Der sofort messbare ATP-Mangel untermauert die Vermutung, dass der ATP-Export mit der ATP-Synthese eng gekoppelt ist.

Ein Beweis der Spezifität des Testverfahrens, bezogen auf den ATP-Export, sollte mit Messungen in Gegenwart eines Inhibitors des Transporters Aac2p erbracht werden. Eine Blockierung des ATP-Transports kann, wie oben schon erwähnt, durch die Substanz BKA erfolgen. Da BKA nur im protonierten Zustand die mt Membran passieren kann, wurde der Mitochondrienpuffer auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt (Abb. 3.22 C).

Ein Vergleich der ATP-Messung von Wildtypmitochondrien ohne BKA im normalen Puffer (pH ca. 7; rote Kurve) mit dem sauren Puffer (durch Zugabe des *ATP Glow Juice* finaler pH ca. 5,5; gelbe Kurve) zeigt, dass der Anstieg der Lumineszenz im sauren pH-Bereich etwas langsamer verläuft. Dies kann durch die pH-Abhängigkeit der Luciferase erklärt werden [210].

Wird BKA während des linearen Lumineszenzanstiegs hinzugegeben (dunkelblaue Kurve), so kommt es sofort zu einem Stillstand des Signalanstiegs, wohingegen ohne BKA das Signal weiter zunimmt (gelbe Kurve). Wird BKA zu Beginn der Messung den Mitochondrien hinzugefügt, so wird der ATP-Transporter über den gesamten Messverlauf blockiert und es kann kein Lumineszenzsignal detektiert werden (hellblaue Kurve). Diese Daten belegen, dass das detektierte Lumineszenzsignal tatsächlich auf exportiertes ATP

zurückzuführen ist.

Da Aac2p auch für den mt ADP-Import zuständig ist, kann mit dem hier entwickelten Testverfahren allerdings nicht zwischen ATP-Synthese (die den ADP-Import benötigt) und ATP-Export differenziert werden.

Die Absolutwerte der Lumineszenzsignale in den Teilabbildungen A, B und C weichen stark voneinander ab. Die verschiedenen Messungen wurden nicht parallel durchgeführt, sondern nacheinander im Zeitrahmen von ca. zwei Monaten. Da die Luciferase-Aktivität vermutlich aufgrund von einsetzender Instabilität mit der Zeit abnimmt, können die Werte nicht miteinander verglichen werden.

Mit dem so etablierten und validierten System sollten im Folgenden ATP-Messungen von Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtypstamm durchgeführt werden, um Aussagen zum mt ATP-Fluss bezüglich der OM-Proteine treffen zu können.

***in vitro* Analyse des mt ATP-Flusses von Deletionsmutanten**

Für die Messung des mt ATP-Flusses wurden Mitochondrienfraktionen enzymatisch isoliert und gleiche Proteinkonzentrationen eingesetzt. Dennoch können die Proben unterschiedlich stark mit z. B. zytoplasmatischen Proteinen kontaminiert sein, zumal für diesen Versuch keine Saccharose-Gradientenreinigung der Mitochondrien erfolgte. Die Aktivitätsbestimmung der in der Matrix lokalisierten Zitratsynthase (siehe Kapitel 2.5.14) sowie der immunologische Nachweis und die Quantifizierung von Cit1p (eine UE der Zitratsynthase) in den mt Proben war daher wichtig, um den später ermittelten Lumineszenzanstieg pro Minute auf gleiche mt Enzymaktivitäten normieren zu können. Der Gehalt von Cit1p sowie die Aktivität der Zitratsynthase in den isolierten Mitochondrienfraktionen der Deletionsmutanten $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ und $\Delta por1$ entsprach mit $\pm 17\%$ dem der Wildtyphefe (Daten nicht gezeigt), so dass eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben gegeben war.

Als Maß für den ATP-Export aus isolierten Mitochondrienfraktionen wurden die linearen Anstiege der Lumineszenzintensität nach der ADP-Zugabe mit der *Software Microsoft® Office Excel 2003* ermittelt. Die Anstiege können als Angaben des ATP-Exports pro Minute in den extramitochondrialen Puffer angesehen werden. Damit die Werte der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden konnten, wurde eine Normierung mit den Werten der Zitratsynthaseaktivität durchgeführt.

Der ermittelte extramitochondriale ATP-Export entspricht in den Stämmen $\Delta por1$ sowie $\Delta om45$ mit Abweichungen von $\pm 5\%$ dem des Wildtypstammes (Abb. 3.23). Interessanterweise konnte bei $\Delta om14$ pro Minute nur etwa 64% ATP im Vergleich zum Wildtyp im umgebenden Medium detektiert werden. Bei der Doppelmutante $\Delta om14$

$\Delta om45$ waren es sogar nur noch ca. 55 %. Beide Werte sind im Vergleich zur Wildtyphefe signifikant reduziert (mit $p \leq 0,01$; $n = 3$).

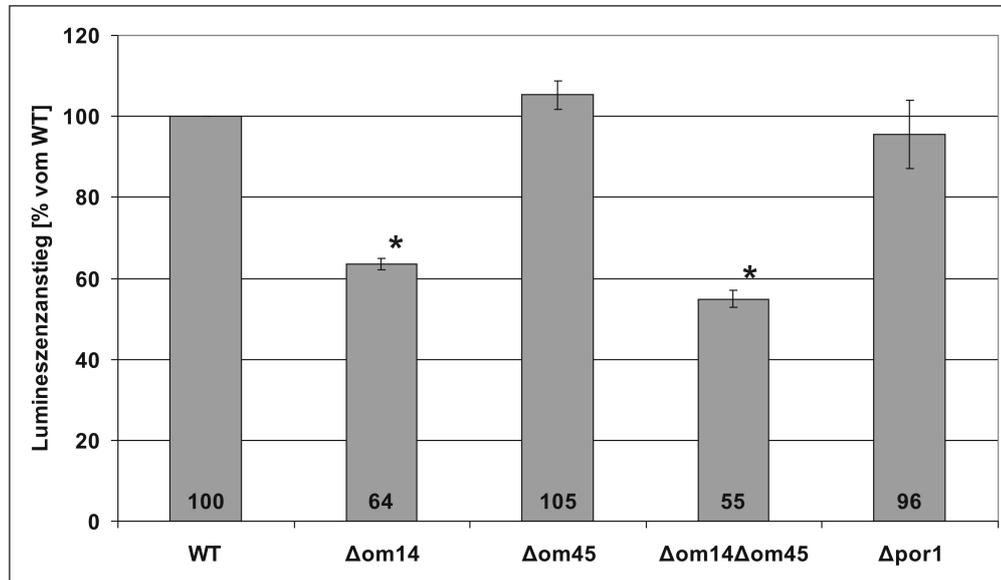


Abbildung 3.23: Mitochondrialer ATP-Fluss (normiert auf Aktivität der Zitratsynthase)

Die Mitochondrienfraktion der Deletionsstämme $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ sowie $\Delta por1$ und des Wildtypstammes (WT) wurde enzymatisch isoliert und jeweils auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Exportiertes ATP pro Minute der isolierten Mitochondrienfraktionen wurde im extramitochondrialen Puffer bestimmt. Die linearen Lumineszenzanstiege nach ADP-Zugabe wurden mit den ermittelten Werten der Zitratsynthaseaktivität normiert und die durchschnittlichen ($n = 3$) Werte ins Verhältnis zu dem des Wildtyps gesetzt. * Signifikanter Unterschied zum Wildtypstamm ($p \leq 0,01$; $n = 3$); Die Mittelwertabweichungen sind graphisch dargestellt.

Da eine Deletion von *OM14* zu einer ca. zweifachen Reduktion von Om45p führt (Vgl. Abb. 3.12 sowie Tab. C.3 im Anhang C), scheint das Vorhandensein beider OM-Proteine für einen schnellen und effizienten ATP-Export (bzw. dessen Synthese) essentiell zu sein. Ein Fehlen von Por1p scheint jedoch keinen Einfluss zu haben. Dies korreliert mit den bereits beschriebenen Effekten durch die artifizielle Blockierung des ATP-Transporters mit BKA (Vgl. Abb. 3.21).

Kapitel 4

Diskussion

Die mt Außenmembran stellt die physikalische Abgrenzung des mt Kompartiments zum Zytoplasma einer Zelle dar, ist aber gleichzeitig auch der Ort des Austausches von Metaboliten, Proteinen und Signalmolekülen zur intrazellulären Kommunikation.

Der Austausch von metabolischen Intermediaten zwischen dem Zytoplasma und den Mitochondrien wird durch die zahlreichen Porinporen der OM gewährleistet. Das Porinmolekül, Por1p von *S. cerevisiae*, steht seit Jahrzehnten im Fokus zahlreicher Forschungsarbeiten. Im Gegensatz dazu ist die Funktion von Om14p und Om45p, zwei weitere OM-Proteine mit vergleichbarer Abundanz bei nicht-fermentativen Bedingungen, bisher kaum untersucht.

Vor diesem Hintergrund lag der Fokus dieser Arbeit in der molekular-biologischen Charakterisierung dieser beiden mt OM-Proteine in der Hefe *S. cerevisiae*. Dabei sollten Analysen bezüglich Phosphorylierung und Glykosylierung, Topologie, molekularer Organisation und Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Proteomstudien und phänotypische Untersuchungen die Rolle von Om45p und Om14p in der mt OM klären helfen.

4.1 Der mitochondriale OM-Komplex

Existiert eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Om14p & Om45p?

Die Proteine Om14p und Om45p sind beide in der mt OM lokalisiert [125–127]. Die mt Lokalisation der in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc konnte ebenfalls experimentell verifiziert werden (Abb. 3.2). Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Proteine ist ihr sehr ähnliches Expressionsmuster. Beide Gene werden in *S. cerevisiae* nach einem *diauxic shift* transkriptional induziert und auch auf Proteinebene wurde eine verstärkte Expression nachgewiesen [141]. Zusätzlich weisen beide Nullmutanten keinen vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyp auf [125, 127]. Es ist daher möglich, dass Om14p und Om45p bei den gleichen mt Prozessen

involviert sind. Eine funktionale Redundanz kann aufgrund der sehr verschiedenen Proteinstrukturen (Vgl. Abb. A.2 und Abb. A.3) und des Ausbleibens eines Phänotyps der Doppeldeletionsmutante $\Delta om14 \Delta om45$ (Abb. B.3 und Abb. B.4) jedoch vermutlich ausgeschlossen werden. Diese Hypothese wird zudem dadurch gestützt, dass ein Fehlen der Proteine Om14p bzw. Om45p Auswirkungen auf unterschiedliche Proteine hat (Vgl. Abb. 3.19).

Die Vermutung einer Protein-Protein Interaktion konnte durch drei voneinander unabhängigen Methoden experimentell belegt werden. Dabei konnten beide Proteine als Bestandteile von Proteinkomplexen gleicher Größe in der 2D BN - SDS-Separation nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Zudem gelang die Co-Immunopräzipitation von Om45p durch immobilisiertes Om14p sowie der gegensätzliche Ansatz (Abb. 3.11 B). Auch unter den stringenteren Bedingungen der TAP-Methode konnte die physikalische Interaktion zweifelsfrei dokumentiert werden (Abb. 3.15).

Bereits bei der nativen Separation fiel auf, dass das Separationsprofil beider Proteine dem von Porin weitestgehend ähnelt. Auch in den jeweiligen Eluatzen der Affinitätspräzipitationen konnte neben Om45p und Om14p auch Por1p nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die drei abundanten Proteine der mt OM einen gemeinsamen Komplex ausbilden können.

Die molekulare Organisation des OM-Komplexes

Rein formal lassen sich die in Abb. 4.1 A gezeigten Szenarien einer Interaktion von Por1p, Om14p und Om45p in einem gemeinsamen Komplex postulieren. Bei der dargestellten Möglichkeit 1 interagieren beide, Om14p und Om45p, unabhängig voneinander mit der Porinpore. Es ist ebenso möglich, dass alle drei Proteine direkt miteinander verbunden sind (Darstellung 2). Zwei weitere Szenarien wären, dass entweder Om45p oder Om14p indirekt über Om14p bzw. Om45p an Por1p gebunden wird (Modell 3 und 4).

Um zu überprüfen inwieweit die Bindung einer UE an den Komplex von der Präsenz der übrigen Komplexpartner abhängig ist, wurde die molekulare Organisation des Komplexes in entsprechenden Deletionsmutanten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich das Organisationsmuster von Porin nicht signifikant in Abwesenheit von Om14p, Om45p oder beider OM-Proteine verändert (Abb. 3.13 C). Daraus kann geschlossen werden, dass die Assemblierung von Porin in die charakteristischen Komplexe mit MWs von ca. 145, 300, 420, 550 und 700 kDa ein von Om14p und Om45p unabhängiger Prozess ist. Porin fungiert daher wahrscheinlich als *Scaffold*-Protein für zusätzliche Bindungspartner. Die Unabhängigkeit von Porin wird ebenfalls dadurch dokumentiert, dass die *steady state* Konzentration von Por1p durch Deletionen von *OM14* und / oder *OM45* nicht beeinflusst wird (Abb. 3.12 sowie Daten der 2D DIGE-Analysen in Tab. C.3).

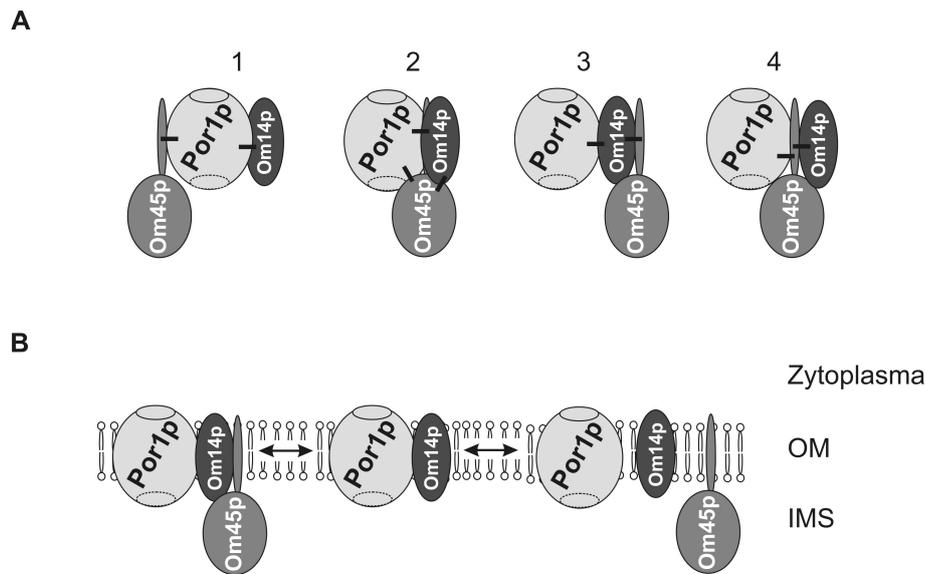


Abbildung 4.1: Modell der Proteininteraktionen des OM-Komplexes

A: Schematische, nicht maßstabsgerechte Darstellung möglicher Formen einer Interaktion von Om14p, Om45p und Por1p. **B:** Nicht maßstabsgerechtes Interaktionsmodell von Om14p und Om45p mit Por1p.

Im Gegensatz dazu können die hochmolekularen Proteinorganisationsformen von Om14p und Om45p mit einem MW von über 200 kDa nicht mehr nachgewiesen werden, wenn Por1p fehlt (Abb. 3.13 A und B). Dies bestätigt erneut die zentrale Funktion von Por1p als Gerüstprotein in dem postulierten OM-Komplex und weist auf eine eher akzessorische Rolle von Om14p und Om45p hin. In Übereinstimmung mit dieser Sichtweise sind die ermittelten Daten der *steady state* Konzentrationen dieser beiden Proteine: während die Porinkonzentration durch das Fehlen von Om14p und / oder Om45p nicht beeinflusst wird, weisen Zellen ohne Por1p eine signifikant verminderte Om14p-Konzentration auf (Abb. 3.12). Dieser Befund spricht dafür, dass Om14p in Abwesenheit von Porin nicht assembliert werden kann und wahrscheinlich dem proteolytischen Abbau zugeführt wird, wie es beispielsweise auch bei UEs des Prohibitinkomplexes und der Atmungskettenkomplexe beobachtet wird [179, 180].

Wenn Om14p fehlt, kann Om45p mit immobilisierten Antikörpern gegen Por1p nicht co-präzipitiert werden (Abb. 3.14). Zusätzlich reduziert eine Deletion von *OM14* die *steady state* Konzentration von Om45p signifikant, aber nicht *vice versa* (Abb. 3.12 sowie Daten der 2D DIGE-Analysen in Tab. C.3). Daher kann geschlussfolgert werden, dass nur eine Interaktionsform der drei OM-Proteine möglich ist: Om45p ist von Om14p abhängig und benötigt dieses als eine Art *Linker* für eine Interaktion mit der Porinpore (Modell 3 in Abb. 4.1 A).

In Hefestämmen ohne Por1p konnten interessanterweise Om45p und Om14p nicht co-präzipitiert werden (Abb. 3.14). Demzufolge bilden Om14p und Om45p nur in Gegenwart von Por1p eine stabile oligomere Struktur aus. Eine Interaktion zwischen Om14p und

Por1p ohne Om45p ist jedoch möglich, da eine Deletion von *OM45* keinen Einfluss auf die Präzipitierbarkeit von Om14p-HA durch immobilisiertes Por1p bzw. *vice versa* hat (Abb. 3.14). Da zudem die *steady state* Konzentration (Abb. 3.12) sowie die Separationsprofile der 2D BN - SDS-PAGE (Abb. 3.13 A und C) von Om14p und Por1p durch die Abwesenheit von Om45p nicht beeinflusst werden, wird die Idee unterstrichen, dass zuerst Om14p an die Porinpore bindet und Om45p später hinzukommt (siehe Interaktionsmodell in Abb. 4.1 B).

Om14p verfügt über fünf und Por1p über zwei Cysteinreste (Vgl. Proteinsequenz in Abb. A.1 und A.2). Es wäre demzufolge möglich, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Por1p und Om14p über intermolekulare Disulfidbrückenbindungen erfolgt. Dass die Cysteinreste der Aminosäuredomäne CxxC von Om14p für eine Interaktion mit Por1p von Bedeutung sind, konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Cystein-Substitutionsmutante von Om14p-HA (Hefestamm NxxN, [134]) nicht mit Porinantikörpern co-präzipitiert werden konnte. Eine reziproke Reinigung von Porin mit HA-Antikörpern war ebenfalls nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die erzeugte Hefemutante NxxN eine hohe Instabilität des Cystein-modifizierten Om14p-HA aufweist [134], wodurch die Ergebnisse der Co-IPs mit der Proteininstabilität überlagert sein könnten. Die Co-IP-Daten der Hefemutante NxxN belegen jedoch die Spezifität der erhaltenen Co-IP-Ergebnisse dieser Arbeit.

Abgeleitet von 2D BN - SDS-PAGE Experimenten mit den Deletionsmutanten $\Delta por1$ *OM14-HA* und $\Delta por1$ *OM45-cMyc* (Abb. 3.13 A und B) scheinen Om14p und Om45p unabhängig von Por1p homooligomere Strukturen mit MWs kleiner 150 kDa auszubilden. In Anbetracht dessen, dass die drei OM-Proteine in ähnlicher Stärke exprimiert werden [125–127], wird die Idee favorisiert, dass nur eine Subpopulation von Om14p und Om45p zu einer bestimmten Zeit bzw. während eines speziellen physiologischen Zustands an die Porinpore bindet. Die restlichen OM-Proteinmoleküle könnten als freie homomere Strukturen existieren, um ein Reservoir bereitzustellen, das bei entsprechenden Anforderungen mit Porin in Wechselwirkung treten könnte. Ein solches Szenario wird beispielsweise bei der Bildung der Superkomplexe der Atmungskette diskutiert [214, 215]. Auch hierbei werden die hocheffizienten Superkomplexe bei bestimmten physiologischen Anforderungen aus bereits in der Membran vorhandenen Komplexen assembliert.

4.2 Funktion der Proteine Om14p & Om45p

In welches zelluläre Kompartiment ragt Om45p?

Die Proteine Om14p und Om45p sind in der mt OM lokalisiert und interagieren wie bereits diskutiert mit der Porinpore Por1p. Während das β -barrel Protein Por1p sowie Om14p mit drei α -helikalen TMDs in der mt OM verankert sind [112, 125], besitzt Om45p hingegen nur eine N-terminale TMD [127, 135]. Der Hauptteil von Om45p ragt somit entweder in den IMS oder ins Zytoplasma. Om45p könnte aufgrund seiner Topologie die Funktion des OM-Komplexes im Zusammenhang mit zytoplasmatischen oder internen mt Prozessen vermitteln.

Die Topologie von Om45p ist in der Literatur kontrovers dargestellt: 1983 zeigten Riezman und Kollegen [126] mittels Trypsinbehandlung von isolierten mt OM-Vesikeln, dass ein 45 kDa großes Protein in der OM existiert, welches in den IMS ragt. Für diese Untersuchungen benutzten sie zwei verschiedene Antikörper (mono- und polyklonal), um das Hauptprotein der OM mit 45 kDa zu detektieren. Yaffe *et al.* [127] benutzten den identischen polyklonalen Antikörper für ein *Screening* Om45p exprimierender Phagen und konnten somit die Spezifität des Antikörpers belegen. Dennoch zitierten Yaffe *et al.* [127] ohne eigene experimentelle Daten die Topologieuntersuchung von Riezman *et al.* [126], jedoch entgegen der Aussage des Originaltextes mit der Angabe, dass der Großteil von Om45p im Zytoplasma exponiert sei.

Ein weiterer überzeugender Beleg für die mt Exposition des C-Terminus ergibt sich aus der vergleichenden Analyse eines Coomassie-gefärbten Geles mit separierten Proteinen aus OM-Vesikeln, die mit oder ohne Trypsin behandelt wurden (Abb. 7 in [126]). Da Om45p eines der vier Hauptproteine der OM ist (vgl. Coomassie-gefärbtes Gel der Deletionsmutante $\Delta om45$ in [127]), kann die von Om45p abgeleitete Bande in den Gelen klar zugeordnet werden. Wie erwartet, führte eine Trypsinbehandlung der OM-Vesikel zur kompletten Entfernung der 70 kDa großen Bande des zytoplasmatischen Rezeptorproteins Tom70p. Im Gegensatz dazu wurde die Intensität der 45 kDa großen Bande, die höchstwahrscheinlich Om45p repräsentiert, nicht verändert. Dies weist deutlich darauf hin, dass Om45p für Trypsin unter diesen Bedingungen nicht zugänglich ist und daher in den IMS ragt. In Übereinstimmung mit dieser Membrantopologie stehen auch die Vorhersagen der Topologie-Prognoseprogramme *Philius Transmembrane Prediction* [216], *TMpred* [217] und *TOPCONS*, welches fünf verschiedene Algorithmen nutzt [218]. *Philius Transmembrane Prediction* verweist mit 99% auf eine nicht-zytoplasmatische Orientierung. *TMpred* bevorzugt stark das „N-Terminus *outside*“ Modell und *TOPCONS* weist ausschließlich auf dieses Modell hin.

Demgegenüber schlussfolgern Sesaki *et al.* [136] aus der Sensitivität von Om45p gegenüber Trypsin unter Verwendung isolierter Mitochondrien eine zytoplasmatische Lokalisation.

Die Verwendung der Protease Trypsin zur Ermittlung von proteolytischen Sensitivitäten verschiedener Proteine muss allerdings sehr kritisch betrachtet werden. Zum einen spaltet Trypsin Proteine sequenzabhängig [167] und zum anderen wird die Proteolyse oftmals durch die natürliche Proteinfaltung, Glykosylierungen oder Disulfidbrücken beeinträchtigt (siehe auch Abb. 3.3 und [168]).

Ein weiterer Beleg, der die zytoplasmatische Orientierung von Om45p unterstützt, stammt von Komplementationsuntersuchungen der Hefemutante $\Delta tom20$ [135]. Die N-terminale Signalankerdomäne von Om45p konnte die des zytosolischen Rezeptorproteins Tom20p funktional ersetzen, da die Wachstumsdefizienz auf YPG-Medium der Nullmutante $\Delta tom20$ durch das Hybridprotein aufgehoben wurde. In zahlreichen Übersichtsartikeln über OM-Proteine wird Om45p als Signal-verankertes Protein aufgelistet. Laut der Literatur ragen alle Signal-verankerten Proteine ins Zytoplasma [17, 137, 138].

Die Daten dieser Arbeit (Abb. 3.4) deuten darauf hin, dass der C-Terminus von Om45p in den IMS ragt. Bei dieser Untersuchung wurde die Proteinsensitivität von Om45p gegenüber der Aminosäuresequenz unspezifisch schneidenden Proteinase K [168] bestimmt. Dabei wurde die geeignete Protease-Konzentration durch Titration bestimmt, wobei Konzentrationen unter $2 \mu\text{g/ml}$ im gewählten Zeitfenster kaum nachweisbare proteolytische Aktivität gegenüber den gewählten Referenzproteinen besaß und Werte ab $5 \mu\text{g/ml}$ zum kompletten Abbau führten. Insofern kann die Behauptung von Rapaport [219], dass die in dieser Arbeit gewählte Proteinase K Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ zu niedrig wäre, widerlegt werden.

Da die Aktivität der Proteinase K entscheidend von der jeweiligen kommerziellen Präparation (Reinheit, stabilisierende Zusätze, Lagerfähigkeit) und den verwendeten Umgebungsbedingungen bei Durchführung des Assays abhängig ist, ist eine vergleichende Wertung aufgrund der Konzentration des Enzyms eine nicht haltbare Basis. Unabdingbar ist deswegen die initiale Kalibrierung der proteolytischen Aktivität auch in Hinblick auf die unterschiedliche Sensitivität der Proteine. Insbesondere der Beleg, dass ein Protein nicht Proteinase K resistent *per se* ist, muss durch den Nachweis in Anwesenheit eines membranlyisierenden Agens, wie z. B. Triton X100, erbracht werden. In diesem Zusammenhang können auch die Daten von Sesaki *et al.* [136], die für eine zytoplasmatische Exposition sprechen, aufgrund des Fehlens dieser Kontrolle nicht ohne Kritik übernommen werden.

