

**Untersuchungen zur Assemblierung  
des ABC-Transporters Mdl1  
in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae***

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Universität zu Köln**

**vorgelegt von**

**Dominik Galluhn**

**aus Leipzig**

**Köln, 2005**

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Langer  
Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2005

## Abstract

The ABC transporter Mdl1 is localised in the inner membrane of mitochondria and mediates the export of peptides generated upon proteolysis of mitochondrial proteins by the *m*-AAA protease. Biochemical characterisation of Mdl1 and identification of binding partners should give information about the function of mitochondrial peptide export in the cell.

In the presence of ATP Mdl1 has a native molecular weight of 250 kDa, whereas a high molecular weight complex of 850 kDa was identified in the absence of ATP. Further studies demonstrated the formation of a homooligomeric, probably dimeric complex of Mdl1 in the inner membrane of mitochondria after addition of ATP. A possible interaction between Mdl1 and the *m*-AAA protease during peptide export was not confirmed. Isolation of the complex associated to Mdl1 by affinity purification and analysis of protein components employing MALDI mass spectrometry led to the identification of subunits of the  $F_1F_0$ -ATP synthase as binding partners. Inactivation of the *m*-AAA protease caused the loss of the high molecular weight complex. This is due to an impairment of the  $F_1F_0$ -complex, as the assembly of the  $F_0$ -sector depends on the proteolytic activity of the *m*-AAA protease. Further investigations revealed the binding of Mdl1 to the  $F_0$ -sector in the membrane depending on the ATPase activity of the ATP synthase. In contrast, nucleotide binding and hydrolysis of Mdl1 did not affect this interaction. Various results led to the conclusion that the transporter bound to the  $F_1F_0$ -complex is inactive. Although there is no direct evidence this might allow the regulation of the peptide export via Mdl1 depending on the activity of the ATP synthase and therefore on the respiratory activity of the cell. This would be in agreement with a possible role of Mdl1 in the response of the cell to oxidative stress. Under these conditions an increase in the degradation of respiratory chain complexes and loss of mitochondrial DNA occur. Activation of Mdl1 due to an impairment of oxidative phosphorylation could compensate an increased need for peptide export activity after proteolysis of respiratory chain subunits. Up to now there are no hints for a signal function of the peptide export by Mdl1. Although, loss of the *i*-AAA protease leads to an impairment of the *PDR*-signal pathway.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract (in englischer Sprache)

1	Einleitung .....	1
1.1	Bedeutung mitochondrialer Prozesse für die Zelle .....	1
1.1.1	Die mitochondriale F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.....	2
1.2	Das proteolytische System der Mitochondrien .....	3
1.3	Peptidexport aus Mitochondrien .....	5
1.4	ABC-Transporter.....	8
1.4.1	Peptidtransporter der ABC-Familie .....	9
1.4.2	Mitochondriale ABC-Transporter in <i>S. cerevisiae</i> .....	12
1.4.3	Physiologische Funktion von Mdl1.....	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	18
2.1.2	Amplifizieren von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	19
2.1.3	Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	20
2.1.4	Größenauftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese .....	20
2.1.5	Enzymatische Modifikation von DNA.....	21
2.1.6	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation .....	21
2.1.7	Klonierungsstrategie und genomische Manipulation .....	22
2.1.8	Sequenzierung von DNA .....	23
2.1.9	Verwendete Plasmide .....	23
2.1.10	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	24
2.2	Methoden der Hefegenetik .....	24
2.2.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	24
2.2.2	Transformation von <i>S.cerevisiae</i> .....	24
2.2.3	Herstellung mutanter Hefestämme.....	25
2.2.4	Nachweis homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.2.5	Erzeugung von ρ <sup>0</sup> -Stämmen von <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.2.6	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> .....	27
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	28

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
2.3.2	Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	29
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
2.3.4	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau G250 .....	29
2.3.5	Transfer von Proteinen auf Membranen.....	30
2.3.6	Gelfiltration.....	30
2.3.7	Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) .....	31
2.3.8	Analyse von Proteinkomplexen durch Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation .....	32
2.3.9	Affinitätsreinigung von Mdl1.....	33
2.3.10	Identifizierung von Proteinen mittels MS nach Auftrennung durch SDS-PAGE.....	35
2.3.11	Synthese von radioaktiv markiertem Vorstufenprotein <i>in vitro</i> .....	35
2.3.12	Autoradiographie und Phosphoreszenzanalyse radioaktiv markierter Proteine.....	36
2.3.13	ATPase-Aktivitätstest.....	36
2.4	Zellbiologische Methoden.....	37
2.4.1	Alkalische Lyse von Hefezellen.....	37
2.4.2	Schnelle Präparation mitochondrialer Membranen aus <i>S. cerevisiae</i> .....	38
2.4.3	Präparation mitochondrialer Membranen zur Messung der ATPase-Aktivität.....	38
2.4.4	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	39
2.4.5	Import von Vorstufenprotein in isolierte Mitochondrien .....	40
2.4.6	Proteintranslation in isolierten Mitochondrien und Analyse exportierter Abbauprodukte durch Gelfiltration ("Peptidexport-Assay").....	40
2.4.7	ATP-Depletion in Mitochondrien .....	41
2.5	Immunologische Methoden.....	41
2.5.1	Affinitätsreinigung von Antiseren.....	41
2.5.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot).....	42
2.5.3	Verwendete Antiseren.....	43
2.6	Verwendete Medien .....	43
2.7	Chemikalien, Enzyme und Geräte.....	44
2.7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	44
2.7.2	Geräte .....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	Mdl1 als Bestandteil von Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran .....	46
3.1.1	Homooligomerisierung von Mdl1 .....	46

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.2	Mdl1 als Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes.....	48
3.1.3	Rolle der <i>m</i> -AAA-Protease bei der Komplexbildung von Mdl1.....	49
3.2	ATP-abhängige Assoziation von Mdl1 mit dem F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthasekomplex .....	51
3.2.1	Mdl1 bindet Untereinheiten der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.....	51
3.2.2	Kofraktionierung von Mdl1 mit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.....	53
3.2.3	Die Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase in Abhängigkeit von der <i>m</i> -AAA-Protease .....	54
3.2.4	Mdl1 bindet an die vollständig assemblierte ATP-Synthase .....	56
3.2.5	Die Deletion von <i>MDL1</i> beeinträchtigt nicht die Assemblierung der ATP-Synthase	57
3.2.6	Mdl1 bindet über den F <sub>0</sub> -Sektor an die ATP-Synthase .....	59
3.2.7	Die Interaktion von Mdl1 mit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase erfolgt unabhängig von den nicht essentiellen Untereinheiten e und g.....	60
3.2.8	Bedeutung der Mdl1-Aktivität für die Assemblierung mit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.	61
3.2.9	Mdl1 zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität der ATP-Synthase .....	64
3.2.10	Die F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase-Aktivität beeinflusst die Interaktion mit Mdl1 .....	65
3.3	Einfluss der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase auf den durch Mdl1 vermittelten Peptidexport.....	68
3.3.1	Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase und der mitochondriale Peptidexport .....	68
3.3.2	Mdl1 zeigt keinen Einfluss auf die Aktivierung des <i>PDR</i> -Weges infolge einer Beeinträchtigung des F <sub>0</sub> -Sektors der ATP-Synthase .....	70
4	Diskussion .....	73
4.1	Nukleotidbindung und Dimerisierung von Mdl1 .....	73
4.2	Komplexbildung von Mdl1 in Abhängigkeit der Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase .....	75
4.3	Interaktion von Mdl1 mit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.....	76
4.4	Mögliche Funktionen des mitochondrialen Peptidexports.....	81
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Verwendete Abkürzungen.....	99
8	Anhang .....	101

# 1 Einleitung

Die eukaryontische Zelle ist durch die Unterteilung in verschiedene Kompartimente gekennzeichnet. Die Abgrenzung durch biologische Membranen ermöglicht die räumliche Trennung biochemischer Prozesse und damit deren effektive Regulation. Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat sowie Lysosomen und Peroxisomen sind von einer Membran umgeben, während Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten von zwei Lipiddoppelschichten abgegrenzt werden. Obwohl für Makromoleküle, Ionen und hydrophile Verbindungen undurchlässig, besitzen biologische Membranen integrierte Proteine, die als Pumpen und Kanäle einen kontrollierten Stoffaustausch gewährleisten. Durch den Transport von Metaboliten, Ionen oder Signal- und Botenstoffen wird die Zusammensetzung des intrazellulären Milieus kontrolliert und somit die Anpassung der Zelle an verschiedenste Umweltbedingungen ermöglicht. Eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen sind an Lipidmembranen lokalisiert. Eine herausragende Stellung nimmt hier die innere Mitochondrienmembran ein, die durch eine besonders hohe Konzentration von Proteinkomplexen gekennzeichnet ist.

## 1.1 Bedeutung mitochondrialer Prozesse für die Zelle

Nach der allgemein anerkannten Endosymbiontentheorie haben sich Mitochondrien aus  $\alpha$ -Proteobakterien entwickelt, die von einer protoeukaryontischen Zelle aufgenommen wurden. Es sind vielgestaltige, meist längliche und zylinderförmige Zellorganellen von 0,5- 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser, die von zwei Membranen begrenzt werden. Hierdurch erfolgt eine Unterteilung in vier Kompartimente: die äußere Membran, den Intermembranraum, die innere Membran und die Matrix. Die Außenmembran enthält Poren, die durch das Protein Porin gebildet werden und den passiven Transport von Molekülen bis zu einer Größe von  $\sim 5$  kDa ermöglichen (Mannella, 1992). Aktive Transportsysteme gewährleisten hingegen die Permeabilität der Innenmembran für bestimmte Moleküle und Ionen. In der inneren Membran, die zur Oberflächenvergrößerung zahlreiche Einstülpungen (Cristae) aufweist, sind die Komponenten der oxidativen Phosphorylierung lokalisiert. Hier werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert, die zum Aufbau eines Membranpotentials beitragen, das für die ATP-Synthese an der  $F_1F_0$ -ATPase

notwendig ist. Die mitochondriale Matrix ist Ort vieler Prozesse des Zellstoffwechsels. Neben Citratzyklus, Fettsäurestoffwechsel sowie der Biosynthese verschiedener Aminosäuren sind hier Enzyme des Harnstoffzyklus, des Nukleotidstoffwechsels, der Fe/S-Protein- und Häm biosynthese lokalisiert. Mitochondrien sind daher als Zellorganellen essentiell. Die Störung mitochondrialer Funktionen kann zur Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zelle führen.

Mitochondrien teilen sich unabhängig von der Zelle und besitzen ein eigenes Genom, das jedoch nur für wenige mitochondriale Proteine kodiert (Grivell, 1989). In *S. cerevisiae* gehören hierzu 8 Proteine: Var1, eine mitochondriale Ribosomenuntereinheit, drei Untereinheiten der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox I, II, III), Cytochrom *b* und die Untereinheiten 6, 8, 9 der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine sind im Zellkern kodiert. Sie werden im Zytosol translatiert und in die Mitochondrien importiert (Grivell, 1995). Die Rezeptoren des Translokationskomplexes der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex) erkennen die Importsignale der Vorstufenproteine und leiten diese weiter zur Translokationspore. Am Translokationskomplex der inneren Membran (TIM-Komplex) erfolgt der Import in die Matrix in Abhängigkeit vom Membranpotential. Der *bc<sub>1</sub>*-Komplex, die Cytochrom *c*-Oxidase und die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in *S. cerevisiae* setzen sich aus mitochondrial- und kernkodierten Untereinheiten zusammen. Regulationsmechanismen, durch die mitochondriale und extramitochondriale Proteinbiosynthese aufeinander abgestimmt werden, sind bisher jedoch weitestgehend unbekannt.

### 1.1.1 Die mitochondriale $F_1F_0$ -ATP-Synthase

Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase katalysiert die Phosphorylierung von ADP zu ATP unter aeroben Bedingungen in den Mitochondrien. Voraussetzung dafür ist ein Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran, der durch den Elektronentransfer in der Atmungskette aufrechterhalten wird. Die mitochondriale ATP-Synthase besteht aus zwei funktionell verschiedenen Einheiten (Boyer, 1997). Der  $F_0$ -Sektor verankert das Enzym in der Membran und bildet einen Kanal, durch den Protonen vom Intermembranraum in die Matrix fließen. Dies führt zu Konformationsänderungen, die auf den in die Matrix gerichteten  $F_1$ -Subkomplex übertragen werden, an dem die ATP-Synthese stattfindet (Boyer, 1993; Noji *et al.*, 1997). In verschiedenen Strukturanalysen wurde der Aufbau des Enzymkomplexes näher untersucht (Abrahams *et al.*, 1994; Karrasch und Walker, 1999; Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000).

Die mitochondriale ATP-Synthase in *S. cerevisiae* besteht aus mindestens 20 verschiedenen Untereinheiten, wobei 13 Polypeptide strukturbildende, essentielle Komponenten des Enzyms darstellen (Velours und Arselin, 2000). Während der  $F_1$ -Subkomplex aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  (Stator) sowie  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  (Rotor) zusammengesetzt ist, besteht der  $F_0$ -Sektor aus den Transmembranproteinen 6, 8, 9, f, i (j) und h. Für die Komponenten i und h konnten bisher keine Homologe in höheren Eukaryonten gefunden werden. Die Untereinheiten 4, d und OSCP bilden den sogenannten "zweiten Stiel", der den Protonenkanal, der von der Untereinheit 6 gebildet wird, und die Stator-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des  $F_1$ -Subkomplexes miteinander verbindet. Weitere Polypeptide wurden mit der ATP-Synthase assoziiert gefunden, die jedoch für die Assemblierung des  $F_1F_0$ -Komplexes nicht essentiell sind (Velours und Arselin, 2000; Mueller, 2000). Die Inhibitor-Peptide  $IF_1$  (Inh1) und STF1 sind an der Regulation der katalytischen Aktivität der  $F_1$ -ATPase beteiligt (Venard *et al.*, 2003). So hemmt  $IF_1$  die ATP-Hydrolyse in Abwesenheit eines Protonengradienten, während der Enzymkomplex bei erhöhtem pH-Wert in der Matrix womöglich durch STF1 inaktiviert wird (Cabezón *et al.*, 2002). Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase bildet Dimere und oligomere Strukturen (Arnold *et al.*, 1998; Paumard *et al.*, 2002). Die nicht essentiellen  $F_0$ -Komponenten Su e und Su g sowie die bisher nur in Hefe gefundene Untereinheit Su k wurden als Dimer-spezifische Bestandteile der ATP-Synthase identifiziert. Sie sind als integrale Membranproteine an der Assoziation von zwei  $F_0$ -Sektoren beteiligt (Arnold *et al.*, 1998). Es wird diskutiert, dass die Zusammenlagerung von ATP-Synthase-Dimeren eine Funktion in der Cristae-Ausbildung der inneren Mitochondrienmembran haben könnte (Paumard *et al.*, 2002).

An der Biogenese einer funktionellen ATP-Synthase sind aber auch Proteine beteiligt, die selbst nicht Bestandteil des Komplexes sind. Während die Chaperone Atp12 und Atp11 für die Integration der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten in  $F_1$  notwendig sind (Ackerman und Tzagoloff, 1990a; Ackerman 2002) ist Atp10 an der Assemblierung von  $F_0$  beteiligt, indem es den Einbau von Atp6 in den Subkomplex vermittelt (Ackerman und Tzagoloff, 1990b, Tzagoloff *et al.*, 2004).

## 1.2 Das proteolytische System der Mitochondrien

Die Eigenständigkeit der Mitochondrien als Organelle endosymbiontischen Ursprungs äußert sich auch im Vorliegen eines eigenen proteolytischen Systems das in allen Eukaryonten konserviert ist. Neben Prozessierungspeptidasen, die für die proteolytische Spaltung der Signalsequenzen von

importierten Vorstufenproteinen verantwortlich sind, enthalten Mitochondrien eine Reihe von ATP-abhängigen Proteasen, die bei der Qualitätskontrolle und Biogenese mitochondrialer Proteinkomplexe sowie beim Abbau kurzlebiger regulatorischer Proteine eine Rolle spielen (Van Dyck und Langer, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). ATP-abhängige Proteasen sind in Struktur und Funktion stark konserviert und gehören zur AAA<sup>+</sup>-Superfamilie (ATPases Associated with a variety of cellular activities; Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001). In *E. coli* und in Mitochondrien wurden drei Klassen ATP-abhängiger Proteasen gefunden: die Lon-, Clp- und AAA-Proteasen. Ein vierte nicht-mitochondriale Klasse wird durch das 26S-Proteasom repräsentiert.

Pim1 ist eine Serinprotease in *S. cerevisiae* mit Homologie zur bakteriellen Lon-Protease (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994), die einen löslichen homo-oligomeren Komplex mit Ringstruktur bildet (Stahlberg *et al.*, 1999). Sie ist an der Expression mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskette beteiligt und für die Integrität der mitochondrialen DNA von Bedeutung (Van Dyck *et al.*, 1998).

Clp-Proteasen sind heterooligomere Serinproteasen, die sich aus proteolytischen Untereinheiten und regulatorischen ATPase-Untereinheiten zusammensetzen (Gottesmann, 1999, Weber-Ban *et al.*, 1999). Es sind Homologe in *E. coli* und den meisten Eukaryonten, jedoch nicht in *S. cerevisiae*, bekannt (De Sagarra *et al.*, 1999).

Die AAA-Proteasen sind ATP-abhängige Metalloproteasen, die große membranständige Komplexe in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien bilden (Langer, 2000). Die am besten untersuchte bakterielle AAA-Protease ist FtsH in *E. coli* (Tomoyasu *et al.*, 1993). In *S. cerevisiae* sind zwei mitochondriale Vertreter bekannt. Sie werden nach der Lokalisierung ihres proteolytischen Zentrums in der Matrix oder dem Intermembranraum als *m*- und *i*-AAA-Protease bezeichnet (Langer und Neupert, 1996). Während die *m*-AAA-Protease einen heterooligomeren Komplex aus den Untereinheiten Yta10 (Afg3) und Yta12 (Rca1) bildet (Arlt *et al.*, 1996), liegt die *i*-AAA-Protease als Homooligomer der Untereinheit Yme1 vor (Leonhard *et al.*, 1996). Beide Komplexe haben ein natives Molekulargewicht von ca. 1 MDa. Die genaue Stöchiometrie der Untereinheiten ist noch unbekannt.

Das Fehlen der *i*-AAA-Protease führt zu einer Beeinträchtigung der respiratorischen Aktivität der Zelle bei erhöhter Temperatur (Weber *et al.*, 1995), zu einer abnormen Morphologie der Mitochondrien (Campbell *et al.*, 1994) und einer zunehmenden Verlustrate mitochondrialer DNA (Thorsness *et al.*, 1993). Die *i*-AAA-Protease ist am Abbau nicht-assemblierter Proteine der inneren Mitochondrienmembran beteiligt. Bisher sind Cox2, Yme2 und Nde1 als Substrate bekannt

(Leonhard *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995; Augustin *et al.*, 2004; zur Veröffentlichung eingereicht). Die *m*-AAA-Protease ist für die respiratorische Kompetenz der Zelle essentiell (Arlt *et al.*, 1998; Paul und Tzagoloff, 1995; Tzagoloff *et al.*, 1994). Sie ist an Spleißprozessen mitochondrialer Transkripte beteiligt und kontrolliert die posttranslationale Assemblierung von Atmungskettenkomplexen einschließlich der ATP-Synthase. Als Substrate wurden bisher die nicht assemblierten Untereinheiten Cox1 und Cox3 der Cytochrom *c*-Oxidase, Cytochrom *b* des Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes und die Untereinheiten 6; 8 und 9 der ATP-Synthase identifiziert (Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Das gleichzeitige Fehlen beider AAA-Proteasen ist für die Zelle letal, was auf eine überlappende Substratspezifität hindeutet (Leonhard *et al.*, 2000).