Die Daten von Riezman *et al.* [126], die Vorhersagen der Prognoseprogramme sowie die Daten dieser Arbeit (Abb. 3.3 und 3.4) stimmen mit der Lage von Om45p im IMS überein. Om45p könnte daher mit mt Proteinen des IMS oder der IM (insbesondere der IBM) interagieren.

Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in dieser Arbeit eine Epitop-*tag*-tragende Proteinvariante zum Einsatz kam, deren Topologie u. U. nicht oder nicht vollständig der des nativen Proteins entspricht.

Die Anwendung von Epitop-*tags* zur Detektion von Proteinen ist v. a. dann kritisch zu betrachten, wenn wie in diesem Fall kein funktionaler Test für die Fusionsproteine zur Verfügung steht, der eine Beeinflussung durch den *tag* ausschließt. Der korrekte Einbau der Integrationskassette ins jeweilige Hefegenom, die Expression der Fusionsproteine und deren Lokalisation in den Mitochondrien wurde für die Fusionsproteine Om14p-HA und Om45p-cMyc bestätigt (Vgl. Kapitel 3.1.1) und es konnten keine Wachstumsbeeinträchtigungen nachgewiesen werden (Abb. B.1 und B.2).

Dennoch fällt v. a. bei Om45p-9cMyc eine extreme Verschiebung des theoretischen pI-Werts von 8,55 zu 4,92¹ durch den *tag* auf, die zudem experimentell nachgewiesen wurde. So wurde Om45p-9cMyc mit einem pI von etwa 5,2 (Abb. 3.7) und vier authentische Proteinformen in einem pI-Bereich von ca. 7,8 bis 9,0 (Abb. 3.18) detektiert. Außerdem waren starke niedermolekulare Banden des Fusionsproteins Om45p-cMyc, die auf einen Proteinabbau oder eine Proteininstabilität hinweisen sehr häufig, v. a. nach einer enzymatischen Mitochondrienisolation, nachweisbar (Abb. 3.2). Dies könnte auf einen Einfluss des Epitop-*tags* hinweisen. Es wäre aber auch möglich, dass Om45p nach einer Adaptation der Hefezelle an die Stoffwechselveränderungen eines *diauxic shift* nicht mehr gebraucht wird und *tag*-unabhängig abgebaut wird.

Eine interessante theoretische Alternative könnte die beiden diskutierten Topologien vereinen: Es ist zumindest vorstellbar, dass Om45p über eine Art *flip-flop*-Mechanismus verfügt und seine Topologie in Bezug auf externe Stimuli verändern kann. Solch eine transverse Diffusion wurde beispielsweise für den LDL-Rezeptor gezeigt [220].

Um die Sicherheit der Aussage zur Membrantopologie weiter zu erhöhen, könnten Protease-Resistenzversuche oder elektronenmikroskopische Aufnahmen in Kombination mit authentischen Antikörpern durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, OM45-cMyc mit einer zusätzlichen Sequenz, die auch für einen weiteren Epitop-*tag* kodieren könnte, am N-Terminus zu fusionieren. Eine proteolytische Spaltung mit einer Protease sollte dann, statt zu einem Verschwinden, zu einer vertikalen Verschiebung der Proteinbande im *Western Blot* führen. Dies würde die Aktivität der Protease bestätigen und zusätzlich könnten konkrete Aussagen über die Topologie des Proteins getroffen werden. Ein N-terminaler Epitop-*tag* sollte die Membraninserierung eines OM-Proteins nicht stören, da diese nicht über die typische MTS verfügen [53].

¹ Die Berechnungen wurden mit dem *tool Compute pI/Mw* von ExPASy durchgeführt [171].

Welche Funktionen können für Om14p & Om45p prognostiziert werden?

Om14p und Om45p verfügen beide über α -helikale TMDs, mit der sie in der mt OM verankert sind. Dies spricht für eine evolutionäre Entstehung der Proteine nach dem Endosymbioseprozess und für Proteinfunktionen, die insbesondere bei der Metabolit-Translokation, mt Teilung und Fusion oder Regulation des zellulären Redoxmetabolismus eine Rolle spielen [125].

Zur Identifizierung der Proteinfunktionen wurde in dieser Arbeit das Om14p-assoziierte Proteom mittels der TAP-Methode in einem präparativen Maßstab mit anschließender massenspektrometrischer Analyse des Eluats bestimmt.

Mit dem dafür immobilisierten Köderprotein Om14p-TAP wurden, wie erwartet, die bereits bekannten Interaktionspartner Om45p und Por1p eluiert (Vgl. Abb. 3.15). Zusätzlich assoziierte Proteine von Om14p-TAP sind interessanterweise hauptsächlich in der mt IM lokalisiert.

Om14p / Om45p-Beteiligung am mt ADP / ATP-Austausch

Folgende acht identifizierte Interaktionspartner deuten einen funktionalen Zusammenhang des OM-Komplexes mit der oxidativen Phosphorylierung an: eine der drei mt NADH-Dehydrogenasen (Nde1p), drei UEs des Atmungskettenkomplexes III (Cor1p, Cyt1p und Qcr2p) und vier UEs der ATP-Synthase (Atp1p, Atp2p, Atp3p und Atp7p). Die zwei zusätzlich co-präzipitierten Proteine der mt IM Aac2p und Mir1p (Vgl. Tab. 1.1) stellen eine funktionale Verbindung zwischen den Enzymen der oxidativen Phosphorylierung und den dafür benötigten mt Transportprozessen her. Denn Mir1p und Aac2p bewerkstelligen den mt Import von P_i bzw. ADP, welche beide für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden [59, 67, 75].

Ob die Interaktion des OM-Komplexes jeweils direkt oder durch Bindung eines Mir1p-Aac2p-Heteromers erfolgt, kann nicht unterschieden werden. Für letzteres sprechen die bekannten Interaktionsdaten von Mir1p und Aac2p. Claypool *et al.* [221] zeigten eine synthetische Lethalität der Hefemutante $\Delta aac2 \Delta mir1$, die eine Interaktion beider Proteine vermuten lässt und bestätigten dies durch eine Co-Elution mit Antikörpern gegen Aac2p. Die Arbeitsgruppe von Brandina [222] verifizierte die Proteininteraktion, indem sie Mir1p und Aac2p als gemeinsame Interaktionspartner der Enolase nachwiesen. Eine Wechselwirkung zwischen dem ADP / ATP-Transporter in der mt IM und der Porinpore in der OM von *S. cerevisiae* wird zum einen dadurch belegt, dass mt Fraktionen aus Hefen sehr ähnliche 2D BN - SDS-PAGE Separationsprofile der Proteine Aac2p und Por1p aufweisen [221]. Zum anderen wurde Por1p bei den bereits beschriebenen Interaktionsnachweisen von Aac2p und Mir1p ebenfalls in den Eluaten identifiziert [221, 222]. Ein zusätzlicher Nachweis stammt von einem CNAP- (*consecutive non-denaturing affinity purification*) Experiment mit Antikörpern gegen Taz1p, bei dem

u. a. Aac2p und Por1p co-eluiert wurden [223].

Die Spezifität der identifizierten Interaktionspartner wird zudem dadurch belegt, dass neben den Kernkomponenten des Por1p-Aac2p-Mir1p Interaktoms die UEs der mt Atmungskette (Nde1p, Cor1p, Cyt1p und Qcr2p sowie Atp1p, Atp2p und Atp7p) als zusätzliche Bindungspartner bereits beschrieben sind [221–223].

Proteine des Zitratzyklus, glykolytische Enzyme, zusätzliche Transportproteine der IM und weitere UEs der Atmungskettenproteinkomplexe wurden ebenfalls in den Arbeiten von Brandina bzw. Claypool und deren Mitarbeiter [221–223] nachgewiesen. Dies ergänzt auf der einen Seite das Interaktom und spiegelt auf der anderen Seite den komplexen Zusammenhang des zellulären nicht-fermentativen Stoffwechsels wieder.

Erst kürzlich vermutete Cléménçon [108] ein Zusammenwirken der Porinpore mit dem sogenannten ATP-Synthasom, bestehend aus den Atmungskettenenzymen, der ATP-Synthase, des Phosphat-Transporters sowie dem ADP / ATP-Carrier und stellte dies in einem mt Interaktosom-Modell der Hefe dar. Durch diese Interaktion kann in *S. cerevisiae* ein synergistischer ADP / ATP-Austausch zwischen dem Zytoplasma und der mt Matrix erfolgen. Die vorliegende Arbeit ergänzt dieses Modell um die Proteine Om14p und Om45p. Vorstellbar ist, dass die beiden OM-Proteine eine Verbindung zwischen den Proteinkomplexen beider Membranen herstellen. Eine schematische Darstellung der Proteininteraktionen sowie des Flusses der metabolischen Intermediate kann der Abb. 4.2 entnommen werden.

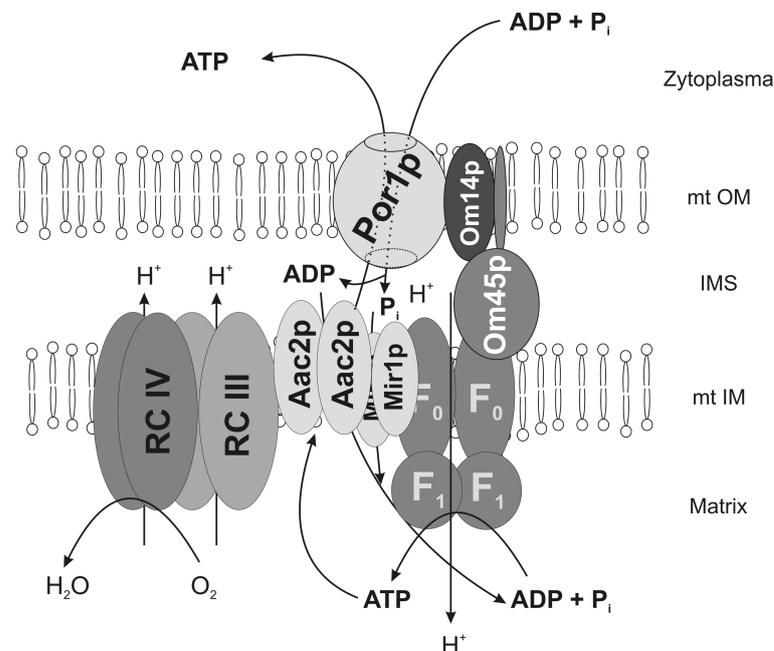


Abbildung 4.2: ADP / ATP-Austausch

Diese Abb. stellt die Wechselwirkung der OM-Proteine Om14p und Om45p mit dem ATP-Synthasom in Anlehnung an Cléménçon (2012) [108, Abb. 4] schematisch und nicht maßstabsgerecht dar. RC III/IV: Atmungskettenenzym-Suprakomplex III₂IV₂; F₀F₁: ATP-Synthase; Aac2p: ADP / ATP-Transporter; Mir1p: Phosphat-Transporter

Bei den in dieser Arbeit insgesamt 20 identifizierten Proteinen handelt es sich keinesfalls um das vollständige Om14p-Interaktom, da nur Proteinbanden mittels MS analysiert wurden, die durch die Proteinfärbung mit colloidalem Coomassie sichtbar wurden. Das beschriebene Om14p-Interaktom repräsentiert deswegen hauptsächlich Proteine mit hoher Abundanz. Ein weiterer Aspekt ist, dass viele biologisch relevante Interaktionen mit nur einer geringen Affinität oder nur transient erfolgen und generell von spezifischen zellulären Bedingungen abhängig sind. Die zwei aufeinander folgenden Reinigungsschritte der TAP-Methode erhöhen zwar die Spezifität der eluierten Proteine, führen aber auch zu einer starken Verdünnung der Proben, wodurch viele transiente oder schwache Interaktionen verloren gehen [224]. Mit dem angewandten Verfahren kann daher nur ein Bruchteil der tatsächlich stattfindenden Proteinwechselwirkungen erfasst werden. Dies erklärt auch, dass z. B. nur einige UEs der mt Atmungskettenkomplexe nachgewiesen wurden.

Seltenerweise wurden Om14p und Om45p in keiner der zitierten Interaktionsuntersuchungen nachgewiesen, obwohl die Kultivierung der Hefen stets unter nicht-fermentativen Bedingungen erfolgte. Die mit dem niedrigen MW von Om14p verknüpften methodischen Schwierigkeiten bei Standarduntersuchungen mit Polyacrylamid-Gelelektrophoresen könnten eine Erklärung sein. Ein weiterer Punkt ist, dass ein Nachweis der OM-Proteine in einem Proteinkomplex Detergenz-abhängig zu sein scheint. Wie in Vorarbeiten schon herausgefunden wurde, ist die Assemblierung der OM-Proteine an den Porinkomplex vermutlich durch sehr schwache Wechselwirkungen charakterisiert, so dass sie nur bei bestimmten milden Detergenzkonzentrationen nachgewiesen werden kann [134].

Eine Bestätigung der Interaktionspartner des OM-Komplexes durch den Einsatz des Köderproteins Om45p-TAP war aufgrund der funktionellen Interferenz des TAP-tags nicht durchführbar (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit der *S. cerevisiae* Bibliothek EUROSCARF (*European Saccharomyces Cerevisiae Archive For Functional Analysis*), die ebenfalls sehr niedrige Expressionswerte von Om45p-TAP erwähnt.

Damit ausgeschlossen werden kann, dass der TAP-tag selbst zu Wechselwirkungen mit mt Proteinen führt, sollte ein vom OM-Komplex unabhängiges TAP-getagtes Protein der mt OM als Köderprotein eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde dafür das Fusionsprotein Tom22p-TAP generiert. Aber auch bei diesem Protein scheint der C-terminal angebrachte Epitop-tag mit der Funktion von Tom22p zu interferieren (Beobachtungen siehe Seite 86). Laut EUROSCARF gelingt auch die Expression anderer geeigneter TAP-getagter Proteine, wie z. B. Tom40p-TAP, Taz1p-TAP oder Gut2p-TAP, nicht.

Dennoch können die mittels der TAP-Methode co-präzipitierten Proteine als spezifische Interaktionspartner von Om14p angesehen werden. Zum einen wurden in der parallel mitgeführten Wildtypkontrolle keine Hefepoteine nachgewiesen. Zum anderen ist die

TAP-Prozedur mit ihren zwei sukzessiven Reinigungsschritten generell mit einem hohen Grad an Spezifität und einem sehr niedrigen Hintergrund anzusehen [154, 225].

Auffällig ist, dass die spezifischen Transportproteine Aac2p und Mir1p in der inneren Grenzmembran der IM lokalisiert sind, die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung allerdings in der Cristae-Membran, die deutlich abgelöst von der OM ist [8]. Vogel und Kollegen [4] kamen bei ihren Untersuchungen von 20 verschiedenen IM-Proteinen jedoch zu dem Schluss, dass die Lokalisation der Proteine innerhalb der IM keinesfalls ausschließlich auf die IBM bzw. die CM begrenzt ist. Vielmehr scheinen die Proteine sich funktionsabhängig innerhalb der IM lateral zu bewegen. Z. B. wandert der TIM23-Komplex bei Nichtgebrauch in die CM, welche dann als Lagerort bis zum erneuten Gebrauch fungiert. Die Autoren vermuten, dass die *cristae junctions* zwischen IBM und CM keine strikten Barrieren für die laterale Diffusion von Membrankomplexen darstellen.

Um weitere Aussagen zur Funktion der OM-Proteine treffen zu können, wurden die Auswirkungen der Gendelektionen von *OM14* und / oder *OM45* auf das mt Proteom mittels 2D DIGE-Analysen bestimmt.

In der Literatur wird das mt Proteom der Hefe mit 400 bis 800 Proteinen beziffert [141, 226–228]. In dieser Arbeit konnten mit dem 2D DIGE-Verfahren im Durchschnitt ca. 500 Proteinsignale von enzymatisch isolierten und zweifach Gradienten-gereinigten Mitochondrienfraktionen voneinander separiert und detektiert werden (Abb. 3.18). Dies entspricht nicht ganz der Effizienz von vergleichbaren publizierten 2D mt Proteomauf-trennungen von Ohlmeier *et al.* [141] und Sickmann *et al.* [166], die von 750 bis 800 *Spots* berichten. Die Differenz von ca. 300 Proteinsignalen kann durch die ungenügende Auftrennung in den Randbereichen des SDS-PAA-Gels der zweiten Dimension entstanden sein.

Viele Proteine treten aufgrund posttranslationaler Modifikationen in mehreren *Spots* auf, was die eigentliche aufgetrennte Proteinanzahl wieder sinken lässt. Generell kann das mit diesem Verfahren aufgetrennte mt Proteom aufgrund der folgenden Parameter nicht vollständig sein: Sämtliche Proteine kleiner 15 kDa sind nach der zweiten Dimension mit dem hier verwendeten 12 %-igen SDS-PAA-Gel nicht mehr nachweisbar. Zudem fallen alle Proteine mit pI-Werten kleiner drei und größer elf nicht in den Auftrennungsbereich der ersten Dimension. Auffallend ist, dass auch in anderen 2D mt Proteomauf-trennungen von z. B. Ohlmeier *et al.* [141] kaum hydrophobe Membranproteine, wie beispielsweise die UEs des mt Atmungskettenkomplexes IV, identifiziert wurden. Dies liegt daran, dass solche Proteine (mit einem positiven durchschnittlichen Hydrophatizitätsindex) schwer zu solubilisieren und normalerweise für eine 2D gelelektrophoretische Auftrennung nicht geeignet sind [229].

Von den insgesamt 13 durch eine Deletion von *Om14* und /oder *OM45* beeinflussten Proteinen sind 7 (Cbp4p, Ccp1p, Hem14p, Lsc1p, Prx1p, Pst2p und Qcr2p) im mt Kompartiment lokalisiert. Die Gemeinsamkeit der sieben mt Proteine liegt darin, dass sie für ihre Funktionalität Co-Faktoren oder Substrate binden müssen. Diese Moleküle selbst oder ihre Vorläufermoleküle müssen durch die mt Membranen transportiert werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Om14p und Om45p eine Rolle bei diesen Transportvorgängen spielen könnten.

Während der Transfer durch die OM für die meisten Moleküle durch die Porinpore verläuft, erfolgen in der IM spezifische Transportprozesse mit Hilfe der MCs (siehe Einleitungskapitel 1.2.4 *Metabolit- und Ionentransport*). Durch die *OM14/OM45*-Gendeletionen sind die ins Mitochondrium zu importierenden Moleküle ADP, die Flavine FMN und FAD, Glutathion, Häm, P_i sowie möglicherweise Zinkionen betroffen (Vgl. Tab. 4.1). Da jedoch das Fehlen der Proteine Om14p und Om45p unter den getesteten Bedingungen keinen vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyp hervorruft, kann davon ausgegangen werden, dass sie für den Transfer der Moleküle nicht essentiell sind, vielleicht aber unter bestimmten Bedingungen eine Effizienzsteigerung vermitteln.

Tabelle 4.1: Co-Faktoren bzw. Substrate und deren Transporter von Om14p / Om45p-abhängigen mitochondrialen Proteinen.

Beeinflusste mt Proteine durch die Deletionen von *OM14* und /oder *OM45* im Vergleich zum Wildtypstamm mit Signalintensitätsunterschieden größer zweifach (Vgl. Tab. 3.1), deren Co-Faktoren bzw. Substrate und die dazugehörigen Transportproteine der mt IM. Subzelluläre Lokalisation: M, Mitochondrien (IMS, Intermembranraum; IM, innere Membran; MA, Matrix); ^a, Annahme

Spot	Protein	Lokal.	Co-Faktor/Substrat	Transporter	Referenzen
<i>Δom14 & Δom14 Δom45</i>					
2	Cbp4p	IM	<i>unbekannt</i>	-	189, 190
3	Lsc1p	MA	ADP + P_i	Aac1/2/3p + Mir1p	59, 188
<i>Δom45 & Δom14 Δom45</i>					
14	Prx1p	M	Glutathion	in Säugerzellen: Dicarboxylat- und 2-Oxoglutarat-Transp.	191, 230, 231
15	Ccp1p	IMS	Häm	Aac1/2/3p	66, 192
nur in <i>Δom14 Δom45</i>					
10	Pst2p	M	FMN ^a	<i>unbekannt</i>	99, 194, 195, 232
11	Qcr2p	IM	Zn ²⁺ ^a	<i>unbekannt</i>	196, 233, 234
20	Hem14p	IM	FAD	<i>unbekannt</i>	99, 200, 201, 232

Der schon durch die identifizierten Interaktionspartner vermutete funktionale Zusammenhang der Proteine Om14p und Om45p mit dem ADP / ATP-Synthasom wird durch folgende Auswirkungen der *OM14/OM45*-Gendeletionen auf das mt Proteom unterstützt:

Zum einen deuten die zu importierenden Moleküle ADP, das Häm-Vorläufermolekül Protoporphyrin IX und P_i wiederholt eine Interaktion des OM-Komplexes mit den *Carrier*n Aac2p und Mir1p an [59, 66]. Zum anderen spielen die drei bei Abwesenheit von Om14p und Om45p herunterregulierten Proteine Qcr2p, Cbp4p und Hem14p eine Rolle bei den Atmungskettenkomplexen. Qcr2p ist eine UE des Atmungskettenkomplexes III und Cbp4p stellt einen Assemblierungsfaktor des selben Enzymkomplexes dar (Vgl. Tab. 3.1). Hem14p spielt eine Rolle bei der Hämbiosynthese und ist demzufolge ebenso für die mt Atmungskettenkomplexe III und IV von Bedeutung, da diese die Cytochrome *b* und *c*₁ bzw. *a* und *a*₃ als redoxaktive Zentren tragen bzw. eine Bindung mit Cytochrom *c* eingehen [235, 236]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass sämtliche durch eine Deletion der Gene *OM14* und /oder *OM45* beeinflussten mt und nicht-mt Proteine (Vgl. Tabelle 3.1), außer Cbp4p und Hem14p, gemäß der UniProt Datenbank [237] bzw. der *Saccharomyces* Genom Datenbank [238], Phosphoproteine sind. Für eine Proteinphosphorylierung wird ATP benötigt. Die mt Synthese von ATP erfordert wiederum den mt Import von P_i und ADP durch die IM-Transporter Mir1p und Aac2p. Die Phosphorylierung von nicht-mt Proteinen bedingt wiederum den mt Export von ATP, der ebenfalls über Aac2p verläuft [59].

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten TAP-Methode konnte gezeigt werden, dass Om14p und Om45p mit dem mt ATP-Synthasom interagieren. Vergleichende mt Proteomanalysen führen zu der Vermutung, dass Om14p und Om45p an mt Transportprozessen, insbesondere denen von ADP, ATP und P_i involviert sind.

Om14p / Om45p-Beteiligung am Ethanol-Metabolismus

Die mittels TAP identifizierten Interaktionspartner Sfc1p und Mir1p von Om14p-TAP (Vgl. Abb. 3.15) stellen einen Zusammenhang des OM-Komplexes mit dem Ethanol-Metabolismus her (Vgl. Abb. 4.3). Steht der Hefe, analog zu den Versuchsbedingungen mt Analysen dieser Arbeit, Ethanol als alleinige C-Quelle zur Verfügung, so wird dieses im Zytoplasma zu Acetyl-CoA metabolisiert und durch den Glyoxylatzyklus zu Succinat umgewandelt [239]. Succinat gelangt anschließend höchstwahrscheinlich durch die Porinpore in den IMS, von wo aus es durch Sfc1p, auch bekannt als Acr1p, in die mt Matrix transportiert wird [78].

Einen weiteren *Carrier* für Succinat stellt der Dicarboxylat-Transporter Dic1p dar, der aufgrund der mt Proteomvergleiche der Deletionsmutante $\Delta om45$ mit dem Wildtypstamm schon ins Visier von OM-Komplex abhängigen Proteinen gerückt ist. Denn Dic1p könnte ein funktionell homologes Protein zum Dicarboxylat- bzw. 2-Oxoglutarat-Transporter der Säugerzellen [59], und dadurch u. a. für den Glutathiontransport verantwortlich sein (Vgl. Tab. 4.1). Im Falle des Succinat-Transports handelt es sich bei Dic1p

um einen Antiporter, der durch den zusätzlichen Export von P_i elektronneutral arbeitet [240]. Ein erneuter Ausgleich des mt Phosphatgehalts erfolgt durch den schon erwähnten Phosphat-Transporter Mir1p. Sowohl Sfc1p als auch Dic1p sind für das Hefewachstum in Gegenwart von Ethanol als alleinige C-Quelle essentiell [241, 242].

Succinat wird in der mt Matrix entweder direkt vom Atmungskettenkomplex II als Substrat angenommen oder gelangt in den Zitratzyklus, der ebenfalls Substrate in Form von NADH an die Atmungskette (NADH-Dehydrogenasen) liefert. Entstehendes Fumarat kann ebenfalls in den Kreislauf des Zitratzyklus gelangen oder durch Sfc1p exportiert werden [78], wodurch die Hefezelle Glukoneogenese betreiben kann.

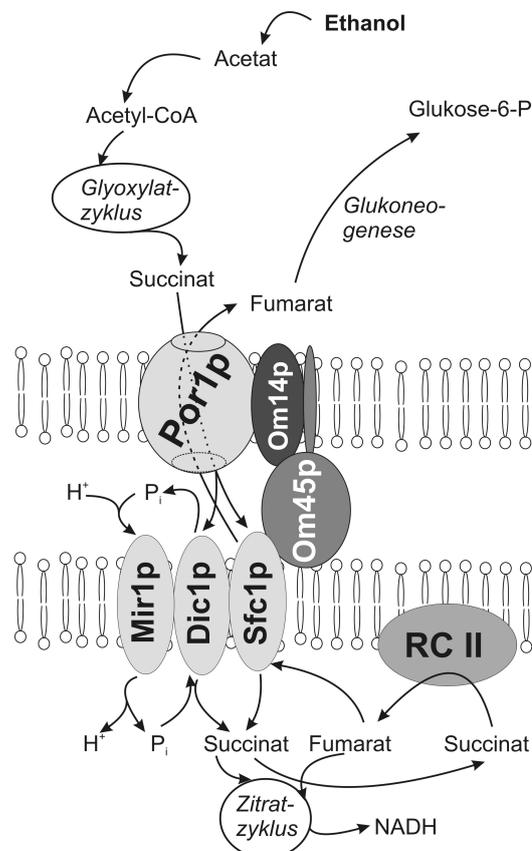


Abbildung 4.3: Ethanol-Metabolismus

Diese Abb. stellt die Wechselwirkung der OM-Proteine Om14p und Om45p mit spezifischen Transportern des nicht-fermentativen Kohlenstoffwechsels schematisch und nicht maßstabsgerecht dar. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Darstellung aus Palmieri (2006) [59, Abb. 2]. RC II: Atmungskettenkomplex II

Die Verknüpfung der Porinpore mit den spezifischen und essentiellen Transportern Sfc1p, Dic1p und Mir1p deutet eine mögliche Rolle der OM-Proteine Om14p und Om45p für den nicht-fermentativen Ethanol-Metabolismus an.