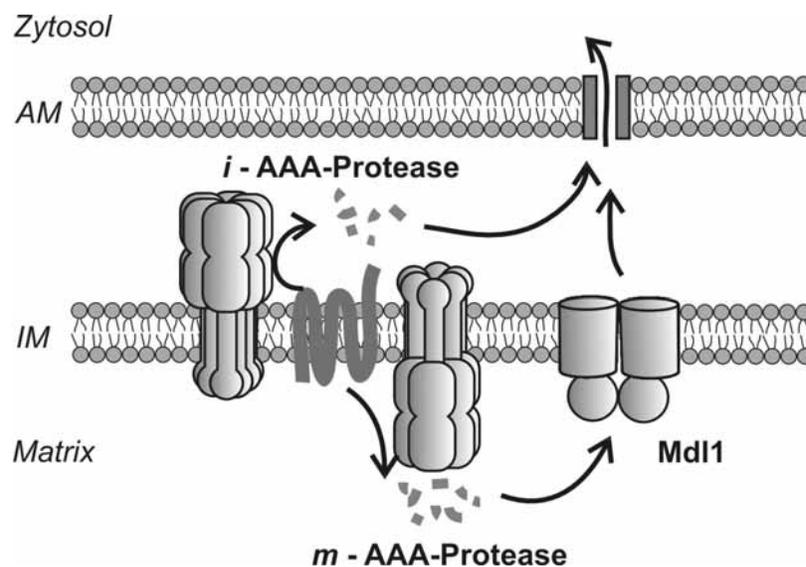
Beim Menschen wurden AFG3L2 und Paraplegin als Orthologe der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten Yta10 und Yta12 identifiziert (Atorino *et al.*, 2003). Mutationen in Paraplegin sind für eine autosomal-rezessive Form der spastischen Paraplegie verantwortlich (Casari *et al.*, 1998; Casari und Rugarli, 2001). AFG3L1 wurde als weiteres Säuger-Homolog zu den Untereinheiten der *m*-AAA-Protease gefunden. Lediglich für das Maus-Homolog konnte ein Genprodukt in Mitochondrien lokalisiert werden, dessen zelluläre Rolle jedoch weitestgehend unbekannt ist (Kremmidiotis *et al.*, 2001). YME1L stellt offensichtlich das Ortholog der *i*-AAA-Protease im Menschen dar, wo es mitochondrial lokalisiert wurde (Coppola *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000). Die Gensequenz zeigt ausgeprägte Homologie zu *YME1* in Hefe (Juhola *et al.*, 2000) und die Expression des Proteins in  $\Delta yme1$ -Hefezellen kann den Wachstumsdefekt bei erhöhten Temperaturen kompensieren (Shah *et al.*, 2000).

### 1.3 Peptidexport aus Mitochondrien

Die Aktivität verschiedener Peptidasen ermöglicht einen vollständigen Abbau mitochondrialer Proteine zu Aminosäuren (Desaultes *et al.*, 1982). Außerdem konnten Transportsysteme identifiziert werden, die am Transfer von Aminosäuren durch die innere Mitochondrienmembran beteiligt sind (Wipf, 2002). An isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wurde jedoch beobachtet, dass nicht assemblierte Proteine nur zu einem Teil vollständig abgebaut werden. Vielmehr führt die Eliminierung mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskette durch die AAA-Proteasen zur Freisetzung eines heterogenen Spektrums von Abbauprodukten (Young *et al.*, 2001). Etwa 70% des exportierten Materials entspricht dabei freien Aminosäuren, wohingegen ca. 30% aus Peptiden

unterschiedlicher Größe bestehen, die man entsprechend ihres Elutionsverhaltens in einer säulenchromatographischen Analyse in zwei Größenbereiche unterteilen kann. Diese Fraktionen entsprechen Peptiden einer Länge von 6-19 Aminosäuren (2100-600 Da) bzw. 2-5 Aminosäuren (600-200 Da) (Young *et al.*, 2001). Die Inaktivierung der *m*-AAA-Protease hat eine verminderte Freisetzung dieser proteolytischen Produkte zur Folge. Die Abwesenheit der *i*-AAA-Protease führt zu einer signifikanten Erniedrigung des Exports längerer Peptide (6-19 Aminosäuren). Ebenso zeigt die Disruption des Genes, das für den mitochondrialen ABC-Transporter Mdl1 kodiert, eine Beeinträchtigung im Export dieser Peptide, was zur Identifizierung von Mdl1 als Peptidtransporter führte (Young *et al.*, 2001).

Es können demnach mindestens zwei verschiedene Peptidexportwege aus Mitochondrien unterschieden werden (Abb. 1). Durch die *m*-AAA-Protease erzeugte Peptide werden am Ort der proteolytischen Aktivität in die Matrix freigesetzt und durch Mdl1 in den Intermembranraum transportiert. Von der *i*-AAA-Protease freigesetzte Abbauprodukte gelangen hingegen direkt in den Intermembranraum (Young *et al.*, 2001). Möglicherweise wird hier der Abbau der Peptide fortgesetzt. Der Weitertransport der Peptide durch die Außenmembran könnte passiv über die Porine oder den TOM-Komplex erfolgen (Mannella, 1992; Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998).



#### Abb. 1: Wege des Peptidexports aus Mitochondrien

Fehlgefaltete oder nicht assemblierte Proteine in der inneren Mitochondrienmembran werden durch AAA-Proteasen abgebaut, deren proteolytisch aktive Zentren zum Intermembranraum (*i*-AAA-Protease) bzw. zur Matrix (*m*-AAA-Protease) ausgerichtet sind. Die *i*-AAA-Protease kann ihre Abbauprodukte direkt in den Intermembranraum freisetzen. Peptide, die von der *m*-AAA-Protease erzeugt werden, gelangen zunächst in den Matrixraum, von wo sie durch Mdl1 in den Intermembranraum transportiert werden.

Das Vorhandensein von Peptidexportsystemen in höheren Eukaryonten ist wahrscheinlich, da entsprechende Homologe der AAA-Proteasen (Casari *et al.*, 1998; Banfi *et al.*, 1999) und des Mdl1-Transporters (Hogue *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Shirihai *et al.*, 2000) identifiziert werden konnten. Die physiologische Rolle des Peptidexports ist jedoch bisher weitestgehend ungeklärt. In Säugerzellen können antigene Peptide die ihren Ursprung in mitochondrial kodierten Proteinen haben durch den MHC I-Komplex an der Zelloberfläche präsentiert werden (Fischer-Lindahl *et al.*, 1997; Butcher *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass Mutationen in der mitochondrialen DNA eine verstärkte Präsentation von MHC I an der Zelloberfläche zur Folge haben und damit offenbar zur Eliminierung der betroffenen Zellen führen (Gu *et al.*, 2003). Da *S. cerevisiae* über derartige Mechanismen der Antigen-Präsentation nicht verfügt, erfüllen die exportierten Peptide möglicherweise weitere Funktionen, wie die Übermittlung intrazellulärer Signale.

Eine Vielzahl experimenteller Befunde weisen auf die Existenz retrograder Signalwege zwischen Mitochondrien und Zellkern hin, deren Funktion es ist, die Genexpression im Zellkern dem Bedarf in den Organellen anzugleichen. Am besten erforscht zeigt sich hier der *RTG*-Weg (Retrograde Signalling) in *S. cerevisiae*, bei dem die Beeinträchtigung der respiratorischen Funktion der Mitochondrien möglicherweise durch eine Erniedrigung des zellulären Glutamatgehalts zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Rtg1 und Rtg3 führt (Liao und Butow, 1993). Diese aktivieren die Genexpression für Enzyme anaplerotischer Reaktionen des Citratzyklus (Liu und Butow, 1999). Es existieren jedoch auch *RTG*-unabhängige Regelkreise als Reaktion auf den Verlust mitochondrialer DNA, wie die Expression des Ammoniumtransporters Ato3 in Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration (Palkova *et al.*, 2002) und der *PDR*-Weg (Pleiotropic Drug Resistance). Letztgenannter führt abhängig von den Transkriptionsfaktoren Pdr1 und Pdr3 zur Expression einer Reihe von Genprodukten, die die Resistenz gegen bestimmte Verbindungen erhöhen. Hierzu gehört die vermehrte Expression des Resistenz-vermittelnden ABC-Transporters Pdr5 in der Plasmamembran als Folge der Fehlassemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase und der ATP-Synthase sowie bei Verlust der mitochondrialen DNA (Hallstrom und Moye-Rowley, 2000; Zhang und Moye-Rowley, 2001). Das von den Mitochondrien ausgehende Signal ist jedoch unbekannt. Eine Reihe von retrograden Signalwegen wurde auch in höheren Eukaryonten gefunden. Sie stehen oftmals im Zusammenhang mit einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch Mitochondrien (Amuthan *et al.*, 2002; Arnould *et al.*, 2002), was offensichtlich auch einen auslösenden Faktor der kürzlich entdeckten mitochondrialen Stress-Antwort darstellt (Zhao *et al.*, 2002; Butow und Avadhani, 2004).

## 1.4 ABC-Transporter

Alle bisher bekannten Peptidtransporter lassen sich drei Superfamilien zuordnen. Hierzu gehören die ABC-Transporter (ATP-binding Cassette), sowie Transporter des PTR- und OPT-Typs (Peptid-Transporter bzw. Oligopeptid-Transporter). Während bei den erstgenannten der Transfer durch die Membran direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist (Holland und Blight, 1999), erfolgt der Transport der PTR- und OPT-Translokasen in Abhängigkeit eines Protonengradienten (Meredith und Boyd, 2000).

ABC-ATPasen bilden eine der größten Superfamilien hoch konservierter Proteine, die in allen Organismenreichen verbreitet sind. Sie stellen in der Mehrheit Transporter dar, die eine Vielzahl von Substraten durch biologische Membranen befördern. Sie können aber auch die Funktion von Ionenkanälen, Rezeptoren oder Regulatoren haben, wie der Cl<sup>-</sup>-Ionenkanal CFTR und der Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 (Higgins, 1992; Higgins, 2001). Ein funktioneller Transporter besteht mindestens aus zwei ATPase-Domänen und zwei an der Substraterkennung beteiligten Membrandomänen, die miteinander verbunden sind, aber auch als getrennte Polypeptidketten vorliegen können. Während die Transmembrandomänen untereinander nur begrenzte Homologie zeigen, enthalten die hydrophilen Nukleotidbindedomänen hochkonservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz, die als Walker A-Motiv (GXXGXGKS/T) und Walker B-Motiv (vier hydrophobe Aminosäurereste gefolgt von DDEA/PTSALD, o.Ä.) bezeichnet werden (Walker *et al.*, 1982). Direkt N-terminal vom Walker B-Motiv liegt die für ABC-ATPasen spezifische LSGGQ-Signatur ("Q-loop"). Der katalytische Zyklus der meisten ABC-Transporter beginnt mit der Nukleotid- und Substratbindung gefolgt von der ATP-Hydrolyse und wird durch die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) und ADP abgeschlossen. ATP-Bindung und nachfolgende Hydrolyse ist notwendig, um das Substrat durch die Membran zu transportieren (Loo und Clarke, 1994b; Gorbulev *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Studien an verschiedenen Modellsystemen haben gezeigt, dass dieser Vorgang kooperativ unter Einbeziehung zweier Nukleotidbindedomänen erfolgt (Higgins und Linton, 2004). Mutationen in den konservierten Walker-Motiven eines der katalytischen Zentren führt zum völligen Verlust der ATPase- und Transportaktivität (Loo und Clarke, 1994a; Karttunen *et al.*, 2001).

### 1.4.1 Peptidtransporter der ABC-Familie

Die an Peptidexportprozessen beteiligten ABC-Transporter werden überwiegend der DPL-Familie (Drug, Peptide, Lipid export) zugeordnet. Hierzu zählen die Lantibiotika- und Bakteriocintransporter (Otto und Gotz, 2001; O'Keeffe *et al.*, 1999) sowie die an der Sekretion von Enzymen, Proteinen der äußeren Membran und Hämolysin beteiligten PRT- und HLY-Transporter in Prokaryonten (Young und Holland, 1999). In Eukaryonten wurden Vertreter der PGP-, TAP- und MDL-Subfamilien als Peptidexporter identifiziert (Holland *et al.*, 2003). Sie bilden beim Menschen und in anderen Säugersystemen die ABCB-Familie der ABC-Proteine (Dean *et al.*, 2001). Weiterhin wurde für MRP1 als Vertreter einer eigenen ABC-Familie, die zahlreiche Verbindungen und organische Anionen als Glutathion-Konjugate transportiert, der Export kleiner hydrophober Peptide nachgewiesen (de Jong *et al.*, 2001).

#### *P-Glycoprotein (Pgp)*

Die PGP-Subfamilie umfasst eine Gruppe von ABC-Transportern, die in Eukaryonten bei Überexpression Resistenzen gegen eine Vielzahl zytotoxischer Verbindungen vermitteln und daher auch als MDR-Proteine (Multiple Drug Resistance) bezeichnet werden.

Eines der am besten charakterisierten Proteine dieser Subfamilie ist Pgp (P-Glycoprotein, Mdr1). Pgp findet sich beim Menschen in zahlreichen Zelltypen und entsprechende Orthologe sind in nahezu allen Eukaryonten vertreten. Das Protein besitzt zwei Nukleotidbindedomänen (NBD) sowie zwei Transmembrandomänen (TMD) mit je sechs Transmembranhelices in einer Polypeptidkette und ist in der Plasmamembran lokalisiert (Chen *et al.*; 1986, Rosenberg *et al.*, 1997). Pgp transportiert ein breites Spektrum hydrophober Verbindungen (Ambudker *et al.*, 1999) und zeigt die Funktion einer Lipid-"Flippase", die Lipide oder hydrophobe Verbindungen von der Innen- zur Außenseite der Lipiddoppelschicht befördert (Higgins und Gottesmann, 1992). Eine ähnliche Funktionsweise wird für den Transport von Substraten angenommen, die vom Transporter direkt aus der Membran aufgenommen und exportiert werden (Romsicki und Sharom, 2001). Auch hydrophobe Peptide können als Substrate und Modulatoren von Pgp fungieren (Sharom *et al.*, 1998). So wurde in Mäusen gezeigt, dass Pgp kleine Peptide wie  $\beta$ -Endorphin und Enkephaline aus dem Gehirn in das Blut transportiert (King *et al.*, 2001).

Pgp gehört zu den ABC-Transportern, bei denen der ATP-Hydrolyse-Zyklus am besten charakterisiert ist. Die ATP-Hydrolyse erfolgt alternierend jeweils nur an einer NBD (Hrycyna *et al.*,

1998). Durch den Einsatz nicht hydrolysierbarer Nukleotidanaloga und Verbindungen, die den Übergangszustand nachahmen, wurde untersucht, wie die Konformationsänderung und damit der Substrattransport an den Hydrolyseprozess gekoppelt ist (Wang *et al.*, 1997; Loo und Clarke, 2000). Die Modelle gehen von mindestens zwei Konformationszuständen aus. Die Konformationsänderung von niedriger zu hoher Substrataffinität erfolgt entweder nur durch ATP-Bindung oder durch zusätzliche Hydrolyse eines zweiten ATP-Moleküls (Druley *et al.*, 2001; Sauna und Ambudkar, 2001). Außerdem wurde für Pgp eine vom Substrat unabhängige konstitutive ATPase Aktivität postuliert (Druley *et al.*, 2001). Bestätigung fanden die Modelle in der kryoelektronenmikroskopischen Analyse der Übergangszustände durch Rosenberg *et al.* (2001).

### *Der TAP-Transporter*

Die TAP-Subfamilie umfasst die Untereinheiten TAP1 und TAP2 des heterodimeren TAP-Komplexes (Transporter associated with Antigen Processing) und seiner Orthologe in Säugerzellen, die die Translokation antigener Peptide aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum ermöglichen (Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002). Jede Untereinheit stellt, anders als Pgp, einen Halbtransporter mit einer Transmembrandomäne und einer zytosolischen Nukleotidbindedomäne dar, wobei das Heterodimer aus TAP1 und TAP2 die funktionelle Form bildet (Kelly *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1994). Auch in der Membrantopologie unterscheiden sich die Untereinheiten von Pgp. In Hydrophobizitätsanalysen wurden jeweils Kerndomänen von sechs Transmembranhelices vorhergesagt, wobei für die N-terminalen Bereiche von TAP1 und TAP2 vier bzw. drei zusätzliche Transmembranhelices angenommen werden (Gileadi und Higgins, 1997; Vos *et al.*, 1999). Ausgedehnte Loop-Regionen zwischen den Transmembranhelices (TM) 4 und 5 der Membran-Kerndomänen von TAP1 und TAP2 sowie ~15 Aminosäurereste C-terminal von der TM 6 wurden als Peptidbindestellen identifiziert (Nijenhuis und Hämmerling, 1996).

Die von TAP in das ER transportierten Peptide werden überwiegend durch das 20S/26S-Proteasom erzeugt, indem Proteine endogener oder viraler Herkunft abgebaut werden (Baumeister *et al.*, 1998; Coux *et al.*, 1996). Im ER-Lumen erfolgt unter Beteiligung der Chaperone Calnexin, Calretikulin und ERp57 die Assemblierung mit dem MHC I-Komplex, bestehend aus  $\alpha$ -Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Pamer und Cresswell, 1998; Cresswell *et al.*, 1999). Calretikulin und ERp57 stabilisieren als Bindungspartner den Peptid-Ladekomplex, während die Interaktion von MHC I mit dem TAP-Komplex durch das Protein Tapasin vermittelt wird (Sadasivan *et al.*, 1996; Harris *et al.*,

2001). Peptidbindung stabilisiert den MHC I-Komplex, der dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert wird.

Das Proteasom erzeugt Peptide mit einer Größe von 3-30 Aminosäureresten, wobei das Optimum bei 6-11 Resten liegt (Kisselev *et al.*, 1999). Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäureresten werden besonders effizient von TAP transportiert (Koopmann *et al.*, 1996), für Peptide bestehend aus 8-16 Aminosäuren zeigt TAP jedoch gleiche Affinität (van Endert *et al.*, 1994). Die in das ER transportierten Peptide werden dort zur Beladung des MHC I Komplexes durch bestimmte Aminopeptidasen verkürzt (Serwold *et al.*, 2001). Die Substratspezifität von TAP ist überwiegend auf die drei N-terminalen Aminosäurereste und dem C-Terminus des Peptids konzentriert. Peptide mit basischen und hydrophoben Resten an beiden Termini werden bevorzugt gebunden (Uebel *et al.*, 1997).

Für TAP wurde nach Rekonstitution in Proteoliposomen gezeigt, dass Peptidbindung die ATPase-Aktivität stimuliert (Gorbulev, *et al.*, 2001). Die Funktionsweise von TAP wird ähnlich der von Pgp angenommen. Die hydrophilen Peptidsubstrate werden jedoch aus dem wässrigen Milieu aufgenommen. Desweiteren wird das TAP1/2-Dimer durch Nukleotidbindung und in geringerem Maße durch Substratbindung in einer funktionellen Konformation stabilisiert, die möglicherweise die ATP-Hydrolyse initiiert (Van Endert, 1999; Neumann und Tampé, 1999). Das Modell geht von einer alternierenden Hydrolyse an den Nukleotidbindedomänen aus, wobei zwei Moleküle ATP hydrolysiert werden, um den Transportvorgang einzuleiten und um die Ausgangskonformation des Transporters wiederherzustellen (Abele und Tampé, 1999). Mutation der Walker A- und B-Motive sowie anschließende Analyse der Nukleotid- und Peptidbindung zeigten, dass TAP1 und TAP2 in ihren Eigenschaften verschieden sind (Karttunen *et al.*, 2001; Lapinski *et al.*, 2001; Saveanu *et al.*, 2001).

Generell wird für die Funktion von TAP ein Drei-Schritt-Mechanismus angenommen. Verschiedene Daten liefern Modelle, die von der ATP-Bindung an TAP2 bzw. TAP1 im Grundzustand ausgehen (Alberts *et al.*, 2001; Van Endert *et al.*, 2002). Peptidbindung führt zur ATP-Hydrolyse an TAP2 (TAP1), was die ATP-Bindung an TAP1 (TAP2) und die Ausbildung eines Übergangszustandes initiiert. Mit der ADP-Freisetzung führt eine Erniedrigung der Substrataffinität zur Freisetzung des Peptids und gleichzeitig hat die ATP-Hydrolyse an TAP1 (TAP2) die Wiederherstellung des Grundzustandes zur Folge. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Peptidbindung die ATP-Hydrolyse an den Nukleotidbindedomänen beider Untereinheiten induziert (Chen *et al.*, 2003).

### *Ste6*

Ste6 wurde als erster ABC-Transporter in *S. cerevisiae* charakterisiert (Kuchler *et al.*, 1989; McGrath und Varshavsky, 1989) und ist im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran lokalisiert, wo er den **a**-Faktor, ein Peptidpheromon für die Paarung haploider Hefezellen, freisetzt. Farnesylierung und Carboxymethylierung dieses Dodekapeptids ist für den Transport notwendig (Sapperstein *et al.*, 1994). Nur die Koexpression der voneinander getrennten Halbseiten von Ste6 ermöglichen den Pheromon-Export, was zeigt, dass beide Hälften für die Funktion des Transporters erforderlich sind (Berkower *et al.*, 1996). Ebenso ist ATP-Hydrolyse für den Transportvorgang notwendig, da die Mutation einer LSGGQ-Signatur zur Inaktivierung von Ste6 führt (Browne *et al.*, 1996) und die Nukleotidbindedomänen mit photoreaktivem ATP quervernetzt werden kann (Kuchler *et al.*, 1993).

### **1.4.2 Mitochondriale ABC-Transporter in *S. cerevisiae***

In *S. cerevisiae* kodieren 30 Gene für ABC-Proteine (Decottignies und Goffeau, 1997; Bauer *et al.*, 1999). In ihrem Aufbau folgen sie generell den Mustern der eukaryontischen PGP- und MRP-Proteine (NH<sub>2</sub>-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2-COOH). Zusätzlich konnte in Hefe ein weiterer Typ eines ABC-Transporters mit umgekehrter Domänenarchitektur identifiziert werden (NH<sub>2</sub>-NBD1-TMD1-NBD2-TMD2-COOH) (Michaelis und Berkower, 1995). Diese Proteine bilden die PDR-Familie (Pleiotropic Drug Resistance), die am Transport einer Vielzahl zytotoxischer Verbindungen aus der Zelle beteiligt sind (Bauer *et al.*, 1999).