Die durch eine Deletion von *OM14* herunterregulierten Proteine Lsc1p, eine UE eines Enzyms des Zitratzyklus [188], und Tdh1p, ein Enzym der Glukoneogenese [187], stehen im Einklang mit diesem funktionalen Zusammenhang. Des Weiteren spricht dafür, dass

Om14p mit Proteinen des mt Zitratzyklus und der Atmungskette co-reguliert wird [243] und dass Om45p in einem mt supramolekularen Proteinkomplex, der u. a. Proteine der Atmungskette und des Zitratzyklus beinhaltet, nachgewiesen wurde [244].

Om14p / Om45p-Beteiligung an der Bekämpfung reaktiver Sauerstoffspezies

Unter nicht-fermentativen Stoffwechselbedingungen (Ethanol-Metabolismus sowie dem ADP / ATP-Austausch) entstehen reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien, die zu zellulären Schäden führen können. Durch das Fehlen der beiden Proteine Om14p und Om45p werden die Proteine Ccp1p, Pst2p, Lsp1p und Pil1p vermindert exprimiert (Vgl. Tab. 3.1). Sie alle sind bei der oxidativen Stressbekämpfung involviert und unterstützen demzufolge die Zelle bei verstärkten respiratorischen Prozessen.

Im Einklang damit steht die identifizierte Interaktion von Om14p-TAP mit dem Oxoglutarat-Transporter Yhm2p (Coc1p) (Vgl. Abb. 3.15), der eine Rolle im Zitrat-Oxoglutarat / NADPH-Redox-Kreislauf spielt [80]. Yhm2p exportiert Zitrat ins Zytoplasma und importiert Oxoglutarat ins Mitochondrium. Aufgrund von metabolischen Reaktionen im Zytoplasma und in der mt Matrix führt dies final zu einem Anstieg von zytoplasmatischem NADPH. Dieses reduzierende Äquivalent wird für biosynthetische und antioxidative Reaktionen benötigt. Die inverse Richtung der Transportprozesse, die zu einem Anstieg von intramitochondrialem NADPH führen würden, wird von Castegna und seinen Mitarbeitern [80] nicht ausgeschlossen. Dies würde u. a. dem Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Mitochondrien dienen [245, 246].

Beteiligung am mt Proteinimport bzw. mt Teilungs-/Verteilungsprozessen

Neben den oben beschriebenen Metabolit-Transportprozessen gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung der Proteine Om14p und Om45p am mt Proteinimport:

Bei einem weiteren identifizierten Om14p-assoziierten Protein Phb2p, handelt es sich um eine UE des stark konservierten 1,0-1,4MDa großen Prohibitinkomplexes in der mt IM [181]. Es wird u. a. diskutiert, dass dieser Komplex eine Funktion als *Chaperon* haben könnte, da Prohibitin nachweislich mit nicht-assemblierten UEs der mt Atmungskette interagiert [181, 247]. Die Assoziation von Om14p-TAP mit dem Prohibitinkomplex auf der einen Seite und mit ribosomalen Proteinen (Rpl13ap, Rpl20ap, Rpl21ap und Rps14ap) auf der anderen Seite (Vgl. Abb. 3.15) impliziert eine Funktion des OM-Komplexes, die mit co-translationalen Proteinimportprozessen, Proteinassemblierung und -faltung einhergeht. Im Einklang mit dieser Hypothese steht der Befund, dass der Elongationsfaktor Tef2p bei einer Deletion von *OM45* in geringeren Konzentrationen als im Wildtypstamm vorliegt. Zusätzlich zeigten Ohba und Schatz [248], dass ein Antiserum gegen 45 kDa große Proteine der mt OM (erkennt höchstwahrscheinlich Om45p) den mt Proteinimport blockiert. Hierbei sei allerdings erwähnt, dass ein Einfluss von Om45p auf

den Proteinimport der Zitratsynthase, der ATP-Synthase-UE Atp2p und der COX-UE Cox4p durch Untersuchungen der Deletionsmutante $\Delta om45$ nicht bestätigt werden konnte [127].

Für den Prohibitinkomplex wurde in alternden Hefezellen von Piper *et al.* [249] außerdem gezeigt, dass dieser an mt Teilungsprozessen, v. a. in Bezug auf die mt Verteilung in die Tochterzellen, beteiligt ist. Die Wechselwirkung des OM-Komplexes mit dem Prohibitinkomplex untermauert demzufolge die Beobachtung der atypischen mt Morphologie der Deletionsmutante $\Delta om45$ (Abb. 3.17) und stellt die Membrantopologie von Om45p durch eine Wechselwirkung mit der mt Teilungs- bzw. Fusionsmaschinerie nicht mehr in Frage.

Interessanterweise führte der Funktionsausfall von Porin in *Drosophila* zu länglichen gestreckten Mitochondrien [250]. Auch in der Hefemutante $\Delta por1$ wurde eine mt Struktur nachgewiesen, die der einer mt Teilungsmutante ähnelt (Abb. 3.16 und 3.17). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Porin ebenfalls bei mt Teilungsprozessen involviert ist. Es ist zudem bekannt, dass Porin in Säugerzellen mit Tubulin, eine UE der Mikrotubuli, in Abhängigkeit der Phospholipidzusammensetzung der mt OM sowie der eigenen Phosphorylierung interagiert [251, 252]. Dies könnte neben der Blockierung der Porinpore auch für die mt Verteilung innerhalb der Zellen von Bedeutung sein und sich im mikroskopischen Bild durch mt Akkumulationen äußern.

Bei der Anpassung einer Hefezelle an den Wechsel des zellulären Kohlenstoffmetabolismus von Fermentation zu Respiration könnten mt Teilungs- sowie Verteilungsprozesse eine wichtige Rolle spielen. Es wäre denkbar, dass das durch einen *diauxic shift* induzierte Om45p die Interaktion zwischen Por1p und dem Prohibitinkomplex vermittelt und dadurch eine Möglichkeit zur koordinierten Teilung beider mt Membranen erzeugt.

Wechselwirkung mit dem ER

Neben den Proteinen der mt IM wurde ein weiterer Ionentransporter Spf1p (bzw. Cod1p) im Eluat von Om14p-TAP identifiziert. Die P-Typ ATPase Spf1p ist in der Membran des ERs lokalisiert und pumpt Kalziumionen [182]. Der Nachweis von Spf1p im Eluat von Om14p-TAP lässt auf eine Verbindung des Mitochondriums mit dem ER schließen. Dafür spricht ebenfalls die von Om14p und Om45p abhängige Proteinkonzentration der Protein-Disulfid-Isomerase Pdi1p des ERs. Pdi1p dimerisiert in Abhängigkeit von Zinkionen [253]. Ein Austausch von Zn^{2+} zwischen dem ER und Mitochondrien über den Porinkomplex wäre denkbar. Die mit dem OM-Komplex interagierende Kalziumpumpe Spf1p des ERs scheint allerdings keine Zinkionen zu transportieren [182].

Der schon beschriebene mt ADP / ATP-Austausch könnte allerdings der Belieferung der ATPase Spf1p mit ATP dienen, wobei durch die Interaktion von Spf1p mit dem OM-Komplex eine direkte Übergabe erfolgen kann. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit

dieser Protein-Protein-Wechselwirkung liegt im mt Kalziumionenaustausch mit dem ER. Dieser ist, wie in der Einleitung bereits beschrieben (Kapitel 1.2.2) für mt Funktionen von großer Bedeutung. Der OM-Komplex könnte innerhalb der Mitochondrien mit einem bisher unbekanntem Ca^{2+} -Transporter interagieren und die durch Porin geschleusten Kalziumionen direkt an Spf1p bzw. an den unbekanntem Transporter der mt IM übergeben.

Om14p / Om45p-Beteiligung an weiteren mt Transportprozessen

Bei der Analyse der Auswirkungen auf das mt Hefeproteom durch die Abwesenheit der OM-Proteine, wurde festgestellt, dass möglicherweise auch ein mt Import von Flavinen und Metallionen wie Zn^{2+} in Zusammenhang mit den Proteinen Om14p und Om45p steht (Vgl. Tab. 4.1).

Als Transportprotein für Flavine wurde lange Zeit Flx1p angesehen [59, 98]. 2004 konnte aber gezeigt werden, dass dieses Protein nur FAD aus den Mitochondrien exportiert [99]. Die Synthese von FMN und FAD findet allerdings innerhalb der Mitochondrien statt, so dass der Import von Riboflavin, das Vorläufermolekül von FMN, zwingend erforderlich ist. Bisher konnte jedoch kein *Carrier* für Riboflavin identifiziert werden [99, 232].

Es wird ebenso angenommen, dass der mt Import von Metallionen, wie z. B. Zn^{2+} , *Carrier*-unterstützt erfolgt. Von einem Transporter der IM für Zink wurde bisher allerdings nicht berichtet (Übersicht in [233]).

Fast alle MCs der Hefe wurden bereits charakterisiert (Vgl. Tab. 1.1), dennoch gibt es zahlreiche Moleküle innerhalb der Mitochondrien, für die bisher kein Transporter durch die IM identifiziert werden konnte. Eine Erklärung dafür wäre, dass MCs neben den bereits identifizierten Substraten weitere, noch nicht getestete, Moleküle transportieren können. Außerdem muss eine Substanz, für die der Transport in artifiziell geschaffenen Liposomen nachgewiesen wurde, nicht das tatsächliche Substrat unter physiologischen Bedingungen eines Transporters sein. Zudem ist auch vorstellbar, dass von der Familie der MCs unabhängige Transportmoleküle in der mt IM vorhanden sind. So wird z. B. diskutiert, dass der Transfer von Metallionen durch sogenannte mt ABC-Transporter wahrgenommen werden könnte [57, 254, 255].

Unter den sechs nicht-mitochondrialen Proteinen (Htb1p, Lsp1p, Pdi1p, Pil1p, Tdh1p und Tef2p), die ausgelöst durch eine *OM14/OM45*-Gendeletion eine schwächere Konzentration im Vergleich zum Wildtypstamm aufweisen, sind zwei, die ebenfalls Co-Faktoren benötigen: Tdh1p bindet NAD^+ und Tef2p benötigt GTP zur Aktivierung [187, 193]. Spezifische Transportproteine für diese Moleküle wurden ebenfalls in der mt IM identifiziert: NAD^+ wird durch die zwei Isoformen Ndt1p bzw. Ndt2p und GTP durch den Transporter Ggc1p erkannt [59]. Die beiden Co-Faktoren NAD^+ und GTP liegen jedoch im Zytoplasma der Zelle vor, so dass hier nicht von einer Bedeutung mt Transportprozesse ausgegangen werden kann.

Gemeinsamkeit der putativen Funktions-Szenarien

Die Gemeinsamkeit der dargestellten Funktions-Szenarien der OM-Proteine ist, dass Om14p und Om45p mit der Porinpore der OM und mit spezifischen Proteinen der IM interagieren und mt Transportprozesse beeinflussen. Es wäre vorstellbar, dass dabei die Porinpore selektiv an bestimmte, den physiologischen Bedürfnissen entsprechend, Transporter der IM positioniert wird. Dadurch könnten für respiratorische Bedingungen bedeutsame mt Membrantransportprozesse effizienter erfolgen.

Für die biochemischen Prozesse Glykolyse [256, 257], Zitronensäurezyklus [258] sowie oxidative Phosphorylierung [259] ist beispielsweise bekannt, dass die Ausbildung von supramolekularen Proteinkomplexen zur Effizienzsteigerung führt. D. h. durch eine Kopplung der Transportmaschinerien beider Membranen kann ein effizienter Austausch von metabolischen Intermediaten ermöglicht werden. Dies könnte für die Hefezelle bei der Adaptation an nicht-fermentative Stoffwechselbedingungen besonders von Vorteil sein.

4.3 Experimentelle Funktionsverifizierung

Haben die OM14 / OM45-Gendeletionen Auswirkungen auf den Transport von mt wirkenden toxischen Substanzen?

Zur experimentellen Bestätigung der prognostizierten Beteiligung der OM-Proteine an mt Transportprozessen wurde das Wachstum von Deletionsmutanten in Gegenwart des mt toxisch wirkenden Stoffes TBHP bzw. des Aac2p-Inhibitors BKA im Vergleich zum Wildtypstamm analysiert.

Die Deletionsmutante $\Delta por1$ toleriert im Gegensatz zum Wildtypstamm toxische TBHP-Konzentrationen (Vgl. Abb. 3.20 B), woraus geschlossen werden könnte, dass TBHP bei einem Fehlen der Hauptporinpore nicht effektiv ins Mitochondrium eindringen kann. Das Wachstum der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ ähnelt dem der Deletionsmutante $\Delta por1$. Fehlen demzufolge die beiden OM-Proteine Om14p und Om45p, so führt dies zu einem geringeren TBHP-Durchlass durch die mt Membranen. Dies könnte einerseits durch eine Beteiligung der OM-Proteine beim Öffnen und / oder Schließen der Porinpore erklärt werden. Andererseits könnte die fehlende Kopplung von Por1p mit einem unbekanntem Transporter X für TBHP zu einem ineffizienten TBHP-Import führen. Ein Einfluss auf die Konformation des Transporters X durch die OM-Proteine ist ebenfalls zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausschließbar. Ein Modell in Abb. 4.4 A veranschaulicht diese Vermutungen.

Das Wachstum von $\Delta por1$ in Gegenwart von TBHP deutet bemerkenswerterweise zusätzlich an, dass für den Transport metabolischer Intermediate durch die OM zusätzliche, Por1p-unabhängige Transportwege existieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese

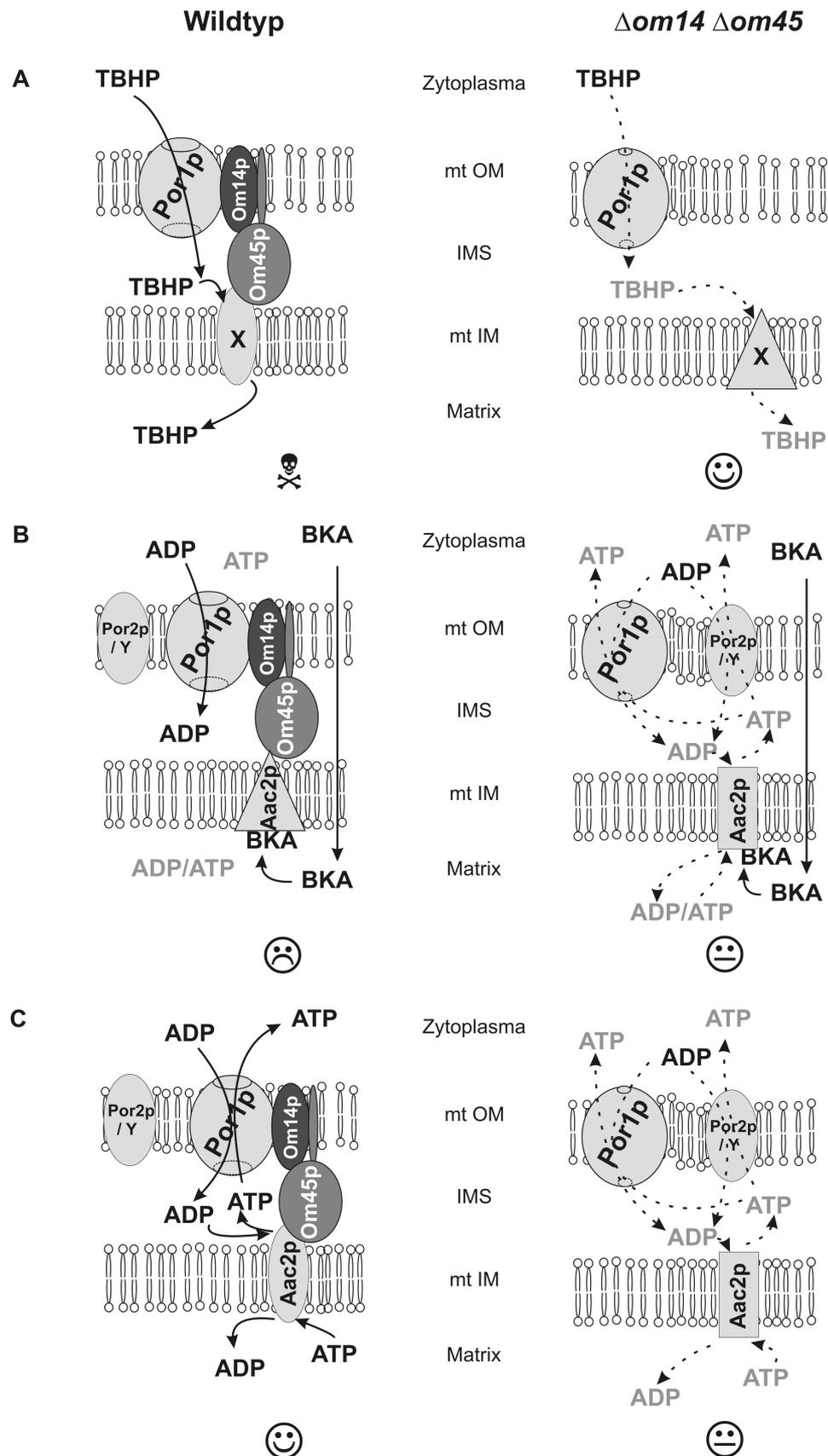


Abbildung 4.4: Modelle mt Transportprozesse von TBHP und ADP / ATP
 Die Transportprozesse der mt toxisch wirkenden Substanz TBHP (**A**) sowie von ADP und ATP in Gegenwart des Aac2p-Inhibitors BKA (**B**) bzw. in Abwesenheit von BKA (**C**) sind in Abhängigkeit der Gegenwart der Proteine Om14p und Om45p schematisch und nicht maßstabsgerecht dargestellt. Gestrichelte Linien verdeutlichen einen ineffizienten Transport. Grau dargestellte Intermediate deuten eine niedrige Konzentration an. Die Strichgesichter veranschaulichen die Wachstumsfähigkeit der Hefe und der Totenkopf stellt die Toxizität dar.

können Hefezellen ohne *POR1* auf sämtlichen nicht-fermentierbaren C-Quellen wachsen [119, 120, 178, sowie Abb. B.4 in dieser Arbeit]. Die Permeabilität der OM gegenüber NADH ist bei der Mutante $\Delta por1$ allerdings stark reduziert [120], woraus geschlossen werden kann, dass ein aus Por1p gebildeter Kanal den Haupttransportweg darstellt.

Das zu Por1p isoforme Protein Por2p enthält das konservierte β -Faltblattmuster der Porinkanäle [177] und sollte demzufolge auch Poren ausbilden können. Eine Überexpression von *POR2* kann die Effekte einer *POR1*-Deletion supprimieren [119], auch wenn in planaren Lipid-Doppelmembranen bisher nicht gezeigt werden konnte, dass Por2p tatsächlich Poren ausbilden kann [118]. Das Wachstum einer $\Delta por1 \Delta por2$ Doppelmutante auf nicht-fermentierbaren C-Quellen ist kontrovers beschrieben: Laut Blachly-Dyson und Forte [118] wächst die Doppelmutante gar nicht, laut Lee *et al.* [120] stark verzögert und laut Forte und seinen Mitarbeitern [177] wächst sie analog der Einzelmutante $\Delta por1$. Es wäre demzufolge möglich, dass ein weiterer Porin-unabhängiger Kanal für Metabolite in der mt OM existiert. Die Daten von Lee *et al.* [120] unterstützen diese Theorie, indem sie zeigten, dass die OM der Doppelmutante $\Delta por1 \Delta por2$ noch eine gewisse Permeabilität gegenüber NADH aufweist. Im Jahr 2000 konnten Kmita und Budzińska [260] zudem zeigen, dass eine Blockierung des TOM-Komplexes in der Einzelmutante $\Delta por1$ den Zugang von externem NADH in den IMS limitiert.

Lee und seine Kollegen [120] äußerten die Vermutung, dass Por2p kleinere Kanäle mit geringerer Bevorzugung von Anionen als Por1p ausbildet. ADP / ATP und kleinere Metabolite könnten diese passieren, NADH hingegen nicht. NADH scheint dafür in einem geringen Maß mit Hilfe des TOM-Komplexes die OM passieren zu können.

Der Transport von ADP / ATP durch die mt IM kann neben Aac2p auch durch das teilweise funktionell redundante Protein Sal1p übernommen werden. Im Hefestamm BY4741 liegt das Gen *SAL1* allerdings verkürzt vor [71]. Somit können in diesem Stamm Überlagerungen beider Proteinfunktionen ausgeschlossen werden.

Wachstumsuntersuchungen in Gegenwart des Aac2p-Inhibitors BKA wiesen ebenfalls einen vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyp der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ auf (Abb. 3.21). D. h. die Doppelmutante toleriert im Gegensatz zum Wildtyp und den Einzelmutanten schädigende BKA-Konzentrationen, die zu einer geringeren ATP-Synthese und -Export ins Zytoplasma führen.

Ein Fehlen der OM-Proteine würde nach den vorausgegangenen Vermutungen die Verbindung zwischen Por1p und Aac2p verhindern oder zum Schließen der Pore führen. Bei geringen BKA-Konzentrationen könnte in solch einem Fall Por2p oder ein Porin-unabhängiger Transporter Y der mt OM den Transfer von ADP / ATP übernehmen und so zu einem Wachstum der Doppeldelensionsmutante führen. Eine weitere Erklärung analog zum TBHP-Wachstum wäre, dass Om14p und Om45p einen Einfluss auf den ADP / ATP-Carrier Aac2p ausüben. Ohne die OM-Proteine könnte sich die Konforma-

tion von Aac2p so verändern, dass der Inhibitor BKA nicht mehr oder schlechter binden kann (Vgl. schematische Darstellung in Abb. 4.4 B).

Interessanterweise korreliert das Wachstum der Deletionsmutante $\Delta por1$ in Gegenwart von BKA (im Gegensatz zum Wachstum in Anwesenheit von TBHP) nicht mit dem der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$. Durch die Untersuchungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen des OM-Komplexes ist bekannt, dass die beiden OM-Proteine ohne Por1p keine hochmolekularen Proteinkomplexe sowie keinen heteromeren Subkomplex ausbilden. Die Situation würde also dem der Doppelmutante ähneln, was zu Konformationsänderungen von Aac2p sowie zu einem freien Zugang für ADP / ATP durch Por2p oder Transporter Y führen könnte. Da allerdings zusätzlich Por1p fehlt, könnte der alleinige Transport von ADP und ATP durch Por2p oder Transporter Y so ineffizient sein, dass bei den angewandten Versuchsbedingungen kein Wachstum von $\Delta por1$ beobachtet werden konnte. Dies wäre aber auch ein Indiz dafür, dass Om14p und Om45p keinen Einfluss auf das Öffnen und Schließen der Porinpore haben.

Wird durch das Fehlen der Proteine Om14p und/oder Om45p der mt ATP-Fluss verändert?

Die prognostizierte Beteiligung der OM-Proteine am ADP / ATP-Austausch sollte neben den Wachstumsanalysen in Gegenwart von BKA, einem Inhibitor des ADP / ATP-Transporters, zusätzlich durch Analysen des mt ATP-Flusses verifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein Nachweisverfahren etabliert, bei dem die extramitochondriale ATP-Konzentration in Suspensionen isolierter Mitochondrien in Abhängigkeit der Zeit als Maß für den ATP-Fluss gewertet wurde (Kapitel 2.5.15). Die ATP-Konzentration wurde dabei durch den ATP-abhängigen Lumineszenzanstieg einer Luciferase-Reaktion gemessen. Als Beleg der Funktionalität des Assays konnte mittels diverser Testmessungen und der Zugabe von spezifischen Inhibitoren bzw. Substraten der mt Atmungskette und des ADP / ATP-Transporters bestätigt werden, dass die gemessenen Lumineszenzsignale auf den Export von *de novo* synthetisiertem ATP im extramitochondrialen Medium zurückgeführt werden können (Abb. 3.22).

Dennoch müssen die mit diesem Verfahren erzielten initialen Ergebnisse allerdings sehr kritisch betrachtet werden, da mit einer Probe stark schwankende Lumineszenzintensitäten gemessen wurden und die Reproduzierbarkeit von Absolutwerten nur innerhalb eines Messtages gegeben war (Abb. 3.22). Der ADP / ATP-Austausch zwischen Zytoplasma und der mt Matrix scheint sehr schnell abzulaufen und nicht unabhängig vom Prozess der ATP-Synthese messbar zu sein. Möglicherweise gibt der Anstieg der extramitochondrialen Lumineszenzsignale (Geschwindigkeit) nicht die ATP-Export-Kinetik wieder. Ein Vergleich der Absolutwerte war aufgrund extremer Schwankungen von Proben eines Hefestammes allerdings nicht möglich.

Ein Vergleich der Lumineszenzanstiege von Mitochondrien der Deletionsmutanten mit denen des Wildtypstammes zeigte, dass v. a. bei der Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ ein signifikant (um ca. 45 %) verringerter ATP-Gehalt in der gleichen Zeit messbar war (Abb. 3.23). Die Einzelmutante $\Delta om14$ wies ebenfalls verringerte ATP-Mengen (nur noch etwa 65 % auf den Wildtyp bezogen) auf, welche wahrscheinlich durch die Om14p-bedingte zusätzliche Konzentrationsabnahme von Om45p zu erklären ist.

Auch wenn das Nachweisverfahren noch nicht ausgereift ist, so stehen die gemessenen Daten zumindest im Einklang mit der Vorstellung, dass die Proteine Om14p und Om45p zusammen einen Einfluss auf den ADP / ATP-Transport haben. Fehlen die beiden OM-Proteine, so könnte eine Verbindung zwischen Por1p und Aac2p gestört sein und zu einem ineffizienten Transport durch beide mt Membranen führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Fehlen der OM-Proteine zu einer Konformationsänderung des Transporters Aac2p führt.

Zusätzlich könnte aber auch ein weiterer Transporter (Por2p oder Protein Y) in der OM Zugang zu ADP und ATP bekommen und den Austausch unterstützen. Diese Hypothese würde erklären, warum bei der Doppeldeletionsmutante $\Delta om14 \Delta om45$ im Vergleich zum Wildtypstamm keine Wachstumsunterschiede bei den getesteten nicht-fermentativen Bedingungen (Abb. B.4) sichtbar werden (schematische Darstellung der Proteinverbindungen in Abb. 4.4 C).

4.4 Funktionale Regulation mittels posttranslationaler Modifikationen

Die in Kapitel 3.1.3 beschriebenen auffälligen Bandenmuster der Proteine Om14p-HA und Om45p-cMyc im *Western Blot* sowie die vier nach einer 2D IEF - SDS-PAGE identifizierten *Spots* von Om45p, die das gleiche MW, aber unterschiedliche pIs aufweisen (Abb. 3.18), könnten durch posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierung oder Phosphorylierung, hervorgerufen werden.

Sind Om14p und Om45p glykosylierte Proteine?

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine häufige posttranslationale Modifikation, die zu Veränderungen der Proteinaktivität, -stabilität, -lokalisation und -interaktionen führen kann [261]. Über glykosylierte mt Proteine sind bisher nur sehr wenige Daten verfügbar. In Mitochondrien von Schweineherzen wurden beispielsweise fünf glykosylierte Proteine nachgewiesen, unter denen sich auch die ADP / ATP-Translokase (ANT1) und die UE δ der ATP-Synthase befanden [262]. Bisher ist nicht klar, in welchem zellulären Kompartiment die Glykosylierungen stattfinden, wo sich die glykosylierten Proteine aufhalten und ob die Modifizierung eine biologische Rolle innerhalb oder außerhalb

der Mitochondrien spielt. Mt Proteinglykosylierungen könnten ein bisher unentdeckter Regulationsmechanismus sein. Es wäre aber auch möglich, dass die glykosylierten Isoformen eine extramitochondriale Lokalisation aufweisen und mit einer bisher unbekannt Proteinfunktion einhergehen [262]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht die Behauptung, dass ein Drittel aller mt Proteine eine duale Lokalisation aufweist [263]. Beispielsweise kann die Fumarase in der mt Matrix als Bestandteil des Zitratzyklus und im Zellkern als Enzym zur DNA-Schadensbehebung nachgewiesen werden [264]. Die α -UE der ATP-Synthase wurde ebenfalls innerhalb der Mitochondrien und an der Zelloberfläche detektiert [265].

Die klassischen Proteinglykosylierungen, in Form einer N-Glykosylierung, treten im ER bzw. im Golgi-Apparat auf [261]. Es existiert jedoch eine weitere Art dieser Proteinmodifikation, die O-GlcNAcylierung. Für eine O-GlcNAc Glykosylierung wird nur eine einzige Glykosyltransferase (O-GlcNAc Glykosyltransferase, OGT) benötigt, für die interessanterweise zwei *Splice*-varianten existieren: eine Kern-Zytoplasmatische Isoform und eine mt Isoform (mOGT) [266]. Eine O-GlcNAc Modifikation von mt Proteinen wurde bereits in Mäuseherzen von VDAC [267] und in Herzmyozyten von COX1 (UE 1 des Atmungskettenkomplexes IV) [268] nachgewiesen. Da es sich im Falle von COX1 um ein mt kodiertes Protein handelt und eine mt Form der OGT nachgewiesen wurde, suggerieren diese Daten, dass diese Proteinmodifikation innerhalb der Mitochondrien erfolgt.

Die Färbung von glykosylierten Proteinen und die anschließende Proteinidentifizierung mittels MS (Abb. 3.8 und 3.9) in dieser Arbeit deuten erstmalig eine Glykosylierung von Por1p in *S. cerevisiae* an. Die Vorhersagen von den zwei verschiedenen Programmen *YinOYang v1.2* [269] und *OGlcNAcScan* [270] stimmen überein und verweisen auf zwei wahrscheinliche O-GlcNAc-Anknüpfstellen innerhalb der Aminosäuresequenz von Por1p: Threoninrest 34 und Serinrest 238. Jones *et al.* [267] vermuten im Rahmen von Apoptoseprozessen eine Regulierung der mt PTP durch Glykosylierungen von VDAC. Welche Auswirkungen diese Modifikation in der Hefe hat, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

Om14p, für welches aufgrund des Leitermusters im *Western Blot* eine Glykosylierung vermutet wurde, scheint nicht glykosyliert zu sein. Weder die Programme *YinOYang* und *OGlcNAcScan*, noch die Daten dieser Arbeit weisen auf solch eine Proteinmodifikation hin. Die höher molekularen Proteinbanden können aufgrund der fünf Cysteinreste (Vgl. Abb. A.2) auch auf inter- und / oder intramolekulare Disulfidbrücken zurückzuführen sein. Der Einsatz verschiedener Reduktionsmittel in Kombination mit reduzierenden Acrylamidgelen könnte darüber Aufschluss geben.

Im Gegensatz zu Om14p geben beide Programme für Om45p eine sehr wahrscheinliche Glykosylierungsstelle (Serinrest 112) an. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Ver-

suchsbedingungen konnte eine Glykosylierung von Om45p allerdings nicht nachgewiesen werden.

Interessanterweise gibt es eine starke Wechselwirkung zwischen der O-GlcNAc Glykosylierung und Phosphorylierung von Proteinen, da sie dieselben Andockstellen (Serin- und Threoninreste) am Protein belegen [271]. Der Wettstreit zwischen beiden Modifizierungen dient besonders der Regulation von Transkription, Translation und von zellulären Signalkaskaden.

Der Wettbewerb beider posttranslationaler Proteinmodifikationen liefert eine mögliche Erklärung, weshalb bisher so wenige mt glykosylierte Proteine identifiziert wurden. In Übereinstimmung dazu stellt das wahrscheinlich glykosylierte Serin an der Aminosäureposition 112 von Om45p, laut dem Prognoseprogramm *NetPhos* [272], ebenfalls eine sehr wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle dar. Eine Glykosylierung von Om45p müsste demzufolge unter fermentativen Bedingungen untersucht werden.

Werden die Funktionen des OM-Komplexes mittels Phosphorylierungen reguliert?

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist eine der wichtigsten Regulationsformen von intrazellulären biologischen Prozessen. Da eine übertragene Phosphatgruppe eine polare Ladung besitzt, führt eine Phosphorylierung oft zu Konformationsänderungen eines Proteins. Dadurch kann meist zwischen einer aktivierten und einer deaktivierten Proteinform unterschieden werden.

Über phosphorylierte Proteine in den Mitochondrien der Hefe ist bisher ebenfalls recht wenig bekannt. Dennoch konnten beispielsweise phosphorylierte Formen bei den beiden UEs der ATP-Synthase, Atp1p und Atp2p [273] und von Por1p [170] in der Hefe *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Auffallenderweise sind genau zu diesen Proteinen Homologe in Säugetieren als glykosyliert identifiziert worden [262, 267].

Der Transport von metabolischen Intermediaten durch die mt Membranen könnte über Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozesse reguliert sein.

In diesem Sinne wäre es möglich, dass die OM-Proteine Om14p und Om45p bei nicht-fermentativen Bedingungen Phosphatreste auf Porin oder die IM-Transporter übertragen und dadurch deren Selektivität bzw. Konformation beeinflussen. So wurde z. B. gezeigt, dass sich die Porinpore der Hefe durch die Gegenwart von Glukose schließt und eine Phosphorylierung des humanen ADP / ATP-Transporters hANT bedeutend für den Austausch von ADP und ATP ist [274, 275].

Der Serinrest an Position 238 von Por1p stellt möglicherweise neben der putativen Glykosylierungsstelle ebenfalls eine sehr wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle dar (*NetPhos*, [272]). Die Untersuchungen von Reinders *et al.* [276] verweisen auf eine

(S109) und die von Albuquerque *et al.* [277] auf drei weitere (S2, T103 und T117) phosphorylierte Aminosäuren von Por1p. Ohlmeier *et al.* [170] zeigten allerdings auch, dass die Phosphorylierung von Por1p durch einen *diauxic shift* nicht beeinflusst wird und schlussfolgerten, dass diese Modifikation wahrscheinlich nicht beim Öffnen und Schließen der Pore involviert ist.

Eine weitere denkbare Regulationsstelle der Porinpore durch Phosphorylierungen besteht durch die vorgeschlagene Funktion von Om14p und Om45p, die Porinpore für selektive Transportprozesse mit spezifischen mt Proteinen der IM zu verbinden. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen könnten durch die Phosphorylierungsstadien der beiden OM-Proteine reguliert sein.

Om14p verfügt über zwei Serinreste (S12 und S15), die nach einem *diauxic shift* phosphoryliert werden [170, 278]. Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen eine Phosphorylierung von Om14p (Vgl. Abb. 3.7).

Om45p, für welches ebenfalls eine Proteinphosphorylierung vermutet werden kann, weist gemäß der *NetPhos* [272] Vorhersage zwei sehr wahrscheinliche Phosphorylierungsstellen auf (S112 und S243). In Übereinstimmung mit den 2D mt Proteomauftrennungen in dieser Arbeit (Abb. 3.18) wurde Om45p ebenfalls in zwei verschiedenen *Spots* mit gleichem MW und einer zusätzlichen, wahrscheinlich fragmentierten, Form von Ohlmeier und Kollegen [141] nachgewiesen. Die Charakterisierung des mt Phosphoproteoms der Hefe offenbarte einen bisher nicht identifizierten phosphorylierten *Spot* in der Gelregion von Om45p [170]. Eine passende Übereinstimmung mit Om45p wurde allerdings mit MS Analysen nicht erzielt (persönliche Kommunikation mit Steffen Ohlmeier). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen von Om45p-cMyc mit dem Einsatz der λ -PP führten zu keinem eindeutigen Ergebnis in Bezug auf phosphorylierte Stadien von Om45p (Vgl. Abb. 3.7). Mit Hilfe einer neu entwickelten multidimensionalen Chromatographie-Technologie zur Reinigung und Fraktionierung von Phosphopeptiden konnten Albuquerque *et al.* [277] allerdings für Om45p zwei Phosphorylierungsstellen (S170 und T207) identifizieren.

Die vermutete Steuerung der Proteinwechselwirkungen über phosphorylierte Stadien von Om14p und Om45p ist daher möglich. Außerdem könnten die OM-Proteine in Form einer Signalkaskade Phosphatreste auf die mt Transportproteine übertragen und dadurch deren Selektivität regulieren.

4.5 Evolutionäre Konservierung der OM-Proteine

Die Daten dieser Arbeit weisen auf wichtige Funktionen der OM-Proteine Om14p und Om45p in Bezug auf den respiratorischen Stoffwechsel hin. Höhere Eukaryonten sind durch eine obligat aerobe Atmung charakterisiert. Dies impliziert, dass zu Om14p und Om45p homologe Proteine in höheren Eukaryonten vorhanden sein müssten, wie das

auch für Porin und die gängigsten *Carrier*-Proteine der IM der Fall ist. Auf die Aminosäuresequenz bezogen, scheint es allerdings keine homologen Proteine von Om14p und Om45p in höheren Eukaryonten zu geben. Vielmehr ist die Homologie auf knospende Hefen (Familie *Saccharomycetaceae*) beschränkt [125, 132].

Eine effiziente Organisation der mt Importprozesse bringt jedoch entscheidende Vorteile für die mt Funktionen, so dass wahrscheinlich orthologe Proteine die Funktion von Om14p und Om45p in höheren Organismen substituieren. Ein solcher Sachverhalt wird beispielsweise auch für den mt *Carrier* Yhm2p vermutet [80].

Ein den OM-Proteinen Om14p und Om45p funktionell recht ähnlich agierendes Protein in höheren Eukaryonten stellt das humane Translokatorprotein der mt OM (TSPO) dar. TSPO, früher auch als peripherer Benzodiazepinrezeptor (PBR) bezeichnet, ist wie Om14p, ein kleines Protein mit 18 kDa [279] und durch fünf TMDs in der OM verankert [280, 281]. Erwähnenswert ist insbesondere, dass es sich bei TSPO um ein von den Archaeen bis zu den Metazoen stark konserviertes Protein handelt, es jedoch kein Bestandteil des Proteoms von *S. cerevisiae* ist [282]. TSPO wurde insbesondere an den Kontaktstellen der beiden mt Membranen nachgewiesen [280, 283, 284]. Es interagiert, analog zu dem identifizierten Interaktom der OM-Proteine von *S. cerevisiae*, mit der Porinpore (VDAC) und dem Adenin Nukleotid Translokator (ANT) [282, 285] und vermittelt dadurch die Kontakte von beiden mt Membranen. Die Hauptfunktion von TSPO liegt im Transport von Molekülen wie Anionen, Cholesterin, Porphyrin und Proteinen aus dem Zytoplasma ins Mitochondrium [279, 286–288], was ebenfalls eine Ähnlichkeit zu den Hefeproteinen Om14p und Om45p demonstriert.

Ein weiteres möglicherweise zu Om45p orthologes Protein von höheren eukaryontischen Organismen stellt die mt Kreatinkinase (mtCK) dar. Sie hat ein MW P von ca. 47 kDa und ist im IMS lokalisiert (UniProt Datenbank, [237]). Die mtCK ist analog zu TSPO v. a. in mt Kontaktstellen der OM und IM nachgewiesen worden [289]. Sie interagiert direkt mit VDAC und wahrscheinlich indirekt über Cardiolipin mit ANT wodurch ein funktionales Mikrokompartment gebildet wird [290–293]. Interessanterweise existiert in *S. cerevisiae* ebenfalls kein zur mtCK homologes Protein [108]. Die bekannteste Funktion der mtCK ist die Phosphorylierung von Kreatin. In diesem Zusammenhang übernimmt die mtCK das durch ANT transportierte ATP und erzeugt damit aus Kreatin Phosphokreatin, welches anschließend über den Porinkanal ins Zytoplasma transportiert wird [294]. Eine weitere Funktion der mtCK, die mit den Hefeproteinen Om14p und Om45p im Einklang steht, wird in der Regulierung der oxidativen Phosphorylierung gesehen, zudem scheint die Assoziation der mtCK mit ANT Substrat-abhängig zu sein [290, 292, 293, 295, 296].

Ein direktes Zusammenwirken der beiden Proteine TSPO und mtCK, außer der gemeinsamen Lokalisation in einem funktionellen Proteinkomplex, wurde bisher nicht untersucht. Ein Sequenzabgleich mit der *Software BLASTp* [297] zwischen Om14p mit TSPO bzw. Om45p und der mtCK lieferte keine signifikante Ähnlichkeit. Dennoch stellen TSPO und die mtCK aufgrund der dargestellten Ähnlichkeiten zwei putativ orthologe Proteine zu Om14p und Om45p dar.

4.6 Weiterführende Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit hat einige Vermutungen hinsichtlich der Funktion der OM-Proteine Om14p und Om45p erbracht, die mit initialen Untersuchungen auch experimentell bestätigt werden konnten. Zur Verifizierung dieser Thesen sollten in der Zukunft beispielsweise folgende Analysen durchgeführt werden:

Visualisierung eines vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyps

Die Untersuchungen dieser Arbeit weisen auf eine Rolle der OM-Proteine Om14p und Om45p in Bezug auf den Ethanol-Metabolismus hin. Insbesondere bei einem *diauxic shift* vom Glukose- zum Ethanolmetabolismus fallen in der Zelle sehr hohe Ethanol-Konzentrationen an, da zuvor Glukose zu Ethanol metabolisiert wurde. Die OM-Proteine dienen in diesem Fall wahrscheinlich der schnellen Verwertung des Ethanols. Die Adaption an den respiratorischen Stoffwechsel ist durch zahlreiche mit Importvorgänge von Cofaktoren mit Enzyme, Metaboliten sowie kernkodierte Vorläuferproteinen gekennzeichnet. Würden die Hefen nach einer Vorkultivierung in Glukose-haltigem Medium in Medium mit sehr hohen Ethanol-Konzentrationen (z. B. 15 %) versetzt werden, müsste laut der aufgestellten Theorie im Zeitfenster der metabolischen Umstellung ein schnelleres Wachstum der Wildtyphefe im Gegensatz zur Doppelmutante $\Delta om14 \Delta om45$ sichtbar werden. Bereits durchgeführte Untersuchungen des Hefewachstums (Messungen der OD₆₀₀ und Untersuchungen des *forward scatters* im Durchflusszytometer) mit unterschiedlichen Ethanol- und Sauerstoff-Konzentrationen deuten einen Unterschied beider Stämme an (Daten nicht gezeigt).

Visualisierung der Porinporenöffnung

Auf der Basis des Funktionsmodells von Om14p und Om45p im Sinne einer Effizienzsteigerung mit Transportprozesse, stellt die Koordination der Porinporenöffnung eine Möglichkeit der Einflussnahme dar. Zur Visualisierung der Porinporen eignen sich beispielsweise Methoden wie die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Initiale Studien wurden bereits mit beiden Methoden am Leibniz-Institut für Polymerforschung (IPF) durchgeführt.

Damit bei einer Kryo-TEM die zu untersuchende Probe durchstrahlt werden kann, ist es extrem wichtig, dass die Probe sehr dünn (< 100 nm) ist (persönliche Mitteilung von Petr Formanek). Dies erschwert die Betrachtung von intakten Mitochondrien.

Eine weitere Herausforderung liegt in der Pufferung der isolierten Mitochondrien bzw. der OM, da der osmotisch stabilisierende Puffer D (Vgl. Kapitel 2.5.2 in Material und Methoden) durch den hohen Zuckergehalt eine TEM negativ zu beeinflussen scheint.

TEM-Aufnahmen von mt OMs [115] zeigen, dass die Identifikation von Unterschieden zwischen der Wildtyp-OM und der von Deletionsmutanten hinsichtlich der Porinporenöffnung aufgrund des Auflösungsvermögens sehr schwierig sein wird.

Mit einer AFM werden Oberflächen im nm-Bereich mechanisch abgetastet. Eine Visualisierung der Porinporen mittels AFM wurde bereits von Gonçalves *et al.* [114] und Hoogenboom *et al.* [115] durchgeführt. Auch mit dieser Methode ist es aufgrund der Größe kaum möglich, die Oberfläche von intakten Mitochondrien zu untersuchen. Die Isolation der mt OM sollte daher insbesondere im Fokus von weiterführenden Arbeiten stehen.

Bestimmung des ATP-Flusses durch mt Membranen

In dieser Arbeit wurde ein Nachweisverfahren etabliert, um exportiertes ATP zeitabhängig nachzuweisen (Kapitel 2.5.15). Diese Methode ist zum derzeitigen Entwicklungsstand allerdings nicht optimal und lässt zudem keine Trennung von der mt ATP-Synthese zu.

Neben dem Einsatz radioaktiv-markierter Moleküle zur Aktivitätsbestimmung des Porinkanals [298], stellt die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) eine weitere Möglichkeit dar, den Fluss von ATP-Molekülen durch mt Membranen zu analysieren.

Mit einer FCS werden die Fluktuationen von Fluoreszenzintensitäten bestimmt, so dass die Beweglichkeit von einzelnen fluoreszenzmarkierten Molekülen in ganzen Zellen oder in einer Lösung mit subzellulären Strukturen veranschaulicht werden kann [299]. Mit einer modifizierten FCS-Methode, der *peak intensity analysis* (PIA), wurde bereits die ATP-Transportaktivität von VDAC bestimmt [300, 301].

Mit fluoreszenzmarkiertem ATP (ATP-Cy5) wurde am *Biotechnology Center* der TU Dresden initial versucht, den Transfer des ATPs zu bestimmen. Die Untersuchung von ganzen Hefezellen erwies sich durch die Dynamik des mt Netzwerkes dabei als nicht geeignet. Eine FCS mit enzymatisch isolierten und Gradienten-gereinigten Mitochondrien und fluoreszenzmarkiertem ATP scheint dagegen erfolgversprechend zu sein, da eine Zunahme der Fluoreszenzsignale in den Mitochondrien mit der Zeit mikroskopisch festgestellt werden konnte. Ein Vergleich der FCS-Messungen von ATP-Cy5 allein mit ATP-Cy5 in Gegenwart von Mitochondrien zeigte jedoch keinen Unterschied, so dass das Verfahren für dieses Anliegen zunächst etabliert werden müsste.

Der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem ADP in Kombination mit einer Aktivierung der mt Atmungskette, die zu einem Import von ADP führen würde, wäre in diesem

Zusammenhang sinnvoll. Die Messung innerhalb intakter Hefezellen könnte durch eine defekte mt Teilungsmaschinerie (z. B. $\Delta fis1$) im Hintergrund ermöglicht werden, da sich die mt Akkumulation der Mutante nicht mehr bewegen sollte. Inwieweit dies jedoch Einfluss auf den ADP / ATP-Transport hätte, müsste in diesem Zusammenhang geklärt werden. Messungen in Gegenwart von Inhibitoren des ADP / ATP-Transporters (z. B. BKA) oder der Porinpore (z. B. Phosphorothioat-Oligonukleotide [302]) könnten der Evaluation eines FCS-Tests dienen.

Zusammenfassung

Aufgrund der vielfältigen metabolischen Prozesse und Funktionen von Mitochondrien finden durch beide mitochondriale Membranen zahlreiche Transportprozesse statt. Es wird weitgehend angenommen, dass der Transfer von metabolischen Intermediaten durch die äußere Membran von den zahlreichen Porinporen gewährleistet wird. Im Gegensatz dazu sind in der inneren Membran spezifische Transportproteine für die Translokationsprozesse verantwortlich.

Neben dem gut untersuchten Porinmolekül (Por1p) gibt es in der Hefe *S. cerevisiae* unter respiratorischen Bedingungen zwei weitere abundante, aber funktionell unbekannte Proteine in der äußeren Membran von Mitochondrien - Om14p und Om45p -, deren molekular-biologische Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit war.

Mit drei unabhängigen Methoden (2D BN - SDS-PAGE, Co-IP und TAP) konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine Om14p und Om45p zusammen mit Por1p einen Proteinkomplex in der äußeren Membran ausbilden, wobei Por1p eine von Om14p und Om45p unabhängige Porenstruktur ausbildet. Bei Bedarf, möglicherweise über Phosphorylierungen signalisiert, binden Om14p und Om45p an diese Struktur, wobei Om45p dabei der direkten Interaktion von Om14p mit Por1p bedarf.

Die Identifikation von Interaktionspartnern des Fusionsproteins Om14p-TAP durch Einsatz einer präparativen TAP mit anschließender massenspektrometrischer Analyse sowie die Untersuchungen der Effekte von *OM14*- und / oder *OM45*- Gendeletionen auf das mitochondriale Proteom mit einem 2D DIGE-Verfahren führten zur Aufstellung von funktionalen Zusammenhängen des Proteinpaares Om14p / Om45p. Mit Wachstumsuntersuchungen von Deletionsmutanten in Gegenwart von in den Mitochondrien toxisch wirkenden Substanzen sowie durch ein in dieser Arbeit entwickeltes Testverfahren zur Bestimmung des mitochondrialen ATP-Flusses, konnten die funktionalen Hypothesen für die Proteine Om14p und Om45p initial verifiziert werden.

Zusammengefasst unterstützen die Daten dieser Arbeit die Idee von einem hochgradig flexiblen System der Mitochondrien, zur Gewährleistung von effizienten Transportvorgängen durch beide Membranen. Eine koordinierte Bindung der Porinpore an die spezifischen Transporter der inneren Membran wird wahrscheinlich durch die Aktivität des Protein-

paares Om14p / Om45p vermittelt (schematische Darstellung in Abb. 4.5). In diesem Zusammenhang könnten beide Proteine als eine Art Lizenzierungsfaktor fungieren und die Positionierung der Porinpore an die entsprechenden Proteine der inneren Membran erzeugen. Dadurch würde ein effektives System für den Austausch von metabolischen Intermediaten und Substraten der mitochondrialen Atmungskette entstehen.

Ebenfalls durch diese Arbeit nicht auszuschließen ist die Vorstellung, dass die Proteine Om14p und Om45p einen Einfluss auf die spezifischen Transportproteine der inneren Membran oder die Porinpore der äußeren Membran ausüben. Phosphatrest-Übertragungen, die zu Konformationsänderungen oder Porenöffnungen führen könnten, sind beispielsweise vorstellbar.

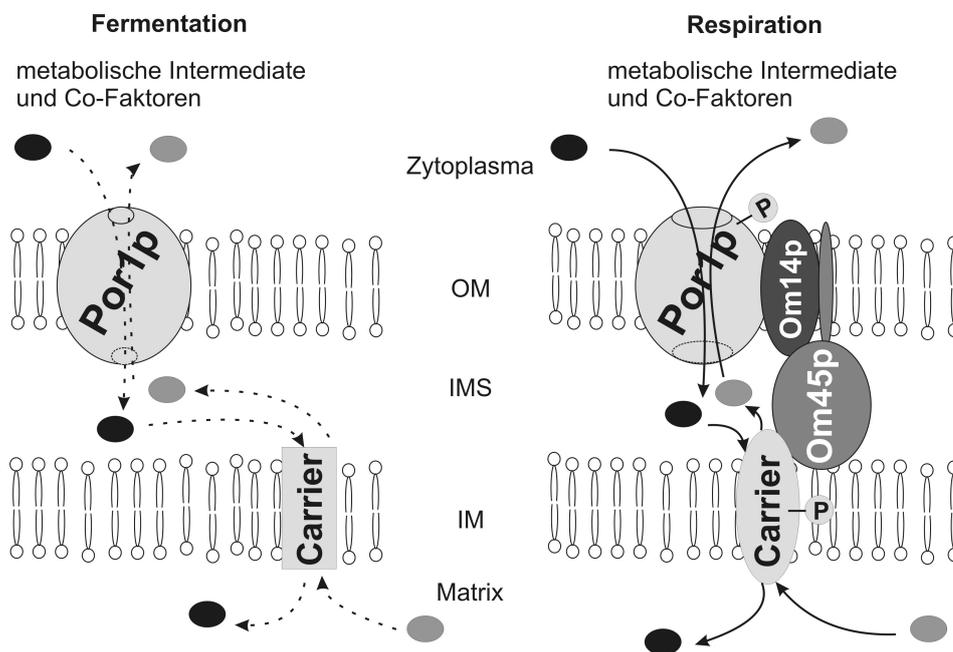


Abbildung 4.5: Funktionsmodell des Proteinpaares Om14p / Om45p

Die Anwesenheit der Proteine Om14p und Om45p unter nicht-fermentativen Bedingungen und deren putative Funktion in Bezug auf die Herstellung einer Verbindung der Porinpore in der äußeren Membran (OM) mit einem spezifischen Transportprotein in der inneren Membran (IM) ist schematisch, aber nicht maßstabsgerecht dargestellt. Weitere Möglichkeiten wie die Einflussnahme auf die Konformation des IM-Translokators bzw. in der Porinporenöffnung sind ebenfalls angedeutet. Gestrichelte Linien verdeutlichen ineffiziente Transportvorgänge.