Die ABC-Transporter Atm1, Mdl1 und Mdl2, die Homologie zum P-Glycoprotein in höheren Eukaryonten zeigen, konnten in Mitochondrien lokalisiert werden. Nachfolgend soll auf die einzelnen Vertreter und ihre funktionellen Säuger-Homologe näher eingegangen werden.

### *Atm1*

Atm1 ist der erste in *S. cerevisiae* identifizierte mitochondriale ABC-Transporter, der in der inneren Membran mit Orientierung der Nukleotidbindedomäne zur Matrix lokalisiert werden konnte (Leighton und Schatz, 1995). Atm1 gehört zum Halbtransporter-Typ, wobei die funktionelle Form möglicherweise ein Dimer ist. Die N-terminale Membrandomäne enthält sechs mutmaßliche Transmembranhelices (Lill und Kispal, 2001, Chloupková *et al.*, 2003). Zellen, in denen *ATM1*

disruptiert wurde, zeigen einen starken Wachstumsdefekt auf Vollmedium mit Glucose und kein Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Desweiteren ist die Menge an Holocytochromen in der Zelle stark vermindert, während die Biosynthese der Apoformen nicht gestört ist (Leighton und Schatz, 1995; Kispal *et al.*, 1997). Außerdem zeigen  $\Delta atm1$ -Zellen eine Akkumulation von freiem Eisen in den Mitochondrien, was möglicherweise die Ursache von erhöhtem oxidativen Stress ist, dem die Zellen ausgesetzt sind (Kispal *et al.*, 1997) und weshalb eine erhöhte Tendenz zum Verlust mitochondrialer DNA besteht (Leighton und Schatz, 1995; Senbongi *et al.*, 1999). Die Beeinträchtigung der Assemblierung des Fe/S-Cluster-Holoproteins Leu1 führte zu der Vermutung, dass Atm1 am Fe/S-Cluster-Transport und der Fe/S-Protein-Biosynthese beteiligt ist (Kispal *et al.*, 1999; Lill, 1999; Lill und Kispal, 2000).

ABCB7 wurde als erstes Ortholog von Atm1 im Menschen identifiziert, da der menschliche Transporter den Phänotyp von  $\Delta atm1$  in Hefezellen unterdrückt und die Funktion in der Fe/S-Protein-Assemblierung kompensiert (Csere *et al.*, 1998; Bekri *et al.*, 2000). Zwei Mutationen in ABCB7 konnten als Ursache der X-chromosomal gekoppelten Anämie und Ataxie beim Menschen identifiziert werden (Allikmets *et al.*, 1999; Bekri *et al.*, 2000). Das menschliche Protein MTABC3 (ABCB6) stellt ein weiteres funktionelles Ortholog des Hefetransporters dar (Mitsuhashi *et al.*, 2000). Expression von MTABC3 in  $\Delta atm1$  Hefezellen kann den Wildtyp-Wachstumsphänotyp wieder herstellen. MTABC3 konnte mit dem Locus für das Neonatal-metabolische Syndrom, einer Krankheit mit Ursache in der Störung des mitochondrialen Eisenstoffwechsels, in Verbindung gebracht werden (Mitsuhashi *et al.*, 2000). Die Beziehung beider Orthologe zueinander ist unklar. Möglicherweise bilden sie ein Heterodimer oder ihre Expression erfolgt in unterschiedlichen Geweben.

### *Mdl1 und Mdl2*

Der Transporter Mdl1 und sein nächstes Homolog Mdl2 (Multidrug Resistance-Like) wurden wie Atm1 in Hefe-Mitochondrien als Halbseitentransporter identifiziert, wobei die Transmembrandomäne N-terminal von der Nukleotidbindedomäne angeordnet ist (Dean *et al.*, 1994; Young *et al.*, 2001). Mdl1 und Mdl2 zeigen zueinander 46% Sequenzidentität und Homologie zu Ste6 und dem Peptidtransporter TAP in Säugern (Dean *et al.*, 1994). Auch sie sind mit Orientierung der ABC-Domäne zur Matrix in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die Größe der prozessierten Proteine beträgt 70 kDa (Mdl1) und 88 kDa (Mdl2). Mdl1 und Mdl2 bilden zwei voneinander

unabhängige Komplexe, deren natives Molekulargewicht bei 200 kDa bzw. 300 kDa liegt (Young *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *ATM1* führen Disruptionen von *MDL1* und *MDL2* zu keinen größeren Wachstumsdefekten in *S. cerevisiae* (Dean *et al.*, 1994). Während  $\Delta mdl1$ -Zellen einen Wachstumsphänotyp wie Wildtyp-Zellen zeigen, führt die fehlende Expression von Mdl2 zu einem verminderten Wachstum auf Glycerin bei 37°C (Young *et al.*, 2001). Die Disruption beider Gene hat eine leichte Verstärkung dieses Wachstumsdefektes zur Folge (Lill, 2003). Beides deutet auf eine nicht überlappende Funktion der Transporter hin.

### 1.4.3 Physiologische Funktion von Mdl1

Während die physiologische Rolle von Mdl2 bisher nicht geklärt werden konnte, wurde für Mdl1 eine Beteiligung am Peptidexport aus Mitochondrien nachgewiesen (Young *et al.*, 2001). Die Länge der transportierten Peptide ähnelt der Spezifität des TAP-Transporters, dem nächsten Homolog von Mdl1 (Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002). Der mitochondriale Peptidexport in  $\Delta mdl1$ -Zellen konnte durch Überexpression von Mdl1 wieder hergestellt, jedoch nicht weiter erhöht werden (Young *et al.*, 2001).

#### *Mdl1-Homologe in Mitochondrien höherer Eukaryonten*

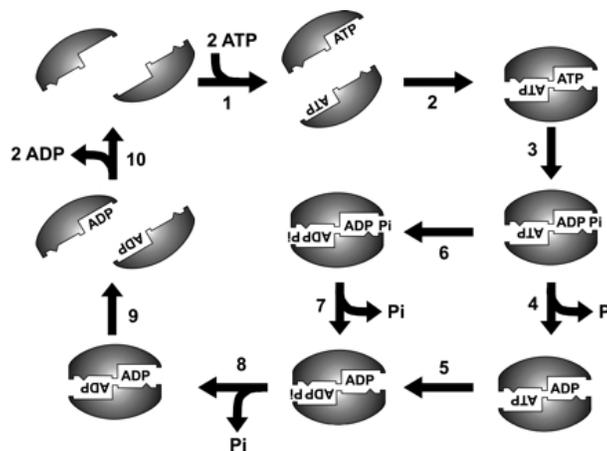
Das menschliche Genom kodiert für vier Halbtransporter mit Homologie zu Mdl1: Die Proteine M-ABC1 und M-ABC2 (ABCB8 und ABCB10) sind mitochondrial lokalisiert (Hogue *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000a), wohingegen ABCB5 nicht weiter charakterisiert wurde und ABCB9 ein lysosomales Homolog darstellt (Lill, 2003; Zhang *et al.*, 2000b). M-ABC1 zeigt 32%, M-ABC2 42% Homologie zu Mdl1. Es ist nicht bekannt, ob beide Proteine homo- oder heterooligomere Komplexe bilden und welche Funktion sie ausüben (Lill, 2003).

Als einziges mitochondriales Homolog von Mdl1 in der Maus wurde ABC-me (mitochondrial erythroid) identifiziert (Shirihai *et al.*, 2000). Die Expression von ABC-me erfolgt überwiegend in den erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks und wird durch den Transkriptionsfaktor GATA-1 induziert. Die Überexpression von ABC-me führt zur erhöhten Hämoglobinbiosynthese in erythroleukemischen Zellen, wohingegen bei physiologischen Häm-Konzentrationen die Menge der für ABC-me kodierenden mRNA vermindert ist. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass ABC-me am Transport von Intermediaten der Hämbiosynthese beteiligt ist (Shirihai *et al.*,

2000). Da die ABC-Domänen des Proteins in der Matrix lokalisiert sind, sollte es sich dabei um einen Exportvorgang handeln. Bisher konnte keines der menschlichen Mdl1-Homologe als Ortholog von ABC-me identifiziert werden und keines der menschlichen Proteine zeigt spezifische Expression in den erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks (Lill, 2003).

#### Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse der ABC-Domänen von Mdl1

Janas *et al.* (2003) konnten die isolierte Nukleotidbindedomäne von Mdl1 nach Expression in *E. coli* reinigen. Mit Hilfe von photoaktivierten Nukleotid-Quervernetzungsexperimenten konnte ein  $K_d = 2 \mu\text{M}$  für MgATP und ein bis zu 30-fach geringerer Wert für andere Nukleotide bestimmt werden. Desweiteren wurde ein  $K_m = 0,6 \text{ mM}$  sowie eine ATP-Hydrolyserate von  $25 \text{ min}^{-1}$  gemessen, wobei keine positive Kooperativität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration vorliegt, wie es für andere Transporter der Fall ist (Janas *et al.*, 2003, Moody *et al.*, 2002). In Bezug auf die Nukleotidbindedomänen wurde ein Hill-Koeffizient von 1,7 ermittelt, was mit der Bildung eines Dimers zur ATP-Hydrolyse interpretiert werden kann (Janas *et al.*, 2003).



**Abb. 2: Modell für den ATP-Hydrolysezyklus der Nukleotidbindedomänen von Mdl1 (Janas *et al.*, 2003)**

Die Bindung von ATP (1) an beide NBD induziert die Ausbildung eines Dimers (2). Nach ATP-Hydrolyse an einer NBD (3) wird entweder ein  $\text{P}_i$  freigesetzt (4), gefolgt von der Hydrolyse des zweiten ATP (5) oder es kommt zunächst zur Hydrolyse des zweiten ATP (6) mit der anschließenden Freisetzung von zwei  $\text{P}_i$  (7; 8). Anschließend erfolgt die Freisetzung von ADP und die Dissoziation des dimeren Komplexes (9; 10). (aus Janas *et al.*, 2003)

Mit dem Einfügen der Mutation E599Q in Mdl1, wodurch ein für die ATP-Hydrolyse wichtiger Glutaminsäurerest durch Glutamin ersetzt wurde (Urbatsch *et al.*, 2000; Sauna *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2002), konnte eine stark verringerte ATPase-Restaktivität gemessen werden ( $0,5 \text{ ATP min}^{-1}$ ). Dies erlaubte die Isolierung eines intermediären NBD-Dimers, das nach Inkubation

bei 30°C sowohl ATP als auch ADP gebunden hat. Daraus lässt sich ein sequentieller Mechanismus für den ATP-Hydrolysezyklus zweier Mdl1-Nukleotidbindedomänen ableiten (Abb. 2).