Die Stoffwechseladaption einer Zelle bei einem *diauxic shift* ist durch einen verstärkten mitochondrialen Import von Metaboliten, Co-Faktoren und Proteinen sowie häufigerer mitochondrialer Teilungsprozesse charakterisiert. Om14p und Om45p sind bei einem Wechsel zu nicht-fermentativen Bedingungen verstärkt präsent. Diese beiden Proteine könnten der Hefe einen entscheidenden Vorteil bei der Synchronisierung der genannten Prozesse liefern, indem sie eine verbesserte Erreichbarkeit bzw. eine Veränderung der Selektivität von bereitgestellten Kanälen bzw. Transportproteinen in beiden mitochondrialen Membranen bewirken.

Literaturverzeichnis

- [1] Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283 (5407) 1476–1481 PMID: 10066161.
- [2] Dyall, S. D., Brown, M. T. und Johnson, P. J. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304 (5668) 253–257 PMID: 15073369.
- [3] Reichert, A. S. und Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592 (1) 41–49 PMID: 12191767.
- [4] Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. und Reichert, A. S. (2006) Dynamic sub-compartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175 (2) 237–247 PMID: 17043137.
- [5] Okamoto, K. und Shaw, J. M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39 503–536 PMID: 16285870.
- [6] Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2 (6) reviews 1018.1–1018.5 PMID: 11423013.
- [7] Tsang, W. Y. und Lemire, B. D. (2003) The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1638 (2) 91–105 PMID: 12853115.
- [8] Dimmer, K. S. und Rapaport, D. (2008) Proteomic view of mitochondrial function. *Genome Biol* 9 (2) 209 PMID: 18331620.
- [9] Lopez, M. F., Kristal, B. S., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Shestopalov, A. I., Bogdanova, A. und Robinson, M. (2000) High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* 21 (16) 3427–3440 PMID: 11079563.
- [10] Rea, S. L., Graham, B. H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A. und Falk, M. J. (2010) Bacteria, yeast, worms, and flies: Exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* 16 (2) 200–218 PMID: 20818735.
- [11] Pereira, C., Silva, R. D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M. J. und Côrte-Real, M. (2008) Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1783 (7) 1286–1302 PMID: 18406358.

- [12] Carlucci, A., Lignitto, L. und Feliciello, A. (2008) Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol* 18 (12) 604–613 PMID: 18951795.
- [13] Schapira, A. H. V. (2012) Mitochondrial diseases. *Lancet* 379 (9828) 1825–1834 PMID: 22482939.
- [14] van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A. und Pronk, J. T. (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* 63 (3-4) 343–352 PMID: 8279829.
- [15] International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822) 860–921 PMID: 11237011.
- [16] Foury, F. und Kucej, M. (2002) Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 6 (1) 106–111 PMID: 11827833.
- [17] Rapaport, D. (2003) Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep.* 4 (10) 948–952 PMID: 14528265.
- [18] Braun, R. J. und Westermann, B. (2011) Mitochondrial dynamics in yeast cell death and aging. *Biochem Soc Trans* 39 (5) 1520–1526 PMID: 21936845.
- [19] Zungu, M., Schisler, J. und Willis, M. S. (2011) All the Little Pieces. -Regulation of Mitochondrial Fusion and Fission by Ubiquitin and Small Ubiquitin-Like Modifier and Their Potential Relevance in the Heart- *Circ J* 75 (11) 2513–2521 PMID: 22001293.
- [20] Westermann, B. (2008) Molecular Machinery of Mitochondrial Fusion and Fission. *J Biol Chem* 283 (20) 13501–13505 PMID: 18372247.
- [21] Frederick, R. L. und Shaw, J. M. (2007) Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. *Traffic* 8 (12) 1668–1675 PMID: 17944806.
- [22] Hobbs, A. E. A., Srinivasan, M., McCaffery, J. M. und Jensen, R. E. (2001) Mmm1p, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, Is Connected to Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleoids and Required for mtDNA Stability. *J Cell Biol* 152 (2) 401–410 PMID: 11266455.
- [23] Elbaz, Y. und Schuldiner, M. (2011) Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem Sci* 36 (11) 616–623 PMID: 21958688.
- [24] Toulmay, A. und Prinz, W. A. (2011) Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr Opin Cell Biol* 23 (4) 458–463 PMID: 21555211.
- [25] Lebiezinska, M., Szabadkai, G., Jones, A. W. E., Duszynski, J. und Wieckowski, M. R. (2009) Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (10) 1805–1816 PMID: 19703651.
- [26] Copeland, D. E. und Dalton, A. J. (1959) An Association between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Cells of the Pseudobranch Gland of a Teleost. *J Biophys Biochem Cytol* 5 (3) 393–396 PMID: 13664679.

- [27] Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S. D., Perktold, A., Zellnig, G. und Daum, G. (1999) Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem* 264 (2) 545–553 PMID: 10491102.
- [28] Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., de Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T. und Rizzuto, R. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *J Cell Biol* 175 (6) 901–911 PMID: 17178908.
- [29] de Brito, O. M. und Scorrano, L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456 (7222) 605–610 PMID: 19052620.
- [30] Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S. und Schuldiner, M. (2009) Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323 (5922) 1693–1697 PMID: 19325107.
- [31] Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. und Walter, P. (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325 (5939) 477–481 PMID: 19556461.
- [32] Rizzuto, R. und Pozzan, T. (2006) Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiol Rev* 86 (1) 369–408 PMID: 16371601.
- [33] Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C. und Brenner, C. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27 (3) 285–299 PMID: 17700538.
- [34] Cheng, W.-C., Leach, K. M. und Hardwick, J. M. (2008) Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1783 (7) 1272–1279 PMID: 18477482.
- [35] Lawen, A. (2007) Another piece of the puzzle of apoptotic cytochrome *c* release. *Mol Microbiol* 66 (3) 553–556 PMID: 17887962.
- [36] Pereira, C., Camougrand, N., Manon, S., Sousa, M. J. und Côrte-Real, M. (2007) ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome *c* release in yeast apoptosis. *Mol Microbiol* 66 (3) 571–582 PMID: 17822411.
- [37] Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. und Youle, R. J. (2001) The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev Cell* 1 (4) 515–525 PMID: 11703942.
- [38] Fannjiang, Y., Cheng, W.-C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basañez, G. und Hardwick, J. M. (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* 18 (22) 2785–2797 PMID: 15520274.

- [39] Lithgow, T. und Schneider, A. (2010) Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365 (1541) 799–817 PMID: 20124346.
- [40] Neupert, W. und Herrmann, J. M. (2007) Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76 723–749 PMID: 17263664.
- [41] Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W. und Stuart, R. A. (1999) The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem* 274 (30) 20937–20942 PMID: 10409639.
- [42] Hell, K. (2008) The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1783 (4) 601–609 PMID: 18179776.
- [43] van der Laan, M., Hutu, D. P. und Rehling, P. (2010) On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. *Biochim Biophys Acta* 1803 (6) 732–739 PMID: 20100523.
- [44] Kutik, S., Guiard, B., Meyer, H. E., Wiedemann, N. und Pfanner, N. (2007) Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *J Cell Biol* 179 (4) 585–591 PMID: 17998403.
- [45] Neupert, W. und Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (8) 555–565 PMID: 12154367.
- [46] Becker, T., Vögtle, F.-N., Stojanovski, D. und Meisinger, C. (2008) Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1777 (7-8) 557–563 PMID: 18423394.
- [47] Koehler, C. M. (2004) New Developments in Mitochondrial Assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 309–335 PMID: 15473843.
- [48] Mühlenbein, N., Hofmann, S., Rothbauer, U. und Bauer, M. F. (2004) Organization and Function of the Small Tim Complexes Acting along the Import Pathway of Metabolite Carriers into Mammalian Mitochondria. *J Biol Chem* 279 (14) 13540–13546 PMID: 14726512.
- [49] Paschen, S. A. und Neupert, W. (2001) Protein Import Into Mitochondria. *IUBMB Life* 52 (3-5) 101–112 PMID: 11798021.
- [50] Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. und Gulbis, J. M. (2006) Crystal Structure of the Mitochondrial Chaperone TIM9•10 Reveals a Six-Bladed α -Propeller. *Mol Cell* 21 (1) 123–133 PMID: 16387659.
- [51] Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L. K. S., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schönfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Yaffe, M. P., Guiard, B., Wiedemann, N. und Pfanner, N. (2004) The Mitochondrial Morphology Protein Mdm10 Functions in Assembly of the Preprotein Translocase of the Outer Membrane. *Dev Cell* 7 (1) 61–71 PMID: 15239954.
- [52] Meisinger, C., Pfannschmidt, S., Rissler, M., Milenkovic, D., Becker, T., Stojanovski, D., Youngman, M. J., Jensen, R. E., Chacinska, A., Guiard, B., Pfanner, N. und Wiedemann, N. (2007) The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the

- major β -barrel assembly pathway of mitochondria. *EMBO J* 26 (9) 2229–2239 PMID: 17410204.
- [53] Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W. und Rapaport, D. (2005) Signal-anchored Proteins Follow a Unique Insertion Pathway into the Outer Membrane of Mitochondria. *J Biol Chem* 280 (1) 48–53 PMID: 15501820.
- [54] Otera, H., Taira, Y., Horie, C., Suzuki, Y., Suzuki, H., Setoguchi, K., Kato, H., Oka, T. und Mihara, K. (2007) A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J Cell Biol* 179 (7) 1355–1363 PMID: 18158327.
- [55] Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W. und Rapaport, D. (2005) Assembly of the TOB Complex of Mitochondria. *J Biol Chem* 280 (8) 6434–6440 PMID: 15590639.
- [56] Palmieri, F., Pierri, C. L., de Grassi, A., Nunes-Nesi, A. und Fernie, A. R. (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* 66 (1) 161–181 PMID: 21443630.
- [57] Palmieri, F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447 (5) 689–709 PMID: 14598172.
- [58] Arco, A. D. und Satrústegui, J. (2005) New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* 62 (19-20) 2204–2227 PMID: 16132231.
- [59] Palmieri, F., Agrimi, G., Blanco, E., Castegna, A., di Noia, M. A., Iacobazzi, V., Lasorsa, F. M., Marobbio, C. M. T., Palmieri, L., Scarcia, P., Todisco, S., Vozza, A. und Walker, J. (2006) Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins *Biochim Biophys Acta* 1757 (9-10) 1249–1262 PMID: 16844075.
- [60] Bamber, L., Harding, M., Butler, P. J. G. und Kunji, E. R. S. (2006) Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (44) 16224–16229 PMID: 17056710.
- [61] Bamber, L., Slotboom, D.-J. und Kunji, E. R. S. (2007) Yeast Mitochondrial ADP/ATP Carriers Are Monomeric in Detergents as Demonstrated by Differential Affinity Purification. *J Mol Biol* 371 (2) 388–395 PMID: 17572439.
- [62] Bamber, L., Harding, M., Monné, M., Slotboom, D.-J. und Kunji, E. R. S. (2007) The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (26) 10830–10834 PMID: 17566106.
- [63] Kunji, E. R. S. und Crichton, P. G. Mitochondrial carriers function as monomers. *Biochim Biophys Acta* 1797 (6-7) 817–831 PMID: 20362544.
- [64] Adrian, G. S., McCammon, M. T., Montgomery, D. L. und Douglas, M. G. (1986) Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* 6 (2) 626–634 PMID: 3023860.
- [65] Kolarov, J., Kolarova, N. und Nelson, N. (1990) A Third ADP/ATP Translocator Gene in Yeast. *J Biol Chem* 265 (21) 12711–12716 PMID: 2165073.

- [66] Azuma, M., Kabe, Y., Kuramori, C., Kondo, M., Yamaguchi, Y. und Handa, H. (2008) Adenine Nucleotide Translocator Transports Haem Precursors into Mitochondria. *PLoS One* 3 (8) e3070 PMID: 18728780.
- [67] Smith, C. P. und Thorsness, P. E. (2008) The Molecular Basis for Relative Physiological Functionality of the ADP/ATP Carrier Isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179 (3) 1285–1299 PMID: 18562646.
- [68] Lawson, J. E. und Douglas, M. G. (1988) Separate Genes Encode Functionally Equivalent ADP/ATP Carrier Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and Analysis of AAC2. *J Biol Chem* 263 (29) 14812–14818 PMID: 2844786.
- [69] Cavero, S., Traba, J., del Arco, A. und Satrústegui, J. (2005) The calcium-dependent ATP-Mg/P_i mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 392 (Pt 3) 537–544 PMID: 16111475.
- [70] Traba, J., Satrústegui, J. und del Arco, A. (2009) Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: Interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/P_i carrier *Mitochondrion* 9 (2) 79–85 PMID: 19460304.
- [71] Laco, J., Zeman, I., Pevala, V., Polčič, P. und Kolarov, J. (2010) Adenine nucleotide transport via Sall carrier compensates for the essential function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *FEMS Yeast Res* 10 (3) 290–296 PMID: 20141534.
- [72] Marobbio, C. M. T., Voza, A., Harding, M., Bisaccia, F., Palmieri, F. und Walker, J. E. (2002) Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate. *EMBO J* 21 (21) 5653–5661 PMID: 12411483.
- [73] Palmieri, L., Rottensteiner, H., Girzalsky, W., Scarcia, P., Palmieri, F. und Erdmann, R. (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* 20 (18) 5049–5059 PMID: 11566870.
- [74] Wohlrab, H. und Briggs, C. (1994) Yeast mitochondrial phosphate transport protein expressed in *Escherichia coli*. Site-directed mutations at threonine-43 and at a similar location in the second tandem repeat (isoleucine-141). *Biochemistry* 33 (32) 9371–9375 PMID: 8068613.
- [75] Zara, V., Dietmeier, K., Palmisano, A., Voza, A., Rassow, J., Palmieri, F. und Pfanner, N. (1996) Yeast mitochondria lacking the phosphate carrier/p32 are blocked in phosphate transport but can import preproteins after regeneration of a membrane potential. *Mol Cell Biol* 16 (11) 6524–6531 PMID: 8887681.
- [76] Marobbio, C. M. T., Agrimi, G., Lasorsa, F. M. und Palmieri, F. (2003) Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine. *EMBO J* 22 (22) 5975–5982 PMID: 14609944.
- [77] Voza, A., Blanco, E., Palmieri, L. und Palmieri, F. (2004) Identification of the Mitochondrial GTP/GDP Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279 (20) 20850–20857 PMID: 14998997.

- [78] Palmieri, L., Lasorsa, F. M., de Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (1997) Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate *FEBS Lett* 417 (1) 114–118 PMID: 9395087.
- [79] Kaplan, R. S., Mayor, J. A., Gremse, D. A. und Wood, D. O. (1995) High Level Expression and Characterization of the Mitochondrial Citrate Transport Protein from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270 (8) 4108–4114 PMID: 7876161.
- [80] Castegna, A., Scarcia, P., Agrimi, G., Palmieri, L., Rottensteiner, H., Spera, I., Germinario, L. und Palmieri, F. (2010) Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Carrier for Citrate and Oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285 (23) 17359–17370 PMID: 20371607.
- [81] Palmieri, L., Agrimi, G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Palmieri, F. und Walker, J. E. (2001) Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of Two Isoforms of a Novel Mitochondrial Transporter for 2-Oxoadipate and 2-Oxoglutarate. *J Biol Chem* 276 (3) 1916–1922 PMID: 11013234.
- [82] Trotter, P. J., Adamson, A. L., Ghrist, A. C., Rowe, L., Scott, L. R., Sherman, M. P., Stites, N. C., Sun, Y., Tawiah-Boateng, M. A., Tibbetts, A. S., Wadington, M. C. und West, A. C. (2005) Mitochondrial transporters involved in oleic acid utilization and glutamate metabolism in yeast. *Arch Biochem Biophys* 442 (1) 21–32 PMID: 16140254.
- [83] Tibbetts, A. S., Sun, Y., Lyon, N. A., Ghrist, A. C. und Trotter, P. J. (2002) Yeast mitochondrial oxodicarboxylate transporters are important for growth on oleic acid. *Arch Biochem Biophys* 406 (1) 96–104 PMID: 12234495.
- [84] Cavero, S., Voza, A., del Arco, A., Palmieri, L., Villa, A., Blanco, E., Runswick, M. J., Walker, J. E., Cerdán, S., Palmieri, F. und Satrústegui, J. (2003) Identification and metabolic role of the mitochondrial aspartate-glutamate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 50 (4) 1257–1269 PMID: 14622413.
- [85] Palmieri, L., de Marco, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (1997) Identification of the yeast *ARG-11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett* 410 (2-3) 447–451 PMID: 9237680.
- [86] Palmieri, L., Lasorsa, F. M., Iacobazzi, V., Runswick, M. J., Palmieri, F. und Walker, J. E. (1999) Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 462 (3) 472–476 PMID: 10622748.
- [87] Todisco, S., Agrimi, G., Castegna, A. und Palmieri, F. (2006) Identification of the Mitochondrial NAD⁺ Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281 (3) 1524–1531 PMID: 16291748.
- [88] Marobbio, C. M. T., di Noia, M. A. und Palmieri, F. (2006) Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization. *Biochem J* 393 (Pt 2) 441–446 PMID: 16194150.

- [89] Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. und Iacobazzi, V. (1995) Mitochondrial metabolite carrier proteins: Purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol* 260 349–369 PMID: 8592459.
- [90] Kakhniashvili, D., Mayor, J. A., Gremse, D. A., Xu, Y. und Kaplan, R. S. (1997) Identification of a Novel Gene Encoding the Yeast Mitochondrial Dicarboxylate Transport Protein via Overexpression, Purification, and Characterization of Its Protein Product. *J Biol Chem* 272 (7) 4516–4521 PMID: 9020177.
- [91] Palmieri, L., Vozza, A., Agrimi, G., de Marco, V., Runswick, M. J., Palmieri, F. und Walker, J. E. (1999) Identification of the Yeast Mitochondrial Transporter for Oxaloacetate and Sulfate. *J Biol Chem* 274 (32) 22184–22190 PMID: 10428783.
- [92] Prohl, C., Pelzer, W., Diekert, K., Kmita, H., Bedekovics, T., Kispal, G. und Lill, R. (2001) The Yeast Mitochondrial Carrier Leu5p and Its Human Homologue Graves' Disease Protein Are Required for Accumulation of Coenzyme A in the Matrix. *Mol Cell Biol* 21 (4) 1089–1097 PMID: 11158296.
- [93] Hamel, P., Saint-Georges, Y., de Pinto, B., Lachacinski, N., Altamura, N. und Dujardin, G. (2004) Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Microbiol* 51 (2) 307–317 PMID: 14756774.
- [94] Foury, F. und Roganti, T. (2002) Deletion of the Mitochondrial Carrier Genes *MRS3* and *MRS4* Suppresses Mitochondrial Iron Accumulation in a Yeast Frataxin-deficient Strain. *J Biol Chem* 277 (27) 24475–24483 PMID: 12006577.
- [95] Mühlhoff, U., Stadler, J. A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R. J., Lill, R. und Wiesenberger, G. (2003) A Specific Role of the Yeast Mitochondrial Carriers Mrs3/4p in Mitochondrial Iron Acquisition Under Iron-limiting Conditions. *J Biol Chem* 278 (42) 40612–40620 PMID: 12902335.
- [96] Froschauer, E. M., Schweyen, R. J. und Wiesenberger, G. (2009) The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 1788 (5) 1044–1050 PMID: 19285482.
- [97] Luk, E., Carroll, M., Baker, M. und Culotta, V. C. (2003) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires *MTM1*, a member of the mitochondrial carrier family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (18) 10353–10357 PMID: 12890866.
- [98] Tzagoloff, A., Jang, J., Glerum, D. M. und Wu, M. (1996) *FLX1* Codes for a Carrier Protein Involved in Maintaining a Proper Balance of Flavin Nucleotides in Yeast Mitochondria. *J Biol Chem* 271 (13) 7392–7397 PMID: 8631763.
- [99] Bafunno, V., Giancaspero, T. A., Brizio, C., Bufano, D., Passarella, S., Boles, E. und Barile, M. (2004) Riboflavin Uptake and FAD Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria: Involvement of the Flx1p Carrier in FAD Export. *J Biol Chem* 279 (1) 95–102 PMID: 14555654.

- [100] Dehez, F., Pebay-Peyroula, E. und Chipot, C. (2008) Binding of ADP in the Mitochondrial ADP/ATP Carrier Is Driven by an Electrostatic Funnel. *J Am Chem Soc* 130 (38) 12725–12733 PMID: 18729359.
- [101] Klingenberg, M. (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* 1778 (10) 1978–2021 PMID: 18510943.
- [102] Brandolin, G., le Saux, A., Trézéguet, V., Lauquin, G. J. und Vignais, P. V. (1993) Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 25 (5) 459–472 PMID: 8132486.
- [103] Zeman, I., Schwimmer, C., Postis, V., Brandolin, G., David, C., Trézéguet, V. und Lauquin, G. J. M. (2003) Four mutations in transmembrane domains of the mitochondrial ADP/ATP carrier increase resistance to bongkrekic acid. *J Bioenerg Biomembr* 35 (3) 243–256 PMID: 13678275.
- [104] Gavurníková, G., Šabová, L., Kiššová, I., Haviernik, P. und Kolarov, J. (1996) Transcription of the *AAC1* gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur J Biochem* 239 (3) 759–763 PMID: 8774724.
- [105] Šabová, L., Zeman, I., Supek, F. und Kolarov, J. (1993) Transcriptional control of *AAC3* gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur J Biochem* 213 (1) 547–553 PMID: 8477727.
- [106] Lawson, J. E. und Douglas, M. G. (1988) Separate Genes Encode Functionally Equivalent ADP/ATP Carrier Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and Analysis of *AAC2*. *J Biol Chem* 263 (29) 14812–14818 PMID: 2844786.
- [107] Drgoň, T., Šabová, L., Nelson, N. und Kolarov, J. (1991) ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 289 (2) 159–162 PMID: 1915842.
- [108] Cléménçon, B. (2012) Yeast Mitochondrial Interactosome Model: Metabolon Membrane Proteins Complex Involved in the Channeling of ADP/ATP. *Int J Mol Sci* 13 (2) 1858–1885 PMID: 22408429.
- [109] Colombini, M. (1980) Structure And Mode Of Action Of A Voltage Dependent Anion-Selective Channel (VDAC) Located In The Outer Mitochondrial Membrane. *Ann N Y Acad Sci* 341 552–563 PMID: 6249159.
- [110] Krasilnikov, O. V., Sabirov, R. Z., Ternovsky, V. I., Merzliak, P. G. und Muratkho-djaev, J. N. (1992) A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol Immunol* 5 (1-3) 93–100 PMID: 1384601.
- [111] Rostovtseva, T. K. und Bezrukov, S. M. (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr* 40 (3) 163–170 PMID: 18654841.

- [112] Colombini, M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257 (1-2) 107–115 PMID: 14977174.
- [113] Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M. und Colombini, M. (1998) The Sensor Regions of VDAC Are Translocated from within the Membrane to the Surface during the Gating Processes. *Biophys J* 74 (6) 2926–2944 PMID: 9635747.
- [114] Gonçalves, R. P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J. N. und Scheuring, S. (2007) Supramolecular Assembly of VDAC in Native Mitochondrial Outer Membranes. *J Mol Biol* 369 (2) 413–418 PMID: 17439818.
- [115] Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A. und Fotiadis, D. (2007) The Supramolecular Assemblies of Voltage-dependent Anion Channels in the Native Membrane. *J Mol Biol* 370 (2) 246–255 PMID: 17524423.
- [116] Mannella, C. A. (1989) Structure of the mitochondrial outer membrane channel derived from electron microscopy of 2D crystals. *J Bioenerg Biomembr* 21 (4) 427–437 PMID: 2478529.
- [117] Sampson, M. J., Ross, L., Decker, W. K. und Craigen, W. J. (1998) A Novel Isoform of the Mitochondrial Outer Membrane Protein VDAC3 via Alternative Splicing of a 3-Base Exon. Functional Characteristics and Subcellular Localization. *J Biol Chem* 273 (46) 30482–30486 PMID: 9804816.
- [118] Blachly-Dyson, E. und Forte, M. (2001) VDAC Channels. *IUBMB Life* 52 (3-5) 113–118 PMID: 11798022.
- [119] Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W. J., Colombini, M. und Forte, M. (1997) Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol* 17 (10) 5727–5738 PMID: 9315631.
- [120] Lee, A. C., Xu, X., Blachly-Dyson, E., Forte, M. und Colombini, M. (1998) The Role of Yeast VDAC Genes on the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane. *J Membr Biol* 161 (2) 173–181 PMID: 9435273.
- [121] Peng, S., Blachly-Dyson, E., Forte, M. und Colombini, M. (1992) Large scale rearrangement of protein domains is associated with voltage gating of the VDAC channel. *Biophys J* 62 (1) 123–31; discussion 131–5 PMID: 1376163.
- [122] Hodge, T. und Colombini, M. (1997) Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels. *J Membr Biol* 157 (3) 271–279 PMID: 9178614.
- [123] Benz, R., Kottke, M. und Brdiczka, D. (1990) The cationically selective state of the mitochondrial outer membrane pore: a study with intact mitochondria and reconstituted mitochondrial porin. *Biochim Biophys Acta* 1022 (3) 311–318 PMID: 1690571.
- [124] Vyssokikh, M. Y. und Brdiczka, D. (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 50 (2) 389–404 PMID: 12833165.

- [125] Burri, L., Vascotto, K., Gentle, I. E., Chan, N. C., Beilharz, T., Stapleton, D. I., Ramage, L. und Lithgow, T. (2006) Integral membrane proteins in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 273 (7) 1507–1515 PMID: 16689936.
- [126] Riezman, H., Hay, R., Gasser, S., Daum, G., Schneider, G., Witte, C. und Schatz, G. (1983) The outer membrane of yeast mitochondria: isolation of outside-out sealed vesicles. *EMBO J* 2 (7) 1105–1111 PMID: 16453466.
- [127] Yaffe, M. P., Jensen, R. E. und Guido, E. C. (1989) The Major 45-kDa Protein of the Yeast Mitochondrial Outer Membrane Is Not Essential for Cell Growth or Mitochondrial Function. *J Biol Chem* 264 (35) 21091–21096 PMID: 2687271.
- [128] Davis, C. A., Grate, L., Spingola, M. und Ares, Jr, M. (2000) Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res* 28 (8) 1700–1706 PMID: 10734188.
- [129] Kodali, V. K. und Thorpe, C. (2010) Oxidative Protein Folding and the Quiescin-Sulfhydryl Oxidase Family of Flavoproteins. *Antioxid Redox Signal* 13 (8) 1217–1230 PMID: 20136510.
- [130] Safaei, R., Adams, P. L., Maktabi, M. H., Mathews, R. A. und Howell, S. B. (2012) The CXXC motifs in the metal binding domains are required for ATP7B to mediate resistance to cisplatin. *J Inorg Biochem* 110 8–17 PMID: 22459168.
- [131] Badarau, A. und Dennison, C. (2011) Copper Trafficking Mechanism of CXXC-Containing Domains: Insight from the pH-Dependence of Their Cu(I) Affinities. *J Am Chem Soc* 133 (9) 2983–2988 PMID: 21323310.
- [132] Lauffer, S. (2006) Das mitochondriale Metalloproteom: Identifikation und Charakterisierung metallbindender mitochondrialer Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Genetik.
- [133] Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A. und Hulo, N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* 38 D161–D166 PMID: 19858104.
- [134] Mäbert, K. (2011) Charakterisierung des mitochondrialen Außenmembranproteins Om14p von *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Genetik.
- [135] Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W. und Rapaport, D. (2003) Signal-Anchor Domains of Proteins of the Outer Membrane of Mitochondria: Structural and Functional Characteristics. *J Biol Chem* 278 (43) 42064–42071 PMID: 12917440.
- [136] Sesaki, H. und Jensen, R. E. (2001) *UGO1* Encodes an Outer Membrane Protein Required for Mitochondrial Fusion. *J Cell Biol* 152 (6) 1123–1134 PMID: 11257114.
- [137] Walther, D. M. und Rapaport, D. (2009) Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793 (1) 42–51 PMID: 18501716.

- [138] Dukanovic, J. und Rapaport, D. (2011) Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808 (3) 971–980 PMID: 20599689.
- [139] Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. und Jacquet, M. (1998) Msn2p and Msn4p Control a Large Number of Genes Induced at the Diauxic Transition Which Are Repressed by Cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180 (5) 1044–1052 PMID: 9495741.
- [140] Ring, J., Sommer, C., Carmona-Gutierrez, D., Ruckenstuhl, C., Eisenberg, T. und Madeo, F. (2012) The metabolism beyond programmed cell death in yeast. *Exp Cell Res* 318 (11) 1193–1200 PMID: 22480867.
- [141] Ohlmeier, S., Kastaniotis, A. J., Hiltunen, J. K. und Bergmann, U. (2004) The Yeast Mitochondrial Proteome, a Study of Fermentative and Respiratory Growth. *J Biol Chem* 279 (6) 3956–3979 PMID: 14597615.
- [142] Kim, K. S., Rosenkrantz, M. S. und Guarente, L. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol* 6 (6) 1936–1942 PMID: 3023912.
- [143] Westermann, B. und Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16 (15) 1421–1427 PMID: 11054823.
- [144] Hickmann, L. (2009) Untersuchungen der molekularen Organisation der mitochondrialen Außenmembranproteine Om14p, Om45p und Por1p in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit, TU Dresden, Institut für Genetik.
- [145] Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6) 1513–1523 PMID: 388356.
- [146] Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. und Philippsen, P. (1997) Heterologous *HIS3* Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13 (11) 1065–1075 PMID: 9290211.
- [147] Gietz, R. D. und Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350 87–96 PMID: 12073338.
- [148] Schiestl, R. H. und Gietz, R. D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16 (5-6) 339–346 PMID: 2692852.
- [149] Daum, G., Böhni, P. C. und Schatz, G. (1982) Import of Proteins into Mitochondria. Cytochrome *b*₂ and Cytochrome *c* Peroxidase Are Located in the Intermembrane Space of Yeast Mitochondria. *J Biol Chem* 257 (21) 13028–13033 PMID: 6290489.
- [150] Meisinger, C., Sommer, T. und Pfanner, N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Devoid of Microsomal and Cytosolic Contaminations. *Anal Biochem* 287 (2) 339–342 PMID: 11112284.

- [151] Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A. und Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010) Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* 31 (21) 3573–3579 PMID: 20967768.
- [152] Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138 (1) 141–143 PMID: 6731838.
- [153] Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. und Séraphin, B. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24 (3) 218–229 PMID: 11403571.
- [154] Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17 (10) 1030–1032 PMID: 10504710.
- [155] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259) 680–685 PMID: 5432063.
- [156] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. und Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21 (6) 1037–1053 PMID: 10786879.
- [157] Schägger, H. (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 65 231–244 PMID: 11381596.
- [158] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9 (6) 255–262 PMID: 2466658.
- [159] Czupalla, C., Nürnberg, B. und Krause, E. (2003) Analysis of class I phosphoinositide 3-kinase autophosphorylation sites by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (7) 690–696 PMID: 12661022.
- [160] Czupalla, C., Mansukoski, H., Riedl, T., Thiel, D., Krause, E. und Hoflack, B. (2006) Proteomic Analysis of Lysosomal Acid Hydrolases Secreted by Osteoclasts: Implications for Lytic Enzyme Transport and Bone Metabolism. *Mol Cell Proteomics* 5 (1) 134–143 PMID: 16215273.
- [161] Köhler, W., Schachtel, G. und Voleske, P. Biostatistik: Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2007.
- [162] Graybill, E. R., Rouhier, M. F., Kirby, C. E. und Hawes, J. W. (2007) Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 465 (1) 26–37 PMID: 17570335.
- [163] Mokranjac, D. und Neupert, W. (2009) Thirty years of protein translocation into mitochondria: Unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* 1793 (1) 33–41 PMID: 18672008.

- [164] Booher, K. R. und Kaiser, P. (2008) A PCR-based strategy to generate yeast strains expressing endogenous levels of amino-terminal epitope-tagged proteins. *Biotechnol J* 3 (4) 524–529 PMID: 18320568.
- [165] Kroneková, Z. (2005) Assembly of mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: The role of Cbp3p and Cbp4p assembly factors. Dissertation, TU Dresden, Institut für Genetik.
- [166] Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfish, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (23) 13207–13212 PMID: 14576278.
- [167] Wilkinson, J. M. Fragmentation of Polypeptides by Enzymatic Methods. In: *Practical Protein Chemistry: A Handbook*. John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1986.
- [168] Markert, Y., Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. und Arnold, U. (2003) Proline versus charge concept for protein stabilization against proteolytic attack. *Protein Eng* 16 (12) 1041–1046 PMID: 14983085.
- [169] Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I. J., Pfanner, N. und Neupert, W. (1993) The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* 74 (3) 483–492 PMID: 8348615.
- [170] Ohlmeier, S., Hiltunen, J. K. und Bergmann, U. (2010) Protein phosphorylation in mitochondria –A study on fermentative and respiratory growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* 31 (17) 2869–2881 PMID: 20715123.
- [171] Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S. und Hochstrasser, D. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14 (10) 1023–1031 PMID: 8125050.
- [172] Sun, W., Parry, S., Ubhayasekera, W., Engström, A., Dell, A. und Schedin-Weiss, S. (2010) Further insight into the roles of the glycans attached to human blood protein C inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 403 (2) 198–202 PMID: 21056543.
- [173] Schägger, H. und Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19 (8) 1777–1783 PMID: 10775262.
- [174] Claypool, S. M. (2009) Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta* 1788 (10) 2059–2068 PMID: 19422785.
- [175] Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M. T., Meisinger, C., Kassenbrock, C. K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M. G., Neupert, W., Nargang, F. E. und Pfanner, N. (2001) Biogenesis of 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 PMID: 11266446.

- [176] Blachly-Dyson, E., Peng, S., Colombini, M. und Forte, M. (1990) Selectivity Changes In Site-Directed Mutants Of The VDAC Ion Channel: Structural Implications. *Science* 247 (4947) 1233–1236 PMID: 1690454.
- [177] Forte, M., Blachly-Dyson, E. und Colombini, M. (1996) Structure and function of the yeast outer mitochondrial membrane channel, VDAC. *Soc Gen Physiol Ser* 51 145–154 PMID: 8809940.
- [178] Dihanich, M., Suda, K. und Schatz, G. (1987) A yeast mutant lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kd extramitochondrial protein. *EMBO J* 6 (3) 723–728 PMID: 2438132.
- [179] Berger, K. H. und Yaffe, M. P. (1998) Prohibitin Family Members Interact Genetically with Mitochondrial Inheritance Components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18 (7) 4043–4052 PMID: 9632789.
- [180] Zara, V., Palmisano, I., Conte, L. und Trumpower, B. L. (2004) Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc_1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b . *Eur J Biochem* 271 (6) 1209–1218 PMID: 15009199.
- [181] Tatsuta, T., Model, K. und Langer, T. (2005) Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria. *Mol Biol Cell* 16 (1) 248–259 PMID: 15525670.
- [182] Cronin, S. R., Rao, R. und Hampton, R. Y. (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca^{2+} homeostasis. *J Cell Biol* 157 (6) 1017–1028 PMID: 12058017.
- [183] Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. und Shaw, J. M. (2000) Dnm1p GTPase-Mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *J Cell Biol* 151 (2) 367–380 PMID: 11038183.
- [184] Hermann, G. J. und Shaw, J. M. (1998) Mitochondrial Dynamics In Yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14 265–303 PMID: 9891785.
- [185] Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998) Fzo1p Is a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for the Biogenesis of Functional Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273 (32) 20150–20155 PMID: 9685359.
- [186] Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002) Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13 (3) 847–853 PMID: 11907266.
- [187] McAlister, L. und Holland, M. J. (1985) Differential Expression of the Three Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Genes. *J Biol Chem* 260 (28) 15019–15027 PMID: 3905788.

- [188] Przybyla-Zawislak, B., Dennis, R. A., Zakharkin, S. O. und McCammon, M. T. (1998) Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 258 (2) 736–743 PMID: 9874242.
- [189] Crivellone, M. D. (1994) Characterization of *CBP4*, a New Gene Essential for the Expression of Ubiquinol-Cytochrome *c* Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269 (33) 21284–21292 PMID: 8063753.
- [190] Kronekova, Z. und Rödel, G. (2005) Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on *bc*₁ complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47 (4) 203–212 PMID: 15759116.
- [191] Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuet, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A. und Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* Contain One-conserved Cysteine Type Peroxiredoxin with Thioredoxin Peroxidase Activity. *J Biol Chem* 275 (21) 16296–16301 PMID: 10821871.
- [192] Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. und Entian, K. D. (1999) The mitochondrial cytochrome *c* peroxidase Ccp1 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in conveying an oxidative stress signal to the transcription factor Pos9 (Skn7). *Mol Gen Genet* 262 (3) 437–447 PMID: 10589830.
- [193] Carr-Schmid, A., Durko, N., Cavallius, J., Merrick, W. C. und Kinzy, T. G. (1999) Mutations in a GTP-binding Motif of Eukaryotic Elongation Factor 1A Reduce Both Translational Fidelity and the Requirement for Nucleotide Exchange. *J Biol Chem* 274 (42) 30297–30302 PMID: 10514524.
- [194] Cardona, F., Orozco, H., Friant, S., Aranda, A. und del Olmo, M. L. (2011) The *Saccharomyces cerevisiae* flavodoxin-like proteins Ycp4 and Rfs1 play a role in stress response and in the regulation of genes related to metabolism. *Arch Microbiol* 193 (7) 515–525 PMID: 21442317.
- [195] Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. und Toledano, M. B. (1999) Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. *J Biol Chem* 274 (23) 16040–16046 PMID: 10347154.
- [196] Braun, H. P. und Schmitz, U. K. (1995) Are the 'core' proteins of the mitochondrial *bc*₁ complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci* 20 (5) 171–175 PMID: 7610476.
- [197] Zhang, X., Lester, R. L. und Dickson, R. C. (2004) Pil1p and Lsp1p Negatively Regulate the 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-like Kinase Pkh1p and Downstream Signaling Pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* 279 (21) 22030–22038 PMID: 15016821.
- [198] Noiva, R. und Lennarz, W. J. (1992) Protein Disulfide Isomerase. A Multifunctional Protein Resident in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 267 (6) 3553–3556 PMID: 1740407.
- [199] Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z.-W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D. und Strahl, B. D. (2002) Gene silencing: *Trans*-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 418 (6897) 498 PMID: 12152067.

- [200] Camadro, J. M., Thome, F., Brouillet, N. und Labbe, P. (1994) Purification and Properties of Protoporphyrinogen Oxidase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial Location and Evidence for a Precursor Form of the Protein. *J Biol Chem* 269 (51) 32085–32091 PMID: 7798202.
- [201] Camadro, J. M. und Labbe, P. (1996) Cloning and Characterization of the Yeast *HEM14* Gene Coding for Protoporphyrinogen Oxidase, the Molecular Target of Diphenyl Ether-type Herbicides. *J Biol Chem* 271 (15) 9120–9128 PMID: 8621563.
- [202] Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfish, B., Guiard, B., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2006) Proteomic Analysis of the Yeast Mitochondrial Outer Membrane Reveals Accumulation of a Subclass of Preproteins. *Mol Biol Cell* 17 (3) 1436–1450 PMID: 16407407.
- [203] Fountoulakis, M., Berndt, P., Langen, H. und Suter, L. (2002) The rat liver mitochondrial proteins. *Electrophoresis* 23 (2) 311–328 PMID: 11840540.
- [204] Masaki, N., Kyle, M. E., Serroni, A. und Farber, J. L. (1989) Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* 270 (2) 672–680 PMID: 2705785.
- [205] Genova, M. L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. und Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505 (3) 364–368 PMID: 11576529.
- [206] Drahota, Z., Křiváková, P., Červinková, Z., Kmoníčková, E., Lotková, H., Kučera, O. und Houšťek, J. (2005) Tert-Butyl Hydroperoxide Selectively Inhibits Mitochondrial Respiratory-Chain Enzymes in Isolated Rat Hepatocytes. *Physiol Res* 54 (1) 67–72 PMID: 15717843.
- [207] Nicotera, P., McConkey, D., Svensson, S. A., Bellomo, G. und Orrenius, S. (1988) Correlation between cytosolic Ca²⁺ concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 52 (1-2) 55–63 PMID: 3188034.
- [208] Rubin, R. und Farber, J. L. (1984) Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 228 (2) 450–459 PMID: 6696441.
- [209] Kmoníčková, E., Drahota, Z., Kameníková, L., Červinková, Z., Mašek, K. und Farghali, H. (2001) Modulatory Effect Of Cyclosporin A On Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Damage In Hepatocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23 (1) 43–54 PMID: 11322648.
- [210] Marques, S. M., Peralta, F. und Esteves da Silva, J. C. G. (2009) Optimized chromatographic and bioluminescent methods for inorganic pyrophosphate based on its conversion to ATP by firefly luciferase. *Talanta* 77 (4) 1497–1503 PMID: 19084670.
- [211] Rhodes, W. C. und McElroy, W. D. (1958) The Synthesis and Function of Luciferyl-adenylate and Oxyluciferyl-adenylate. *J Biol Chem* 233 (6) 1528–1537 PMID: 13610868.

- [212] Heytler, P. G. (1979) Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Methods Enzymol* 55 462–442 PMID: 156853.
- [213] Joshi, S. und Huang, Y. G. (1991) ATP synthase complex from bovine heart mitochondria: the oligomycin sensitivity conferring protein is essential for dicyclohexyl carbodiimide-sensitive ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1067 (2) 255–258 PMID: 1831660.
- [214] Chen, Y.-C., Taylor, E. B., Dephoure, N., Heo, J.-M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N. C., Gygi, S. P. und Rutter, J. (2012) Identification of a Protein Mediating Respiratory Supercomplex Stability. *textslCell Metab* 15 (3) 348–360 PMID: 22405070.
- [215] Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H. E., Warscheid, B. und Rehling, P. (2007) Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J* 26 (20) 4347–4358 PMID: 17882259.
- [216] Reynolds, S. M., Käll, L., Riffle, M. E., Bilmes, J. A. und Noble, W. S. (2008) Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Using Dynamic Bayesian Networks. *PLoS Comput Biol* 4 (11) e1000213 PMID: 18989393.
- [217] Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem* 374 166.
- [218] Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. und Elofsson, A. (2009) TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res* 37 W465–W468 PMID: 19429891.
- [219] Rapaport, D. (2012) The Mitochondrial Protein OM45 Is Exposed to the Cytosol. *J Biol Chem* 287 (33) 27415 PMID: 22888114.
- [220] Echavarria-Heras, H., Solana-Arellano, E. und Leal-Ramirez, C. (2012) Surface aggregation patterns of LDL receptors near coated pits ii. the retrograde membrane flow-diffusion and generalized plaque-form insertion mechanism. *Math Med Biol* 29 (2) 109–130 PMID: 21036894.
- [221] Claypool, S. M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J. A. und 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) 937–950 PMID: 18779372.
- [222] Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I. und Martin, R. P. (2006) Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1757 (9-10) 1217–1228 PMID: 16962558.
- [223] Claypool, S. M., Boontheung, P., McCaffery, J. M., Loo, J. A. und Koehler, C. M. (2008) The Cardiolipin Transacylase, Tafazzin, Associates with Two Distinct Respiratory Components Providing Insight into Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* 19 (12) 5143–5155 PMID: 18799610.
- [224] Aebersold, R. und Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422 (6928) 198–207 PMID: 12634793.

- [225] Völkel, P., le Faou, P. und Angrand, P.-O. (2010) Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry. *Biochem Soc Trans* 38 (4) 883–887 PMID: 20658971.
- [226] Lithgow, T. (2000) Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett* 476 (1-2) 22–26 PMID: 10878243.
- [227] Karlberg, O., Canbäck, B., Kurland, C. G. und Andersson, S. G. (2000) The Dual Origin of the Yeast Mitochondrial Proteome. *Yeast* 17 (3) 170–187 PMID: 11025528.
- [228] Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.-H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G. S. und Snyder, M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* 16 (6) 707–719 PMID: 11914276.
- [229] Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20 (4-5) 660–663 PMID: 10344231.
- [230] Chen, Z. und Lash, L. H. (1998) Evidence for Mitochondrial Uptake of Glutathione by Dicarboxylate and 2-Oxoglutarate Carriers. *J Pharmacol Exp Ther* 285 (2) 608–618 PMID: 9580605.
- [231] Chen, Z., Putt, D. A. und Lash, L. H. (2000) Enrichment and Functional Reconstitution of Glutathione Transport Activity from Rabbit Kidney Mitochondria: Further Evidence for the Role of the Dicarboxylate and 2-Oxoglutarate Carriers in Mitochondrial Glutathione Transport. *Arch Biochem Biophys* 373 (1) 193–202 PMID: 10620338.
- [232] Pallotta, M. L., Brizio, C., Fratianni, A., de Virgilio, C., Barile, M. und Passarella, S. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria can synthesise FMN and FAD from externally added riboflavin and export them to the extramitochondrial phase. *FEBS Lett* 428 (3) 245–249 PMID: 9654142.
- [233] Eide, D. J. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* 1763 (7) 711–722 PMID: 16675045.
- [234] Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. und Deisenhofer, J. (2001) Crystal Structures of Mitochondrial Processing Peptidase Reveal the Mode for Specific Cleavage of Import Signal Sequences. *Structure* 9 (7) 615–625 PMID: 11470436.
- [235] Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T. und Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody fv fragment. *Structure* 8 (6) 669–684 PMID: 10873857.
- [236] Cooper, C. E., Nicholls, P. und Freedman, J. A. (1991) Cytochrome *c* oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochem Cell Biol* 69 (9) 586–607 PMID: 1665335.
- [237] UniProt Consortium (2012) Reorganizing the protein space at the universal protein resource (uniprot). *Nucleic Acids Res* 40 D71–D75 PMID: 22102590.

- [238] Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S. und Wong, E. D. (2012) Saccharomyces genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* 40 D700–D705 PMID: 22110037.
- [239] Fernández, E., Moreno, F. und Rodicio, R. (1992) The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 204 (3) 983–990 PMID: 1551398.
- [240] Palmieri, F., Prezioso, G., Quagliariello, E. und Klingenberg, M. (1971) Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 22 (1) 66–74 PMID: 5099217.
- [241] Palmieri, L., Vozza, A., Hönlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V. und Palmieri, F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol Microbiol* 31 (2) 569–577 PMID: 10027973.
- [242] Fernández, M., Fernández, E. und Rodicio, R. (1994) *ACR1*, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242 (6) 727–735 PMID: 7908717.
- [243] Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L. und Blom, J. (2002) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol* 4 (1) R3 PMID: 12537548.
- [244] Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S. und Schmitter, J. M. (2001) Yeast Mitochondrial Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex. *Biochemistry* 40 (33) 9758–9769 PMID: 11502169.
- [245] Hiltunen, J. K., Schonauer, M. S., Autio, K. J., Mittelmeier, T. M., Kastaniotis, A. J. und Dieckmann, C. L. (2009) Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Type II: More than Just Fatty Acids. *J Biol Chem* 284 (14) 9011–9015 PMID: 19028688.
- [246] Outten, C. E. und Culotta, V. C. (2003) A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 22 (9) 2015–2024 PMID: 12727869.
- [247] Nijtmans, L. G. J., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H. und Grivell, L. A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J* 19 (11) 2444–2451 PMID: 10835343.
- [248] Ohba, M. und Schatz, G. (1987) Protein import into yeast mitochondria is inhibited by antibodies raised against 45-kd proteins of the outer membrane. *EMBO J* 6 (7) 2109–2115 PMID: 3308450.
- [249] Piper, P. W., Jones, G. W., Bringloe, D., Harris, N., MacLean, M. und Mollapour, M. (2002) The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears

- to be due to defective mitochondrial segregation in old mother cells. *Aging Cell* 1 (2) 149–157 PMID: 12882345.
- [250] Park, J., Kim, Y., Choi, S., Koh, H., Lee, S.-H., Kim, J.-M. und Chung, J. (2010) *Drosophila* Porin/VDAC Affects Mitochondrial Morphology. *PLoS One* 5 (10) e13151 PMID: 20949033.
- [251] Rostovtseva, T. K. und Bezrukov, S. M. (2012) VDAC inhibition by tubulin and its physiological implications. *Biochim Biophys Acta* 1818 (6) 1526–1535 PMID: 22100746.
- [252] Sheldon, K. L., Maldonado, E. N., Lemasters, J. J., Rostovtseva, T. K. und Bezrukov, S. M. (2011) Phosphorylation of Voltage-Dependent Anion Channel by Serine/Threonine Kinases Governs Its Interaction with Tubulin. *PLoS One* 6 (10) e25539 PMID: 22022409.
- [253] Solovyov, A. und Gilbert, H. F. (2004) Zinc-dependent dimerization of the folding catalyst, protein disulfide isomerase. *Protein Sci* 13 (7) 1902–1907 PMID: 15169950.
- [254] Burke, M. A. und Ardehali, H. (2007) Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. *Transl Res* 150 (2) 73–80 PMID: 17656326.
- [255] Lill, R. und Kispal, G. (2001) Mitochondrial ABC transporters. *Res Microbiol* 152 (3-4) 331–340 PMID: 11421280.
- [256] Kurganov, B. I., Sugrobova, N. P. und Mil'man, L. S. (1985) Supramolecular organization of glycolytic enzymes. *J Theor Biol* 116 (4) 509–526 PMID: 2999516.
- [257] Brooks, S. P. und Storey, K. B. (1991) The effect of enzyme-enzyme complexes on the overall glycolytic rate in vivo. *Biochem Int* 25 (3) 477–489 PMID: 1805792.
- [258] Vélot, C., Mixon, M. B., Teige, M. und Srere, P. A. (1997) Model of a Quinary Structure between Krebs TCA Cycle Enzymes: A model for the Metabolon. *Biochemistry* 36 (47) 14271–14276 PMID: 9400365.
- [259] Lenaz, G. und Genova, M. L. (2012) Supramolecular Organisation of the Mitochondrial Respiratory Chain: A New Challenge for the Mechanism and Control of Oxidative Phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 748 107–144 PMID: 22729856.
- [260] Kmita, H. und Budzińska, M. (2000) Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. *Biochim Biophys Acta* 1509 (1-2) 86–94 PMID: 11118520.
- [261] Marth, J. D. und Grewal, P. K. (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8 (11) 874–887 PMID: 18846099.
- [262] Burnham-Marusich, A. R. und Berninsone, P. M. (2012) Multiple proteins with essential mitochondrial functions have glycosylated isoforms. *Mitochondrion* 12 (4) 423–427 PMID: 22564751.
- [263] Ben-Menachem, R., Tal, M., Shadur, T. und Pines, O. (2011) A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: A question of evolution. *Proteomics* 11 (23) 4468–4476 PMID: 21910249.