Eine weitere intermediäre Form der ATP-Hydrolyse konnte mit den Wildtyp-Nukleotidbindedomänen bei Zugabe von MgATP und BeF<sub>x</sub>, einem Phosphatanalogon, isoliert werden, in der 2 ADP-Moleküle enthalten sind (Janas *et al.*, 2003). Das entsprechende Modell (Abb. 2) geht davon aus, dass zunächst jede NBD ATP bindet und es darauf zur Dimerisierung und nacheinander zur ATP-Hydrolyse an den Domänen kommt. Nach Hydrolyse beider ATP-Moleküle wird P<sub>i</sub> freigesetzt, gefolgt von ADP nach dem Auseinanderdissoziieren der Untereinheiten ("processive clamp"-Modell) (Janas *et al.*, 2003).

### *Mdl1-vermittelte Reaktion auf oxidativen Stress*

Chloupková *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Überexpression von Mdl1 den ausgeprägten Phänotyp von  $\Delta atm1$  in Hefe unterdrückt, indem u.a. der Wachstumsdefekt in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Schwermetallen kompensiert wird. Desweiteren kommt es in  $\Delta atm1$  zu einer verminderten Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien, wobei die Expression der durch die zelluläre Eisenkonzentration regulierten Gene beeinflusst wird (Chloupková *et al.*, 2003). Andererseits erhöht sich die Resistenz gegenüber Mangan. Weitere experimentelle Befunde geben Hinweise auf eine Funktion von Mdl1 bei Wachstum unter oxidativen Stressbedingungen. Die Überexpression von Mdl1 in Wildtyp-Zellen führt Mdl1 zu einer verringerten Katalaseaktivität und zu einem verminderten Wachstum in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wohingegen  $\Delta mdl1$ -Zellen erhöhte Resistenz zeigen (Chloupková *et al.*, 2003). In Übereinstimmung dazu ist eine Erhöhung der Katalaseaktivität in  $\Delta mdl1$  zu beobachten. Dagegen zeigt Yap1, der zentrale Regulator der Reaktion auf oxidativen Stress in *S. cerevisiae*, in  $\Delta mdl1$ -Zellen verringerte Expression. Chloupková *et al.* (2003) vermuten, dass bei erhöhter Konzentration von Mdl1 in der inneren Mitochondrienmembran vermehrt Abbauprodukte der m-AAA-Protease aus den Mitochondrien transportiert werden können und damit die Stresstoleranz erhöht wird oder, ähnlich der mitochondrialen Stressantwort in Säugern (Zhao *et al.*, 2002; Butow und Avadhani, 2004), eine Signalfunktion von Mdl1 zwischen Mitochondrien und Nukleus vorliegt. Chloupková *et al.*, 2003 vermuten auch eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Mdl1 und Atm1.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mdl1 ist am Export von Peptiden aus Mitochondrien beteiligt und besitzt möglicherweise eine Funktion bei der Reaktion auf oxidativen Stress. Inwiefern beide Funktionen miteinander zusammenhängen ist jedoch nicht bekannt. Um weiterführende Einblicke in die physiologische Rolle von Mdl1 zu erhalten und die Funktion des Peptidexports näher zu charakterisieren, sollten in der vorliegenden Arbeit Interaktionspartner von Mdl1 in der mitochondrialen Innenmembran identifiziert werden.

- (1) Mdl1 liegt in Gegenwart von ATP als 200 kDa Komplex vor. Deshalb sollte zunächst die Homooligomerisierung des ABC-Transporters in Abhängigkeit von ATP untersucht werden.
- (2) Das Zusammenwirken von Mdl1 und der AAA-Proteasen bei der Generierung und beim Transport von Peptiden lässt eine Interaktion der Proteinkomplexe in möglichen Superkomplexen vermuten. Das Vorliegen solcher Komplexe sollte überprüft werden.
- (3) Die Identifizierung von Mdl1-Interaktionspartnern könnte Hinweise auf die Funktion von Mdl1 liefern und so möglicherweise den Zusammenhang von Peptidexport und der Reaktion auf oxidativen Stress erklären. Deshalb sollte eine Methode und Bedingungen etabliert werden, solche Komplexpartner biochemisch zu isolieren und zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Arbeiten folgten weitgehend den Methoden von Ausubel *et al.*, 1992, Sambrook *et al.*, 1989 und Sambrook *et al.*, 2001.

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse aus *E. coli* Zellen gewonnen. Dazu wurde der entsprechende Stamm in LB Medium nach Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (LB<sup>Amp</sup>) über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

##### *Reinigung im kleinen Maßstab*

Zur Analyse von *E. coli* Klonen nach Transformationsexperimenten wurden 1,5 ml-Kulturen aus Einzelkolonien in entsprechende Reaktionsgefäße überführt und für 1 min bei 1500 g zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, RT). Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl der Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 20 µg/ml RNase A) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 200 µl der Lösung II [200 mM NaOH; 1% (m/v) SDS] zu der Zellsuspension gegeben und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde das so erhaltene Zelllysate durch vorsichtiges Mischen mit 150 µl 3 M Na-Acetat pH 4,8 neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat aus Proteinen und chromosomaler DNA wurde durch Zentrifugieren für 30 s bei 16000 g in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der klare Überstand wurde mit 800 µl Ethanol versetzt, die Plasmid-DNA durch Inkubation bei -20°C für 30 min gefällt und 10 min bei 16000 g in der Tischzentrifuge sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde die DNA 10 min bei 37°C getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um störende RNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurde 1 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und 5 min bei RT geschüttelt. 1 µl der DNA wurde zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

### *Reinigung im großen Maßstab*

Die Gewinnung größerer Mengen DNA erfolgte an einer Anionenaustauschersäule (Jetstar<sup>®</sup>) der Firma Genomed nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Reagenzien. Es wurden 30 ml einer LB<sup>Amp</sup> Übernachtskultur eingesetzt.

## **2.1.2 Amplifizieren von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion**

### *Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988). Durch wiederholte Aufschmelzung des Doppelstranges und Bindung zweier Start-Oligonukleotide (Primer), die dem 5'- und 3'-Ende der Zielsequenz komplementär sind, erfolgt die DNA-Synthese am Matrizenstrang durch hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bzw. *Pfu*-Polymerase aus *Pyranococcus furiosus*).

Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt standardgemäß den vom Hersteller gelieferten 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM), je 50 pmol der entsprechenden Primer, 200-500 ng DNA als Matrize und 3 U Polymerase. Der PCR-Ansatz wurde dann in einem programmierbaren Thermostaten inkubiert. In einem typischen Reaktionsablauf wurde die DNA zunächst durch Inkubation für 3 min bei 95°C denaturiert. Dem folgte eine Reaktionsfolge aus Denaturierung (1 min bei 95°C), Anlagerung der Oligonukleotide (1 min bei 40-50°C) und DNA-Synthese (1 min bei 72°C), die 20-30 mal wiederholt wurde. Das Anfügen kurzer DNA-Sequenzen zur Erzeugung von Gen-Disruptionskassetten oder zum Einfügen zusätzlicher Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen erfolgte unter Verwendung von Hybrid-Oligonukleotiden. Hierzu wurde ein zweistufiger Reaktionsablauf programmiert, bei dem initial 5 Zyklen mit erniedrigter Anlagerungstemperatur durchlaufen wurden, denen 25 Zyklen bei erhöhter Anlagerungstemperatur folgten. Zur Vervollständigung der Polymerasereaktion wurde stets am Ende für 10 min bei 72°C inkubiert. Die Bildung amplifizierter DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und für weitere Klonierungsschritte Salze und Oligonukleotide unter Verwendung von Qiaquick<sup>®</sup>-Reinigungssäulen (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers entfernt.

### *Einfügen von Mutationen in Plasmid-DNA*

Zum gezielten Einfügen einer Punktmutation in ein Gen, das auf einem Plasmid kloniert vorliegt, wurde eine veränderte PCR-Strategie genutzt (QuickChange<sup>®</sup>, Stratagene). Die Plasmid-DNA diente hierzu als Matrizenstrang. Zwei komplementäre initiale Oligonukleotide (Primer), an denen die weitere Synthese eines DNA-Stranges verläuft, wurden so gewählt, dass sie die entsprechende Mutation tragen und zu beiden Seiten 18 Basen der entsprechenden Sequenz des Matrizenstranges abdecken. Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 10 ng Plasmid-DNA, 125 ng jedes Primers, 0,2 mM dNTPs und 3 U Polymerase in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Der Reaktionsablauf begann mit 5 min bei 95°C und wurde mit 18 Zyklen von je 50 s bei 95°C, 50 s bei 60°C und 14 min bei 68°C fortgesetzt. Abschließend wurde 7 min bei 68°C inkubiert. Die Matrizen DNA wurde nachfolgend durch Zugabe des Restriktionsenzym *DpnI* aufgrund ihrer bestehenden Methylierung abgebaut (2 h, 37°C). Nach einer Ethanol-Fällung (2.1.1.) wurde die DNA in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (2.1.6.).

### **2.1.3 Bestimmung von DNA-Konzentrationen**

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in Wasser bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Bestimmung kleinerer DNA-Mengen (PCR-Produkte) erfolgte visuell auf einem Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid durch Vergleich mit der Intensität einer aufgetragenen Probe bekannter Konzentration (z.B. DNA-Längenstandard).

### **2.1.4 Größenauftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese**

Die Größenbestimmung und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung 1%iger Gele (m/v) wurde eine entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetate pH 7,5; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgekocht und auf ~60°C abgekühlt. Zur späteren Detektion der DNA unter UV-Licht wurde vor dem Gießen der Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die zu analysierende DNA wurde mit Probenpuffer [2 mM EDTA pH 8,0; 4% (m/v) Saccharose; 0,025% (m/v) Brom-

phenolblau] versetzt und nach dem Auftragen auf das Gel standardmäßig bei 15 V/cm in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten bestimmter Größe wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA nach Aufnahme in Gelextraktionslösung (Qiagen) an einer Qiaquick<sup>®</sup>-Reinigungssäule (2.1.2.), wie vom Hersteller beschrieben, gereinigt.

### 2.1.5 Enzymatische Modifikation von DNA

#### *Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen*

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer (New England Biolabs). Hierbei wurde 1 µg zirkuläre DNA mit 1 U Restriktionsenzym für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Schneiden der Enden von DNA Fragmenten aus PCR-Reaktionen erfolgte für mindestens 3 h.