- [264] Yogev, O., Yogev, O., Singer, E., Shaulian, E., Goldberg, M., Fox, T. D. und Pines, O. (2010) Fumarase: A Mitochondrial Metabolic Enzyme and a Cytosolic/Nuclear Component of the DNA Damage Response. *PLoS Biol* 8 (3) e1000328 PMID: 20231875.
- [265] Schmidt, C., Lepsverdize, E., Chi, S. L., Das, A. M., Pizzo, S. V., Dityatev, A. und Schachner, M. (2008) Amyloid precursor protein and amyloid β -peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Mol Psychiatry* 13 (10) 953–969 PMID: 17726461.
- [266] Love, D. C., Kochan, J., Cathey, R. L., Shin, S.-H. und Hanover, J. A. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci* 116 (Pt 4) 647–654 PMID: 12538765.
- [267] Jones, S. P., Zachara, N. E., Ngoh, G. A., Hill, B. G., Teshima, Y., Bhatnagar, A., Hart, G. W. und Marbán, E. (2008) Cardioprotection by N-Acetylglucosamine Linkage to Cellular Proteins. *Circulation* 117 (9) 1172–1182 PMID: 18285568.
- [268] Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B. T., Trauger, S. A., Han, W., Hu, Y., Oyeleye, M. O. und Dillmann, W. H. (2009) Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose. *J Biol Chem* 284 (1) 547–555 PMID: 19004814.
- [269] Gupta, R. und Brunak, S. (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput* 310–322 PMID: 11928486.
- [270] Wang, J., Torii, M., Liu, H., Hart, G. W. und Hu, Z.-Z. (2011) dbOGAP - An Integrated Bioinformatics Resource for Protein O-GlcNAcylation. *BMC Bioinformatics* 12 91 PMID: 21466708.
- [271] Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. und Lagerlof, O. (2011) Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu Rev Biochem* 80 825–858 PMID: 21391816.
- [272] Blom, N., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294 (5) 1351–1362 PMID: 10600390.
- [273] Krause-Buchholz, U., Becker, S., Zoriy, M., Pickhardt, C., Przybylski, M., Rödel, G. und Becker, J. (2006a) Detection of phosphorylated subunits by combined LA-ICP-MS and MALDI-FTICR-MS analysis in yeast mitochondrial membrane complexes separated by blue native/SDS-PAGE. *Int J Mass Spectrometry* 248 56–60.
- [274] Ahmadzadeh, M., Horng, A. und Colombini, M. (1996) The control of mitochondrial respiration in yeast: A possible role of the outer mitochondrial membrane. *Cell Biochem Funct* 14 (3) 201–208 PMID: 8888574.
- [275] Feng, J., Lucchinetti, E., Enkavi, G., Wang, Y., Gehrig, P., Roschitzki, B., Schaub, M. C., Tajkhorshid, E., Zaugg, K. und Zaugg, M. (2010) Tyrosine phosphorylation

- by Src within the cavity of the adenine nucleotide translocase 1 regulates ADP/ATP exchange in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 298 (3) C740–C748 PMID: 20007455.
- [276] Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2007) Profiling Phosphoproteins of Yeast Mitochondria Reveals a Role of Phosphorylation in Assembly of the ATP Synthase. *Mol Cell Proteomics* 6 (11) 1896–1906 PMID: 17761666.
- [277] Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J. und Zhou, H. (2008) A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol Cell Proteomics* 7 (7) 1389–1396 PMID: 18407956.
- [278] Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L. Y., Coon, J. J., Syka, J. E. P., Bai, D. L., Shabanowitz, J., Burke, D. J., Troyanskaya, O. G. und Hunt, D. F. (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (7) 2193–2198 PMID: 17287358.
- [279] Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R. und Gavish, M. (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27 (8) 402–409 PMID: 16822554.
- [280] Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G. und Weizman, A. (1999) Enigma of the Peripheral Benzodiazepine Receptor. *Pharmacol Rev* 51 (4) 629–650 PMID: 10581326.
- [281] Joseph-Liauzun, E., Delmas, P., Shire, D. und Ferrara, P. (1998) Topological Analysis of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in Yeast Mitochondrial Membranes Supports a Five-transmembrane Structure. *J Biol Chem* 273 (4) 2146–2152 PMID: 9442055.
- [282] Kinnally, K. W., Zorov, D. B., Antonenko, Y. N., Snyder, S. H., McEnery, M. W. und Tedeschi, H. (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (4) 1374–1378 PMID: 7679505.
- [283] Culty, M., Li, H., Boujrad, N., Amri, H., Vidic, B., Bernassau, J. M., Reversat, J. L. und Papadopoulos, V. (1999) In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 (1-6) 123–130 PMID: 10418986.
- [284] Lacapère, J. J. und Papadopoulos, V. (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68 (7-8) 569–585 PMID: 12957662.
- [285] McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifletti, R. R. und Snyder, S. H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (8) 3170–3174 PMID: 1373486.

- [286] Delavoie, F., Li, H., Hardwick, M., Robert, J.-C., Giatzakis, C., Péranzi, G., Yao, Z.-X., Maccario, J., Lacapère, J.-J. und Papadopoulos, V. (2003) *In Vivo* and *in Vitro* Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Polymerization: Functional Significance in Drug Ligand and Cholesterol Binding. *Biochemistry* 42 (15) 4506–4519 PMID: 12693947.
- [287] Ostuni, M. A., Péranzi, G., Ducroc, R. A., Fasseu, M., Vidic, B., Dumont, J., Papadopoulos, V. und Lacapère, J.-J. (2009) Distribution, pharmacological characterization and function of the 18 kDa translocator protein in rat small intestine. *Biol Cell* 101 (10) 573–586 PMID: 19392661.
- [288] Wendler, G., Lindemann, P., Lacapère, J.-J. und Papadopoulos, V. (2003) Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. *Biochem Biophys Res Commun* 311 (4) 847–852 PMID: 14623258.
- [289] Kottke, M., Wallimann, T. und Brdiczka, D. (1994) Dual electron microscopic localization of mitochondrial creatine kinase in brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 51 (2) 105–117 PMID: 8043295.
- [290] Saks, V. A., Kuznetsov, A. V., Khuchua, Z. A., Vasilyeva, E. V., Belikova, J. O., Kesvatera, T. und Tiivel, T. (1995) Control of cellular respiration *in vivo* by mitochondrial outer membrane and by Creatine Kinase. a new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol* 27 (1) 625–645 PMID: 7760382.
- [291] Gellerich, F. N., Khuchua, Z. A. und Kuznetsov, A. V. (1993) Influence of the mitochondrial outer membrane and the binding of creatine kinase to the mitochondrial inner membrane on the compartmentation of adenine nucleotides in the intermembrane space of rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1140 (3) 327–334 PMID: 8417781.
- [292] Brdiczka, D. (1994) Function of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1187 (2) 264–269 PMID: 8075120.
- [293] O’Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A. P., Brdiczka, D. und Wallimann, T. (1997) The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414 (2) 253–257 PMID: 9315696.
- [294] Dolder, M., Wendt, S. und Wallimann, T. (2001) Mitochondrial Creatine Kinase in Contact Sites: Interaction with Porin and Adenine Nucleotide Translocase, Role in Permeability Transition and Sensitivity to Oxidative Damage. *Biol Signals Recept* 10 (1-2) 93–111 PMID: 11223643.
- [295] Kay, L., Nicolay, K., Wieringa, B., Saks, V. und Wallimann, T. (2000) Direct Evidence for the Control of Mitochondrial Respiration by Mitochondrial Creatine Kinase in Oxidative Muscle Cells *in Situ*. *J Biol Chem* 275 (10) 6937–6944 PMID: 10702255.
- [296] Saks, V. A., Ventura-Clapier, R. und Aliev, M. K. (1996) Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1274 (3) 81–88 PMID: 8664307.

- [297] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17) 3389–3402 PMID: 9254694.
- [298] Zalman, L. S., Nikaido, H. und Kagawa, Y. (1980) Mitochondrial Outer Membrane Contains a Protein Producing Nonspecific Diffusion Channels. *J Biol Chem* 255 (5) 1771–1774 PMID: 7354054.
- [299] Chiantia, S., Ries, J. und Schwille, P. (2009) Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation. *Biochim Biophys Acta* 1788 (1) 225–233 PMID: 18801332.
- [300] Perevoshchikova, I. V., Zorov, S. D., Kotova, E. A., Zorov, D. B. und Antonenko, Y. N. (2010) Hexokinase inhibits flux of fluorescently labeled ATP through mitochondrial outer membrane porin. *FEBS Lett* 584 (11) 2397–2402 PMID: 20412805.
- [301] Perevoshchikova, I. V., Zorov, D. B. und Antonenko, Y. N. (2008) Peak intensity analysis as a method for estimation of fluorescent probe binding to artificial and natural nanoparticles: Tetramethylrhodamine uptake by isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1778 (10) 2182–2190 PMID: 18492484.
- [302] Stein, C. A. und Colombini, M. (2008) Specific VDAC inhibitors: phosphorothioate oligonucleotides. *J Bioenerg Biomembr* 40 (3) 157–162 PMID: 18654842.

Datenbanken und Prognoseprogramme

Im Zeitraum von Juni 2006 bis November 2012 wurden folgende Datenbanken bzw. Prognoseprogramme für verwendet:

CBS (*Center For Biological Sequence Analysis*)

NetPhos [272]

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

YinOYang [269]

<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>

CBSB (*Cancer Bioinformatics and Systems Biology*)

OGlcNAcScan [270]

<http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/OGAP.html>

EUROSCARF (*EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis*)

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

ExpASy (*SIB Bioinformatics Resource Portal*)

Compute pI/MW [171]

http://web.expasy.org/compute_pi/

PROSITE *Database of protein domains, families and functional sites.* [133]

<http://prosite.expasy.org/>

Swiss-Prot / UniProt [237]

<http://www.uniprot.org/>

TMpred *Prediction of Transmembrane Regions and Orientation.* [217]

http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool.* [297]

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

MEDLINE (PubMed) *US National Library of Medicine National Institutes of Health.*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

SGD (*Saccharomyces Genome Database*)

[238]

<http://www.yeastgenome.org/>

TOPCONS (*Consensus prediction of membrane protein topology*)

[218]

<http://topcons.cbr.su.se/>

YRC (*Yeast Resource Center Informatics Platform*)

Philius Transmembrane Prediction [216]

<http://www.yeastrc.org/philius/>

Anhang A

Proteinsequenzen

```
1  MSPPVYSDIS RNINDLLNKD FYHATPAAFD VQTTANGIK FSLKAKQPVK
51  DGPISTNVEA KLNDKQTGLG LTQGSNTNN LQTKLEFANL TEGLKNELIT
101 SIIPGVAKSA VLNTTFTQPF FTARGAFDLC LKSPTFVGDL TMAHEGIVGG
151 AEEGYDISAG SISRYAMALS YFAKDYSLGA TLNNEQITTV DFFQNVNAFL
201 QVGAKATMNC KLPNSNVNIE FATRYLEDAS SQVKAKVSDS GIVTLAYKQL
251 LREGVTLGVG SSFDALKLSE PVHKLGWSLS FDA*
```

Abbildung A.1: Proteinsequenz von Por1p

Die Aminosäuresequenz von Por1p ist im Einbuchstabencode angegeben. Die blaue Box stellt die α -Helix (Aminosäuren 1-23), grüne Boxen die 12 β -Faltblätter dar. Die orangefarbenen Ps deuten die nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen an den Positionen S2, T103, S109 und T117 sowie die putative an S238 an. Grüne Gs weisen auf die putativen Glykosylierungsstellen T34 und S238 hin. Magentafarben hervorgehoben sind die Cysteinreste.

```

1  MSATAKHDSN ASPNSDSEDG HHHNNKKECA IEYLKARLNS ASAVACGYLQ
51  AFVSKTQDFA KVCFLLELQNP VVIVNLLIHS SVVCYLCNGY ANHNARFLKG
101 KPNSTVLATT AGALGLLTID GIISKKYYSR YDKK*

```

Abbildung A.2: Proteinsequenz von Om14p

Die Aminosäuresequenz von Om14p ist im Einbuchstabencode angegeben. Die blauen Boxen veranschaulichen die drei TMDs (Aminosäuren 38-54, 71-90 und 104-119). Die orangefarbenen Ps deuten die nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen an den Positionen S12 und S15 an. Rot hervorgehoben sind die Cysteinreste der Aminosäuredomäne CxxC sowie die weiteren drei vorhandenen Cysteinreste. Magentafarben sind die konservierten Aminosäurereste des Cu_B-Konsensusbindemotiv von Cox1p, welches in inverser Orientierung in Om14p vorkommt, dargestellt. Eine Kupferbindung erfolgt bei diesem Motiv über die hervorgehobenen Histidinreste. Die Ellipse markiert die putative Ligandenbindestelle Hx₄Cx₂C. Die Darstellung wurde in Anlehnung an Abb. 1-3 B von Mäbert (2011) [134] generiert.

```

1  MSSRIIVGSA ALAAAITASI MVREQKAKGQ RREGNVSAYY NGQEYGSAP
51  PQLGKLNHNK QGIKEDALSL KDALLGVSQK AREEAPKVTK RVISPEEDAQ
101 TRKQLGQKAK DSSQSIFNW GFSEAERRKA IAIGEFDTAK KRFEAEVDRN
151 EKELLSTVMR EKKAALDRAS IEYERYGRAR DFNELSDKLD QQERNSNPLK
201 RLLKNNTGDA NTEEEAARSV QGWGDTAQEF GREELEEAQR NASSEPSEAQ
251 KRLDELKNIK EKGWFGYNKG EQSEQQIAER VARGLEGWGE TAAQLSKDEM
301 DDLRWNYENS KKQLDKNVSD AMDSLSKAKE DLKQYGSHHW SGWTSKVDND
351 KQALKDEAQR KYDEALKKYD EAKNKFKEWN DKGDKGFWSS KKD*

```

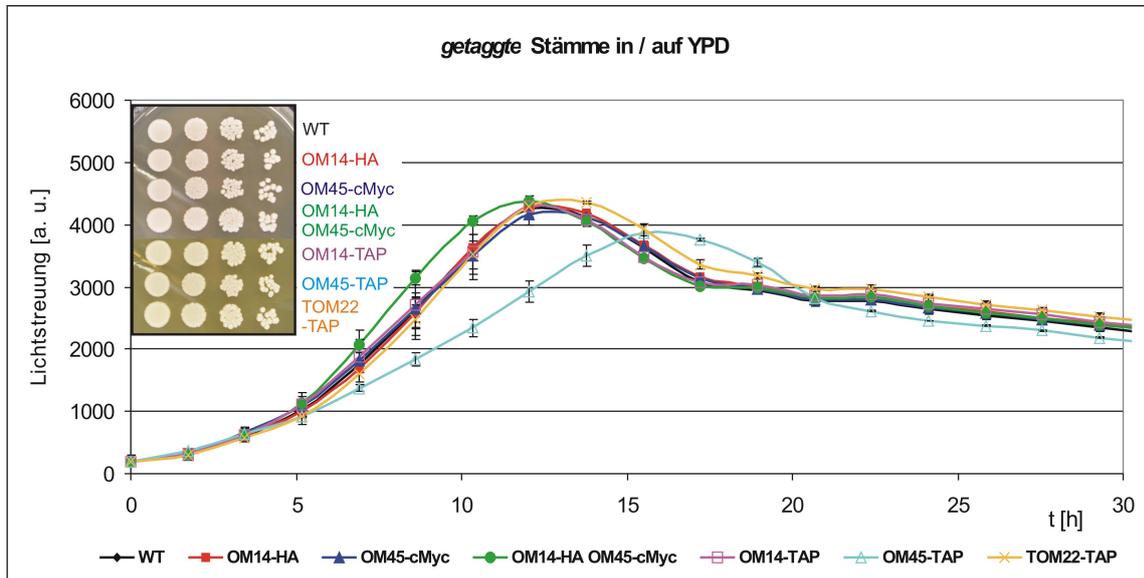
Abbildung A.3: Proteinsequenz von Om45p

Die Aminosäuresequenz von Om45p ist im Einbuchstabencode angegeben. Die blaue Box verweist auf die TMD (Aminosäuren 5-22). Die orangefarbenen Ps deuten die putativen Phosphorylierungsstellen an den Positionen S112 und S243 sowie die nachgewiesenen Positionen von Phosphorylierungen an S170 und T207 an. S112 könnte ebenfalls eine Glykosylierungsstelle (G) sein.

Anhang B

Wachstumsanalysen

A



B

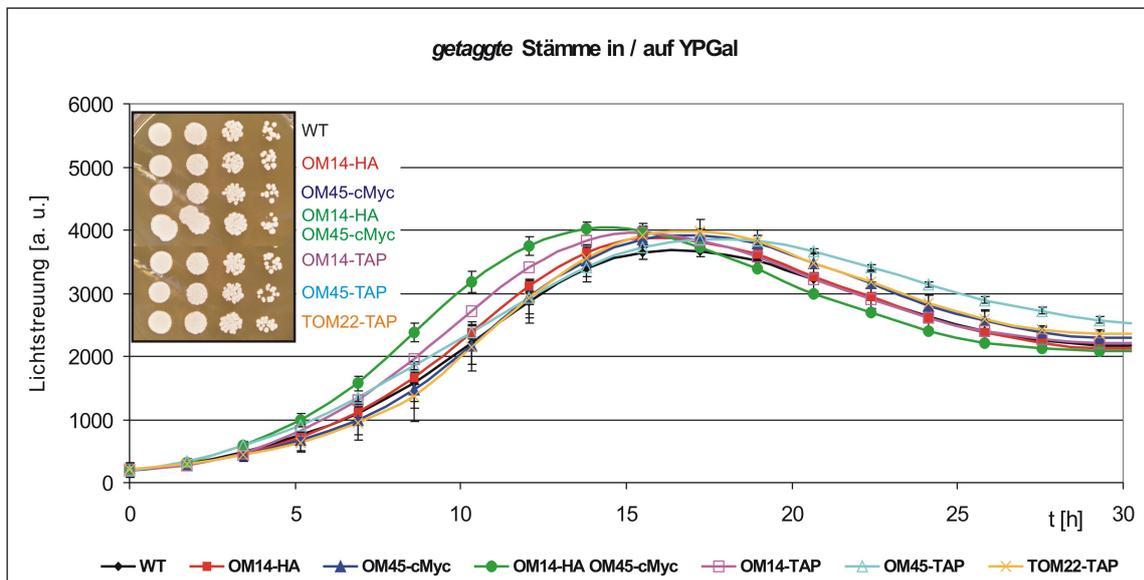
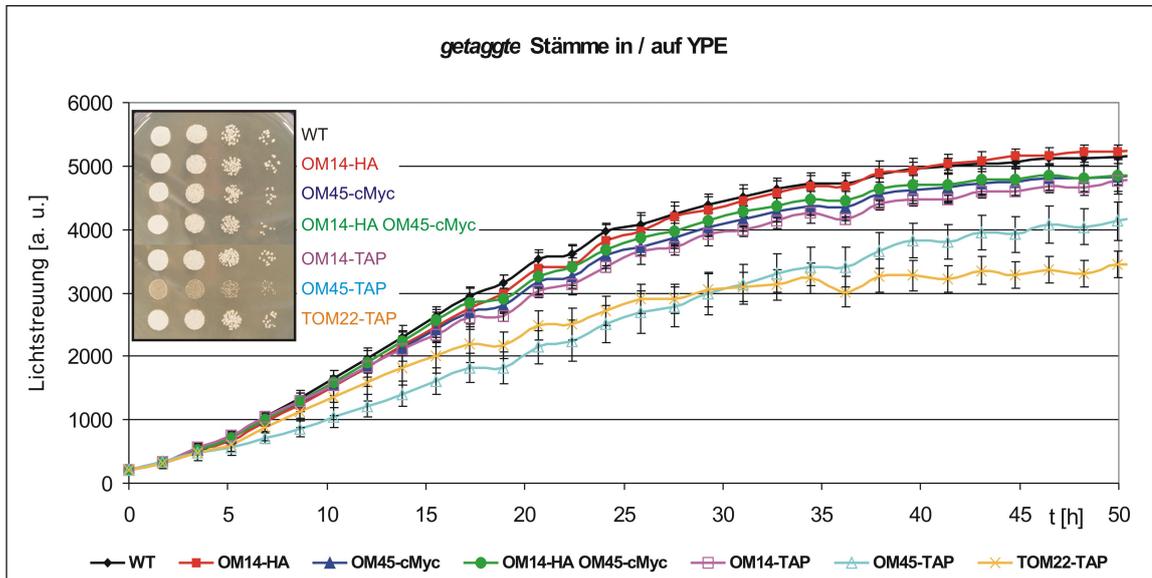


Abbildung B.1: Wachstumsverhalten der *getaggt*en Stämme mit fermentierbaren Medien

Das Wachstum der generierten Hefestämme *OM14-HA*, *OM45-cMyc*, *OM14-HA OM45-cMyc*, *OM14-TAP*, *OM45-TAP* und *TOM22-TAP* sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium (10^4 - 10^1 Zellen, nach 2 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 30 Stunden) mit den fermentierbaren C-Quellen Glukose (A) und Galaktose (B) bei 30 °C ist dargestellt.

A



B

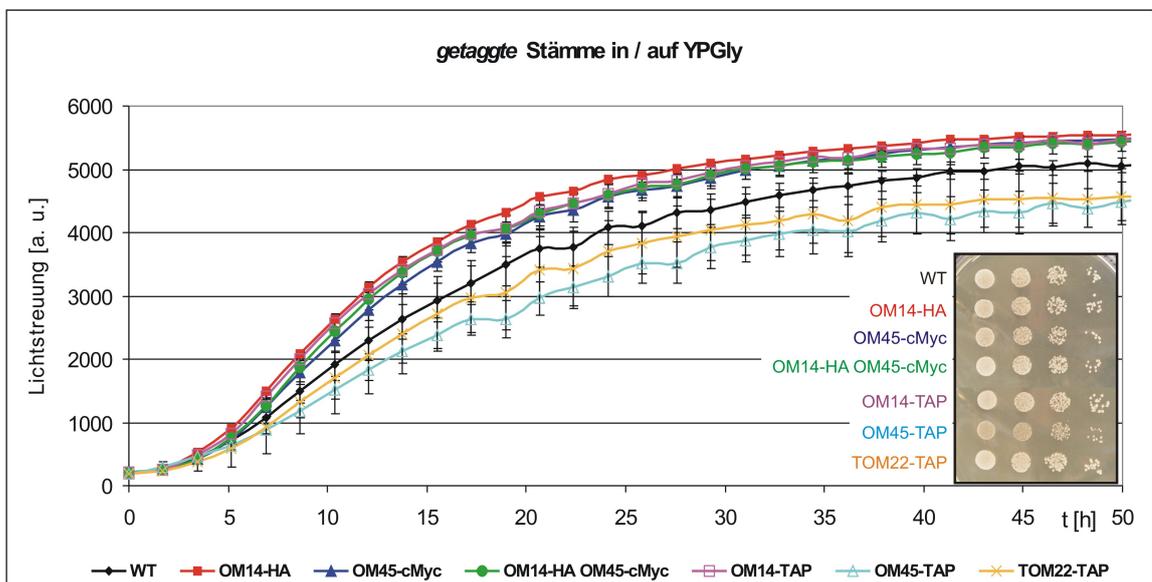
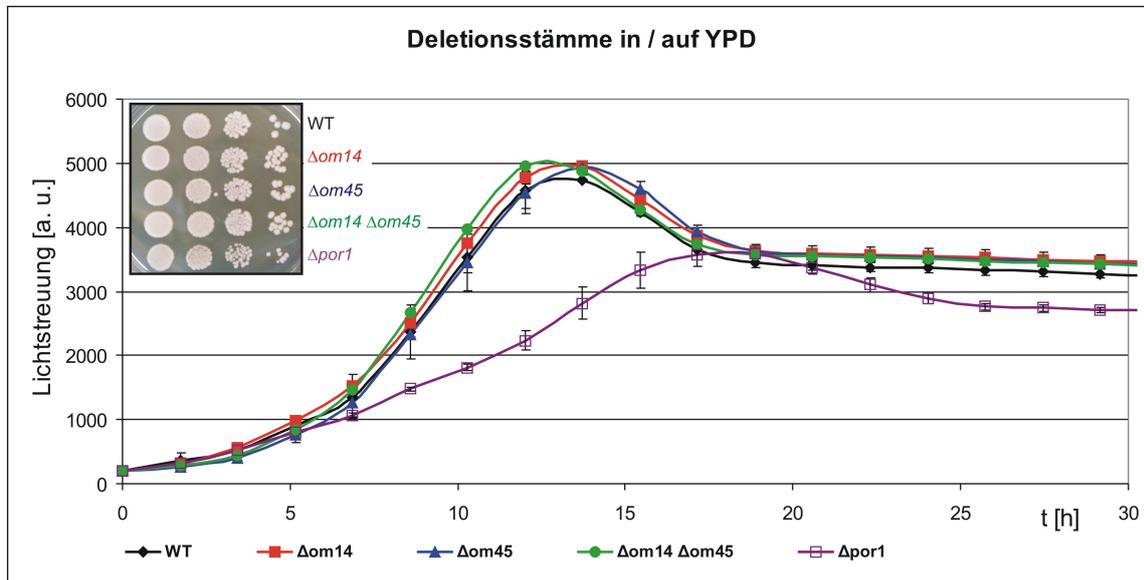


Abbildung B.2: Wachstumsverhalten der *getaggt*en Stämme mit nicht-fermentierbaren Medien

Die Darstellung zeigt das Wachstum der generierten Hefestämme *OM14-HA*, *OM45-cMyc*, *OM14-HA OM45-cMyc*, *OM14-TAP*, *OM45-TAP* und *TOM22-TAP* sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium (10^4 - 10^1 Zellen, nach 3 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 50 Stunden) mit den nicht-fermentierbaren C-Quellen Ethanol (A) und Glycerin (B) bei 30 °C.