#### *Ligation von DNA-Fragmenten*

Um die nach Restriktionspaltung erhaltenen DNA-Fragmente in einen ebenfalls geschnittenen Vektor einzufügen, wurde DNA-Ligase des Phagen T4 eingesetzt. Hierzu wurden 50-200 ng des linearisierten Vektors und der zwei- bis fünffache molare Überschuss des Fragmentes in 20 µl mit 1 U des Enzyms (New England Biolabs) in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer [50 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 5% (m/v) PEG-8000] über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 2.1.6 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

#### *Präparation transformationskompetenter E. coli Zellen zur Elektroporation*

Ausgehend von einer *E. coli*-Vorkultur in LB-Medium wurde 1 l des gleichen Mediums angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C inkubiert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4400 g; 5 min; 2°C) sedimentiert und mit 500 ml, 250 ml und schließlich mit 50 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden in 500 µl 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert und 50 µl-Aliquote bei -80°C aufbewahrt.

### Elektroporation

Kompetente *E. coli*-Zellen (50-100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes (2.1.5) bzw. 1 ng Plasmid-DNA für Retransformationen vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde kurz auf Eis inkubiert, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und am Elektroporationsgerät (Biorad) einem elektrischen Puls (1,8 kV; 3,6 ms) ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz sofort in 1 ml SOC-Medium [2% (m/v) Trypton; 0,5% (m/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Glucose] gemischt und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurde kurz bei 16000 g zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl SOC Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde auf einer LB<sup>Amp</sup>-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.1.7 Klonierungsstrategie und genomische Manipulation

### Erzeugung des Plasmids pYX113-GAL1-*mdl1*<sup>6His</sup>

Das Plasmid pYX113-GAL1-*mdl1*<sup>6His</sup> wurde aus dem Plasmid pYX113-GAL1-*MDL1* erzeugt. Letzteres diente als Matrize für eine PCR unter Verwendung der Primer-Oligonukleotide TL457 und TL594. Dazu wurde ein DNA Fragment amplifiziert, das für den C-terminalen Bereich von Mdl1 kodiert. Der Primer TL594 enthielt eine 5'-terminale Erweiterung, die für 6 Histidine kodiert, gefolgt von einer Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Sall (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Verwendete Primer zur Klonierung des Plasmids pYX113-GAL1-*mdl1*<sup>6His</sup>  
Die Sequenz für die Sall-Schnittstelle ist unterstrichen. Die 6His-Codon-Sequenz ist fettgedruckt.

Primer	Sequenz
TL457	5'-GGA ACA AGC ATG ATT C-3'
TL594	5'-GAG <u>AGT CGA CTT</u> AGT <b>GAT GGT GAT GGT GAT GTA</b> CTT CCC GGG CAA CAC TAT TGT CC-3'

Der Primer TL457 ist einem Sequenzbereich innerhalb des *MDL1*-Gens komplementär, dem eine BamHI-Schnittstelle folgt. Die so gewonnene DNA wurde mit den Enzymen Sall und BamHI geschnitten und das Produkt mit einer Größe von 775 Basenpaaren nach einer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel isoliert (2.1.4.). Nach einer Zwischenklonierung in den mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pBluescript (Stratagene), wurde das Genfragment mit dem

Sall- und BamHI- geschnittenen Plasmid pYX113-GAL1-*mdl1* ligiert und die für den C-Terminus kodierende Sequenz von *MDL1* um sechs für His kodierende Basentriplets erweitert.

### 2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des „ABI PRISM<sup>®</sup> dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“-Kits der Firma Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.1.9 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Der Vektor pBluescript wurde zur Zwischenklonierung eingesetzt, um ein zuverlässiges Schneiden der Restriktionsendonuklaesen zu gewährleisten. Die Plasmide pYX113-GAL1-*MDL1* und pYX113-GAL1-*mdl1*<sup>6His</sup> sind Derivate des Zentromer tragenden Plasmids pYX113 (Novagen), das die Überexpression eines Proteins unter dem Galaktose-Promotor (*GAL1*) in *S. cerevisiae* erlaubt. Desweiteren ist der Auxotrophiemarker *URA3* auf dem Plasmid kodiert. Das Plasmid pGEM4-Kozak-*MDL1* ist ein Derivat von pGEM4-*MDL1* (Young *et al.*, 2001) in dem zusätzlich eine Kozak-Konsensussequenz eingeführt wurde, um eine effizientere Translation zu erzielen. Der Vektor pGEM4 (Promega) enthält den SP6-RNA-Polymerase-Promotor. Dieser ermöglichte die *in vitro* Transkription des *MDL1*-Gens.

**Tabelle 2:** Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Referenz
pBluescript	Stratagene
pSBB13	AG Langer
pGEM4-Kozak- <i>MDL1</i>	J. Seeger, Diplomarbeit 2003
pYX113-GAL1- <i>MDL1</i>	Young <i>et al.</i> , 2001
pYX113-GAL1- <i>mdl1</i> <sup>6His</sup>	diese Arbeit
pAG60	Euroscarf (Goldstein <i>et al.</i> , 1999)

### 2.1.10 Verwendete *E. coli*-Stämme

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm XL1-blue (Stratagene) verwendet [*supE44* *hsdR17*( $r_K^- m_K^+$ ) *recA1* *endA1* *gyrA96*(Nal<sup>r</sup>) *thi* *relA1* *lac-F'* *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>* *lacI<sup>q</sup>*  $\Delta$ (*lacZ*)M15 Tn (*tetr*)].

## 2.2 Methoden der Hefegenetik

### 2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde standardmäßig bei 30°C kultiviert. Die Medien enthielten 2% (m/v) Glucose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle und gegebenenfalls zusätzlich 0,5% (v/v) Laktat. Zur Erhaltung der respiratorischen Kompetenz wurde, wenn nötig, Laktatmedium verwendet. Die Selektion mittels Auxotrophiemarker erfolgte durch Kultivierung auf SC-Selektivmedium.

Hefezellen aus einer Glycerin-Dauerkultur wurden auf einer YP-Agarplatte [1,5% Agar (m/v)] ausgestrichen und 1-2 Tage im Brutschrank inkubiert. Davon wurde eine 10 ml Flüssigkultur angeimpft und bei 160 U/min geschüttelt. Über mehrere Tage wurde die Kultur so verdünnt, dass die stationäre Phase nicht erreicht wurde und schließlich bei einer OD<sub>600</sub>=1-2 geerntet. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden nach 2-3 Tagen Inkubation Hefezellen von einer Agarplatte mit einer Impföse in 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Transformation von *S.cerevisiae*

#### *Herstellung transformationskompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat*

Aus einer Vorkultur (10 ml, 30°C, über Nacht) wurden 50 ml YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub>=0,2 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub>~0,7 bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 g (RT) in sterilen Behältern sedimentiert (Heraeus Biofuge Stratos) und in 25 ml sterilem Wasser aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 30 s bei 16000 g zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Die Resuspension erfolgte in 400 µl 100 mM Lithiumacetat. Davon wurden 50 µl in einem Transformationsansatz eingesetzt.

### *Transformation Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen*

50 µl Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 g und RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Der Ansatz wurde mit 240 µl 50% (m/v) Polyethylenglykol (PEG 3350), 36 µl 1 M Lithiumacetat und 25 µl einzelsträngiger Heringsspermien-DNA (2 mg/ml), die zuvor durch Erhitzen (5 min, 95°C) und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert wurde, überschichtet. Nach Zugabe von 1-10 µg der zu transformierenden DNA in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O wurde der Transformationsansatz etwa 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C und dann 20 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden 30 s bei 16000 g (RT) sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge), in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf SC-Platten für die Selektion auf den entsprechenden Auxotrophiemarker ausgestrichen (Gietz *et al.*, 1992).

### **2.2.3 Herstellung mutanter Hefestämme**

#### *Genomische Manipulation von S. cerevisiae*

Das Einfügen einer 6His-kodierenden Sequenz in das Genom des Wildtyp-Stammes W303-1A bzw. die Disruption von *ATP10* erfolgte durch homologe Rekombination mit einer Genkassette, die zusätzlich den Auxotrophiemarker *URA3* enthielten. Die Kassetten wurden mit den Hybrid-Primern TL592/593 und dem Plasmid pSBB13 als Matrize zum Anfügen der 6His-Sequenz bzw. TL1731/1732 und pAG60 zur Disruption von *ATP10* in zwei PCR-Schritten (2.1.2) amplifiziert.

Die 3'-Enden der Oligonukleotide wurden entsprechend der Sequenz des Matrizenstranges gewählt (vgl. Tab. 3, unterstrichene Bereiche). Die 5'-Enden der Oligonukleotide enthielten Sequenzen (45-50 bp), die komplementär zu den genomischen Zielsequenzen waren, zwischen denen die Integration der Kassette erfolgen sollte. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (Qiaquick<sup>®</sup>-Reinigungssäulen, Qiagen) und die gesamte DNA zur Transformation Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen eingesetzt (2.2.2).

**Tabelle 3:** Verwendete Primer zur Erzeugung der Rekombinationskassetten aus pSBB13-His6-*URA3* (TL592/593) und pAG60 (TL1731/1732). Die unterstrichenen Sequenzen binden an die jeweilige Plasmid-Matrize. Die überhängenden 5'-Sequenzabschnitte ermöglichen die homologe Rekombination mit der für den C-Terminus von *Mdl1* kodierenden Sequenz (TL592) und einer Sequenz 91 bp stromabwärts von *MDL1* (TL593) bzw. mit *ATP10* eingrenzenden Sequenzbereichen (TL1731/1732).

Primer	Sequenz
TL592	5'-GAA AAG GGG GAG TGA TAG ATT TGG ACA ATA GTG TTG CCC GGG AAG TAC <u>ATC ACC ATC ACC ATC AC</u> -3'
TL593	5'-GTG TAA ATT ACA TTG GGC ATC ATT TAA ATT ATA GAA TAC ACA ATT TCG <u>TGC CAA GCT TTT TCT TTC C</u> -3'
TL1731	5'-CAG GTT ATT TGT TTA TTT GCG ATA TCA GAG TAA CTT AAA CTA ACT <u>CGT ACG CTG CAG GTC GAC</u> -3'
TL1732	5'-GAC ATT ATT GCA AAA GAG CTC TTC CCT GAC GGA AAA TGG CCA TTG GAA <u>ATC GAT GAA TTC GAG CTC G</u> -3'

## 2.2.4 Nachweis homologer Rekombination in *S. cerevisiae*

Die Integration einer Kasette durch homologe Rekombination zur Manipulation einer genomischen Zielsequenz wurde zunächst mittels PCR (2.1.2) überprüft (Wach *et al.*, 1994). Hierzu wurden zwei Oligonukleotide als Primer gewählt, die komplementär zu einer Sequenz innerhalb der Kasette bzw. einem angrenzenden genomischen Bereich (hier das *MDL1*-Gen) waren, wodurch sie ein PCR-Produkt definierter Größe erzeugen sollten. Insertion der Kasette an einem falschen Lokus führte somit zu keinem PCR-Produkt.