A



B

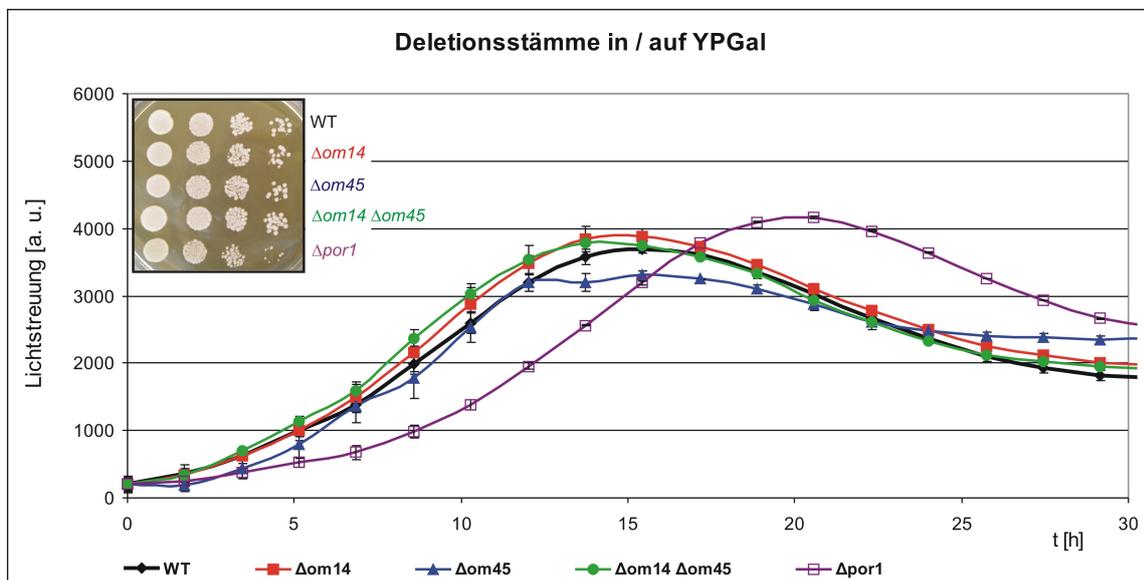
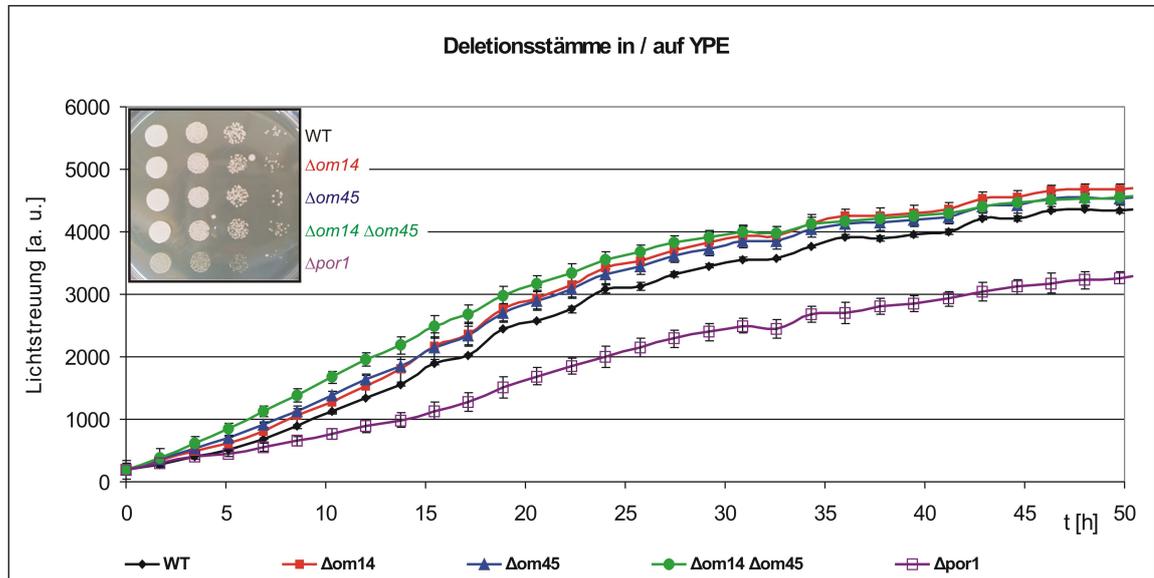


Abbildung B.3: Wachstumsverhalten der Deletionsstämme mit fermentierbaren Medien

Das Wachstum der Deletionsstämme $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ und $\Delta por1$ sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium ($10^4 - 10^1$ Zellen, nach 2 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 30 Stunden) bei 30 °C mit den fermentierbaren C-Quellen Glukose (A) und Galaktose (B) ist dargestellt.

A



B

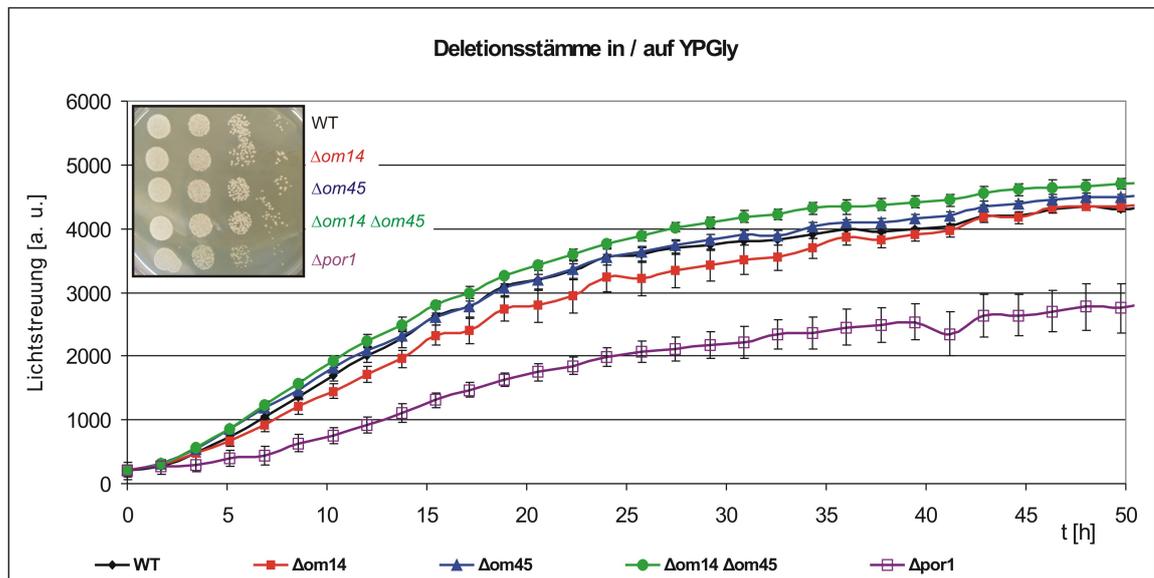
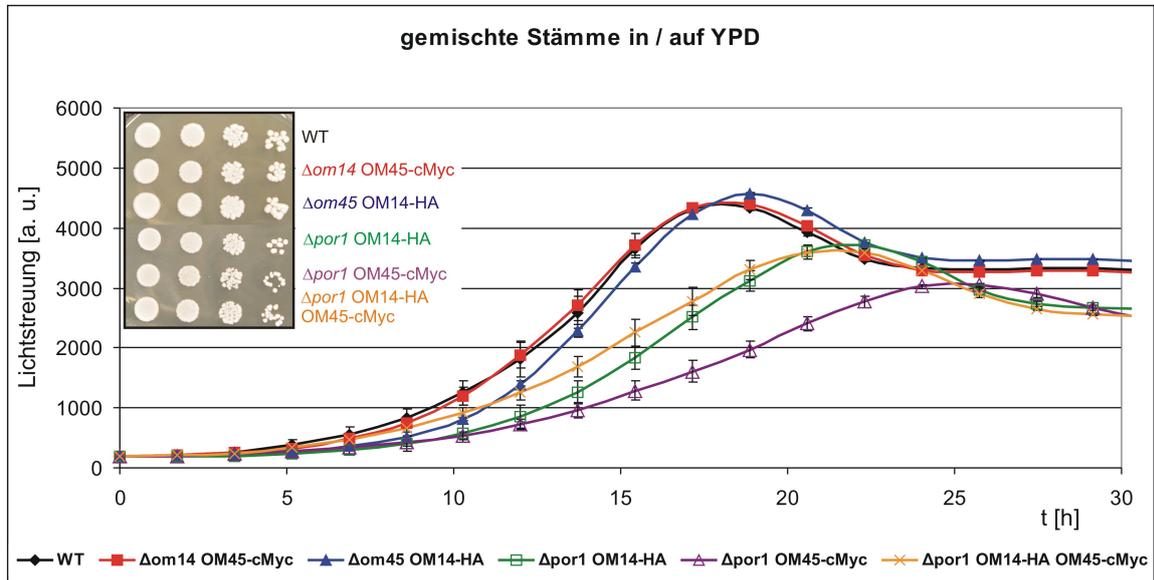


Abbildung B.4: Wachstumsverhalten der Deletionsstämme mit nicht-fermentierbaren Medien

Die Abbildung zeigt das Wachstum der Deletionsstämme $\Delta om14$, $\Delta om45$, $\Delta om14 \Delta om45$ und $\Delta por1$ sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium (10^4 - 10^1 Zellen, nach 3 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 50 Stunden) mit den nicht-fermentierbaren C-Quellen Ethanol (A) und Glycerin (B) bei 30 °C.

A



B

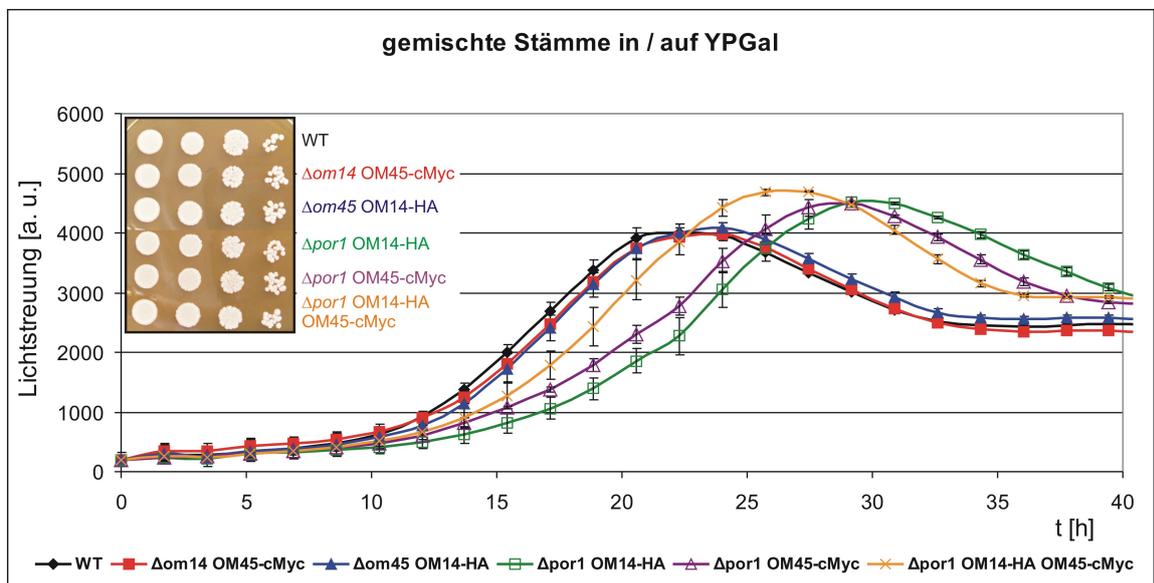
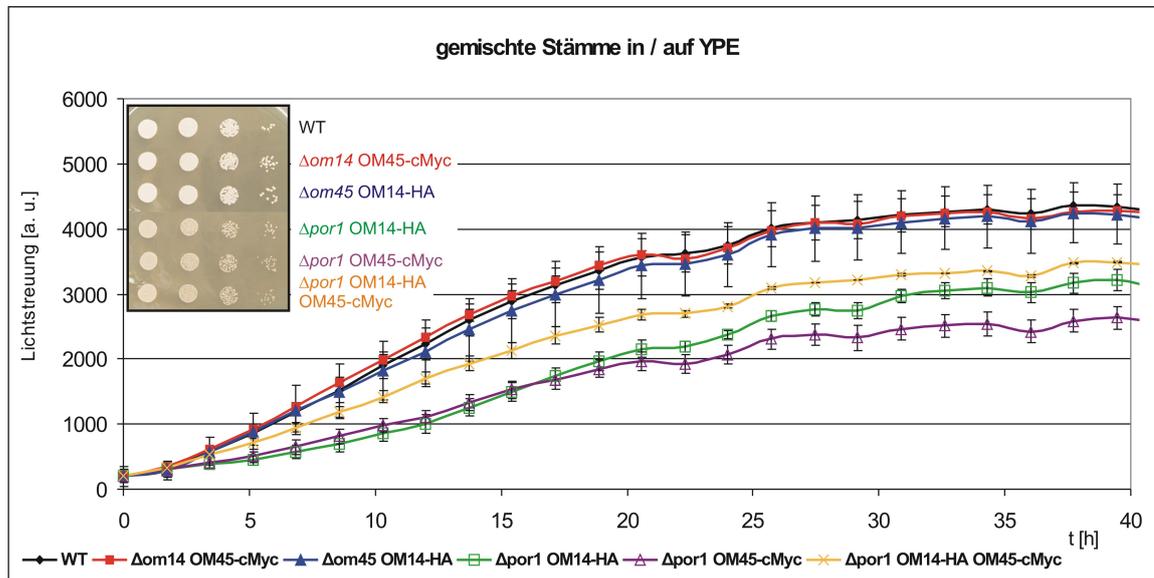


Abbildung B.5: Wachstumsverhalten der gemischten Stämme mit fermentierbaren Medien

Der Abbildung kann das Wachstum der Stämme $\Delta om14$ OM45-cMyc, $\Delta om45$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM45-cMyc und $\Delta por1$ OM14-HA OM45-cMyc sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium (10^4 - 10^1 Zellen, nach 2 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 30 - 40 Stunden) mit den fermentierbaren C-Quellen Glukose (A) und Galaktose (B) bei 30 °C entnommen werden.

A



B

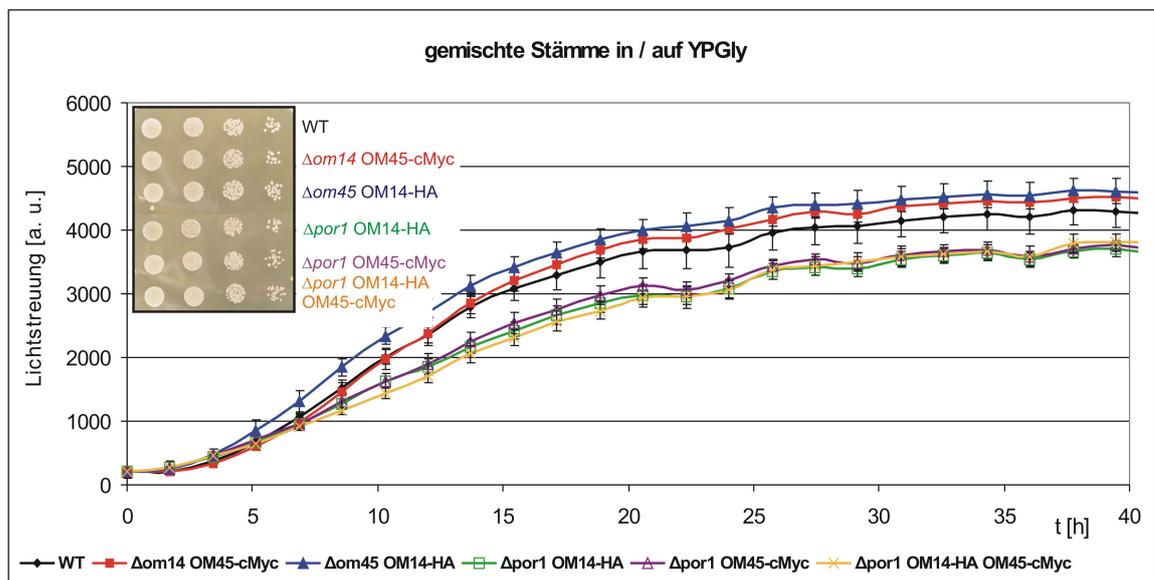


Abbildung B.6: Wachstumsverhalten der gemischten Stämme mit nicht-fermentierbaren Medien

Das Wachstum der Stämme $\Delta om14$ OM45-cMyc, $\Delta om45$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM14-HA, $\Delta por1$ OM45-cMyc und $\Delta por1$ OM14-HA OM45-cMyc sowie des Wildtypstamms (WT) auf Festmedium (10^4 - 10^1 Zellen, nach 3 Tagen Inkubation) sowie in Flüssigkultur (Verlauf über 40 Stunden) bei 30 °C mit den nicht-fermentierbaren C-Quellen Ethanol (A) und Glycerin (B) ist dargestellt.

Anhang C

Daten Massenspektrometrie

Tabelle C.1: Massenspektrometriedaten der zweidimensionalen Glykosylierungsstudie (siehe Abb. 3.9)

MALDI-TOF Analysen: signifikanter ($p < 0,05$) PMF-Wert: > 51 ; Proteine wurden mit der SwissProt- (Version 2012-07; 7.796 *S. cerevisiae* Sequenzen) und NCBI- (Version 20120811; 45.023 *S. cerevisiae* Sequenzen) Datenbank identifiziert

<i>Spot</i>	Protein-ID	Protein-name	Protein-funktion	PMF	passende Peptide	Sequenz-abdeck. [%]	MW [kDa]	pI
1	gi:68846657	Por1	Porinpore der OM	157	20/53	87	30,5	7,70
2	gi:129732	Pdi1p	Protein Disulfid-isomerase	108	17/48	39	58,5	4,38

Tabelle C.2: Massenspektrometriedaten der TAP-Analyse von OM14-TAP

Proteinbanden des preparativen TAP-Gels (siehe Abb. 3.15) wurden mit MS analysiert. MALDI-TOF/TOF Analysen: signifikanter ($p < 0,05$) PMF-Wert: > 59 , Proteine wurden mit der NCBI- (Version 20101126; 26.335 *S. cerevisiae* Sequenzen) und SwissProt- (Version 2010-11; 7.179 *S. cerevisiae* Sequenzen) Datenbank identifiziert; nano-LC-MS/MS Analysen: 1% FDR und mindestens zwei einzigartige Peptide nachweisbar; Proteine wurden mit der NCBI- (Version 20110312; 39.935 *S. cerevisiae* Sequenzen) und SwissProt- (Version 2011-02; 6.583 *S. cerevisiae* Sequenzen) Datenbank identifiziert; CBP: Calmodulinbindendepeptid, RC: Atmungskettenkomplex

MALDI-TOF/TOF		Proteinname		Proteinfunktion bzw. Untereinheit von	PMF	passende Peptide	Sequenzabdeckung [%]	MW [kDa]
Proteinbande	Protein-ID							
3	gi:119389904	Atp1p		RC V	93	12/25	26	55
4/1	gi:9857753	rekombinantes IgG1, schwere Kette		Bindung von Protein A des TAP-tags	74	13/68	37	37
5	gi:6322581	Atp2p		RC V	82	13/29	22	55
6	gi:6319426	Cor1p		RC III	71	10/27	24	50
7	gi:6322055	Om45p		unbekannt	138	22/32	37	45
8	gi:6325449	Qcr2p		RC III	89	10/22	23	41
10	gi:6319441	Aae2p		ATP/ADP-Transporter	69	7/14	16	35
11	gi:6324273	Por1p		Porinpore der OM	68	5/37	27	31
12/II	gi:130381779	IgG1 Fab, leichte Kette, variable Region		Bindung von Protein A des TAP-tags	115	13/61	57	24
13	gi:38049153	CBP		Teil des TAP-tags	106	5/25	39	22
16/III	gi:360745	Aprotinin Analog		Trypsininhibitor	217	9/32	87	7

[Fortsetzung auf der folgenden Seite]

Tabelle C.2: [Fortsetzung]

nano-LC-MS/MS		Protein-		Protein-		Proteinfunktion bzw.		MS/MS		Sequenzab-		MW	
bande	ID	name	name	Untereinheit von	Untereinheit von	Spektren-	zähler	einzigartige	Sequenzab-	deckung	Peptide	deckung	[kDa]
										[%]		[%]	
1	gi:602398	Sfp1p	Sfp1p	ATPase, Ca ²⁺ -Homöostase	ATPase, Ca ²⁺ -Homöostase	16	16	6	5	5	6	5	135
2	gi:732163	Nde1p	Nde1p	RC I	RC I	25	25	5	8	8	5	8	63
9	gi:1168314	Sfc1p	Sfc1p	Succinat/Fumarat-Transporter	Succinat/Fumarat-Transporter	12	12	3	12	12	3	12	35
9	gi:115502436	Phb2p	Phb2p	Prohibitinkomplex	Prohibitinkomplex	5	5	2	6	6	2	6	34
10	gi:584738	Aac2p	Aac2p	ATP/ADP-Transporter	ATP/ADP-Transporter	123	123	16	52	52	16	52	34
10	gi:584817	Atp3p	Atp3p	RC V	RC V	12	12	6	23	23	6	23	34
10	gi:117766	Cyt1p	Cyt1p	RC III	RC III	3	3	2	9	9	2	9	34
10	gi:2497200	Yhm2p	Yhm2p	Citrat/Oxoglutarat-Transporter	Citrat/Oxoglutarat-Transporter	4	4	2	7	7	2	7	34
10	gi:127277	Mir1p	Mir1p	P _i -Transporter	P _i -Transporter	3	3	2	7	7	2	7	33
10	gi:2500359	Rpl13ap	Rpl13ap	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	2	2	2	11	11	2	11	23
13	gi:399076	Atp7p	Atp7p	RC V	RC V	3	3	2	8	8	2	8	20
13	gi:19170975	Rpl20ap	Rpl20ap	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	3	3	2	14	14	2	14	20
13	gi:400988	Rpl21ap	Rpl21ap	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	ribosomales Protein der 60S Untereinheit	5	5	3	17	17	3	17	18
13	gi:171704590	Om14p	Om14p	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>	18	18	5	44	44	5	44	15
15	gi:46397814	Rps4ap	Rps4ap	ribosomales Protein der 40S Untereinheit	ribosomales Protein der 40S Untereinheit	2	2	2	15	15	2	15	14

Tabelle C.3: Massenspektrometriedaten der 2D DIGE-Analysen

Proteinpunkte der 2D DIGE-Gele mit mindestens zweifacher Veränderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp (Vgl. Abb. 3.18 und Tab. 3.1) wurden mit MALDI-TOF/TOF MS analysiert. Signifikanter ($p < 0,05$) PMF-Wert: > 59 ; */****: 1 bzw. 4 Peptidsequenzen durch MS/MS Analysen ($p < 0,05$) verifiziert; Proteine mit der NCBI- (Version 20101126; 26.335 *S. cerevisiae* Sequenzen) und SwissProt- (Version 2010-11; 7.179 *S. cerevisiae* Sequenzen) Datenbank identifiziert; Δ , Änderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp ($n \geq 2$)

Protein-spot	Protein-ID	Proteinname	PMF	passende Peptide	Sequenzabdeckung [%]	MW [kDa]	pI	Δ
$\Delta om14$								
1	gi:6322409	Tdh1p	154	17/42	42	36	5,52	-4,3
2	gi:6321613	Cbp4p	69	13/64	65	20	9,43	-3,2
3	gi:6324716	Lsc1p	153	15/35	50	35	8,59	-3,1
13	gi:6319707	Om14p	72, ****	8/60	41	15	8,97	-2,7
13	gi:6322918	Pam17p	*	4/60	27	22	9,70	-2,7
4	gi:6322055	Om45p-1	267	39/73	72	45	8,55	-2,2
8	gi:6322055	Om45p-2	307	46/88	71	45	8,55	-2,2
12	gi:6325253	Lsp1p	150	18/43	39	38	7,67	-2,2
6	gi:6322055	Om45p-3	272	42/73	69	45	8,55	-2,1
5	gi:6322055	Om45p-4	177	31/76	54	45	8,55	-2,0
$\Delta om45$								
14	gi:6319407	Pxl1p	106	13/35	34	30	8,97	+2,3
4	gi:6322055	Om45p-1	267	39/73	72	45	8,55	-24,6
5	gi:6322055	Om45p-4	177	31/76	54	45	8,55	-10,1
8	gi:6322055	Om45p-2	307	46/88	71	45	8,55	-6,6
6	gi:6322055	Om45p-3	272	42/73	69	45	8,55	-6,4
15	gi:6322919	Ccp1p-2	144	14/28	33	40	5,95	-5,8
7	gi:6319594	Tef2p	165	24/57	52	50	9,14	-4,8
9	gi:6322919	Ccp1p-1	116	15/30	35	40	5,95	-4,1

Tabelle C.3: [Fortsetzung]

Protein- spot	Protein- ID	Proteinname	PMF	passende Peptide	Sequenzab- deckung [%]	MW [kDa]	pI	Δ
$\Delta om14$								
$\Delta om45$								
14	gi:6319407	Prx1p	179	16/29	53	30	8,97	+2,8
1	gi:6322409	Tdh1p	154	17/42	42	36	5,52	-18,2
4	gi:6322055	Om45p-1	267	39/73	72	45	8,55	-16,0
5	gi:6322055	Om45p-4	177	31/76	54	45	8,55	-10,0
8	gi:6322055	Om45p-2	307	46/88	71	45	8,55	-6,8
7	gi:6319594	Tef2p	79	18/75	33	50	9,14	-5,9
10	gi:6320235	Pst2p	64,*	6/26	44	21	5,46	-4,7
6	gi:6322055	Om45p-3	272	42/73	69	45	8,55	-4,5
11	gi:6325449	Qcr2p	208	19/31	47	41	4,62	-3,7
3	gi:6324716	Lsc1p	153	15/35	50	35	8,59	-3,5
12	gi:6322919	Lsp1p	98	14/36	31	38	4,62	-3,4
13	gi:6319707	Om14p	386	8/60	41	15	8,97	-3,0
13	gi:6322918	Pam17p	96	4/60	27	22	9,70	-3,0
9	gi:6322919	Ccp1p-1	161	24/58	46	40	5,95	-2,9
15	gi:6322919	Ccp1p-2	116	15/30	35	40	5,95	-2,7
16	gi:6319806	Pdilp	97	16/32	22	59	4,38	-2,6
17	gi:6325253	Pil1p	187	22/59	53	38	4,54	-2,6
2	gi:6321613	Cbp4p	69	13/64	65	20	9,43	-2,5
18	gi:6322919	Ccp1p-3	178	24/56	48	40	5,95	-2,5
19	gi:6320430	Htb1p	96	8/28	35	14	10,10	-2,4
20	gi:6320851	Hem14p	110	24/75	38	60	9,33	-2,3