**Tabelle 4:** Verwendete Primer zum Nachweis der Integration der Genkasette aus pSBB13-His6-*URA3* direkt an das *MDL1*-Gen anschließend (TL627/628) bzw. der Disruption von *ATP10* mit der pAG60-Kasette (TL1734/1735).

Primer	Sequenz
TL627	5'-GTG ATG GTG ATG GTG ATG TAC-3'
TL628	5'-AGT TTC ATG ATG TAT GCC GTG-3'
TL1734	5'-CAC AAA GCG TCA ACT TCA CAG-3'
TL1735	5'-GCT GAT ATT GGT AAT ACC G-3'

## 2.2.5 Erzeugung von $\rho^0$ -Stämmen von *S. cerevisiae*

Um den Verlust mitochondrialer DNA in Hefestämmen zu induzieren ( $\rho^0$ -Stämme), wurde eine 5 ml Kultur [SC-Medium mit 2% Glucose (m/v)] über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am Morgen wurde in 10 ml auf  $OD_{600}=0,05$  verdünnt und dem Medium 25  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid zugefügt (Goldring

*et al.*, 1970). Die Kultur wurde weitere 10 h bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 3000 g, RT) sedimentiert sowie der Überstand verworfen. Im verbleibenden Rest des Mediums wurden die Zellen resuspendiert, auf einer Agarplatte (SC-Medium, Glucose) ausgestrichen und mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Nahezu alle Zellen sollten dann ihre mitochondriale DNA verloren haben und sind an der Ausbildung sehr kleiner Kolonien zu erkennen (*petite*-Kolonien).

## 2.2.6 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

**Tabelle 5:** Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>	Rothstein und Sherman, 1980
$\Delta mdl1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i>	Young <i>et al.</i> , 2001
$\Delta mdl2$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl2::HIS3</i>	Young <i>et al.</i> , 2001
$\Delta yta10$ (YHA101)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; yta10::URA3</i>	Arlt <i>et al.</i> , 1998
$\Delta yta12$ (YHA201)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; yta12::HIS3</i>	Steglich <i>et al.</i> , 1999
$yta10^{E559Q} yta12^{E614Q}$ (YHA302)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; yta10::URA3; yta12::HIS3; Ycplac22-ADH1-yta12<sup>E559Q</sup> (TRP1); Ycplac111-ADH1-yta12<sup>E614Q</sup> (LEU2)</i>	Arlt <i>et al.</i> , 1998
$\Delta atp10$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; atp10::LEU2</i>	Ackerman und Tzagoloff, 1990b
$\Delta atp10$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; atp10::URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta atp12$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; atp12::LEU2</i>	Bowman <i>et al.</i> , 1991
$\Delta mdl1$ (YIA29)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i>	I. Arnold
$\Delta yme1$ (YIA30)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; yme1::KAN</i>	I. Arnold
$\Delta atp10 \Delta mdl1$	YIA29: <i>atp10::URA3</i>	diese Arbeit, (erzeugt aus YIA29)
$\Delta atp10 \Delta yme1$	YIA30: <i>atp10::URA3</i>	diese Arbeit, (erzeugt aus YIA30)
$\Delta yme1 \Delta mdl1$ (YIA31)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; yme1::KAN; mdl1::HIS3</i>	I. Arnold
$\Delta atp10 \Delta mdl1 \Delta yme1$	YIA31: <i>atp10::URA3</i>	diese Arbeit, (erzeugt aus YIA31)
$\Delta sug$ ( $\Delta atp20$ )	<i>MATa his3-1 leu2 met15 ura3; atp20::KAN</i> (in BY4741)	Euroscarf

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Δtim11 (Δatp21)</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; tim11::HIS3</i>	Arnold <i>et al.</i> , 1998
Mdl1-ADH1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> YCplac111-ADH1-MDL1 (LEU2)	Young <i>et al.</i> , 2001
<i>mdl1<sup>G467V</sup></i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> YCplac111-ADH1- <i>mdl1<sup>G467V</sup></i> (LEU2)	Young <i>et al.</i> , 2001
<i>mdl1<sup>D598A</sup></i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> YCplac111-ADH1- <i>mdl1<sup>D598A</sup></i> (LEU2)	Young <i>et al.</i> , 2001
<i>mdl1<sup>S575N</sup></i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> YCplac111-ADH1- <i>mdl1<sup>S575N</sup></i> (LEU2)	Young <i>et al.</i> , 2001
<i>mdl1<sup>E599Q</sup></i> (YDG5)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> YCplac111-ADH1- <i>mdl1<sup>E599Q</sup></i> (LEU2)	diese Arbeit
Mdl1-GAL1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> pYX113-GAL1-MDL1 (LEU2)	Young <i>et al.</i> , 2001
Mdl1-TPI (YIA63)	pYX232-TPI-MDL1; (TRP1; 2μ)	I. Arnold
pYX232 (YIA73)	pYX232-TPI (TRP1; 2μ)	I. Arnold
YDG1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> pYX113-GAL1- <i>mdl1<sup>6His</sup></i> (URA3)	diese Arbeit
YDG2	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100;</i> <i>mdl1<sup>6His</sup>URA3</i>	diese Arbeit
YDG3	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100; mdl1::HIS3</i> pYX113-GAL1- <i>mdl1<sup>6His</sup></i> (LEU2) ρ <sup>0</sup>	diese Arbeit

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), bei der ein Farbumschlag bei 595 nm photometrisch gemessen wird. Hierzu wurden die Proben mit 1 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung versetzt (Protein-Assay, Biorad) und 5 min bei RT inkubiert. Als Proteinstandard wurde eine IgG-Lösung bekannter Konzentration verwendet. Aus der Extinktion verschiedener Verdünnungen (2,5 μg- 40 μg IgG) wurde eine Standardgerade erstellt und aus dieser die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

### 2.3.2 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure [12% (m/v) Endkonzentration] mindestens 60 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde 20 min bei 30000 g und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos) und zweimal mit kaltem Aceton (-20°C) gewaschen. Die Proben wurden schließlich 10 min bei RT getrocknet, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel mindestens 10 min geschüttelt (1400 U/min).

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenauftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen mit SDS erfolgte durch vertikale Elektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid Gelsystem (Laemmli, 1970). Die Gele hatten ein Abmessungen von 140 x 110 x 1 mm. Kleine Gele wurden ohne Bodengel gegossen (Mini-Protean 3, Biorad). Um die Auflösung im Trenngel dem Molekulargewicht der untersuchten Proteine anzupassen, wurden unterschiedliche Endkonzentrationen von Acrylamid bzw. Bisacrylamid eingesetzt:

Bodengel:	20% (m/v) Acrylamid; 0,13% (m/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,25% (m/v) APS; 0,25% (v/v) TEMED
Trenngel:	12-16% (m/v) Acrylamid; 0,08-0,3% (m/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,1% (m/v) APS; 0,03% (v/v) TEMED
Sammelgel:	5% (m/v) Acrylamid; 0,03% (m/v) Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,05% (m/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
Elektrophoresepuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,3; 380 mM Glycin; 0,1% (m/v) SDS
1xProbenpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,8; 1% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 2% (m/v) SDS; 0,01% (m/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin

### 2.3.4 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau G250

SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst für 1 h in 40% (v/v) Methanol mit 7% (v/v) Essigsäure fixiert. Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteine erfolgte eine Inkubation über Nacht in einer kolloidalen Lösung von CBB G250 [0,08% (m/v) Coomassie Blau G250; 1,6% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 8% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20% (v/v) Methanol]. Anschließend wurde durch Waschen in destilliertem

Wasser entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Aufbewahrung wurde das Gel kurz in 5% (v/v) Glycerin inkubiert und zwischen Cellophan-Folie (Biorad) getrocknet.

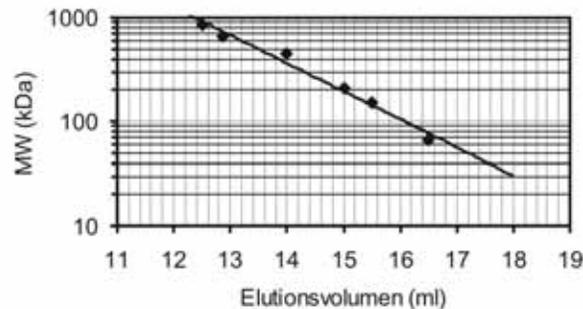
### 2.3.5 Transfer von Proteinen auf Membranen

Um Proteine nach der Elektrophorese dem immunologischen Nachweis zugänglich zu machen, wurden sie auf eine Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979; Kyhse-Andersen, 1984). Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden auf eine Nitrozellulosemembranen fixiert. Für Nativgele fanden PVDF-Membranen (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ ) Verwendung. Es wurden 4 Whatman-3MM-Filterpapiere und die Membran mit Blotpuffer getränkt [0,02% (m/v) SDS; 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol]. PVDF-Membranen wurden vor dem Äquilibrieren in Blotpuffer mit Methanol benetzt. Nacheinander wurden zwei Filterpapiere, die Membran und das Gel, sowie zwei weitere Lagen Filterpapier auf der Anode luftblasenfrei angeordnet und die Blotkammer mit der Kathode verschlossen. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 200 mA. Zum Sichtbarmachen von Proteinen wurden die Nitrozellulosemembranen mit entsalztem Wasser gewaschen, kurz in Ponceau S-Färbelösung [0,2% (m/v) Ponceau S in 3% (m/v) TCA] gegeben und erneut gewaschen.

### 2.3.6 Gelfiltration

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts und die Analyse von Proteinkomplexen erfolgte mittels Gelfiltration. Dazu wurden isolierte Mitochondrien (600  $\mu\text{g}$ ) in 120  $\mu\text{l}$  Lysepuffer [0,2% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat; 1 mM PMSF und gegebenenfalls 1 mM ATP] 15 min unter Schütteln (1400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Das Abtrennen von nicht lysiertem Material sowie Proteinaggregaten erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 90000 g und 4°C (Beckman Ultrazentrifuge Optima). Der Überstand wurde dann auf eine mit Laufpuffer [0,05% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat und gegebenenfalls 1 mM ATP] äquilibrierten Superose 6-Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) geladen. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 0,3 ml/min. Es wurden Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt und diese nach einer TCA-Fällung (2.3.2) mittels SDS-PAGE (2.3.3) und Western-Blot (2.5.3) analysiert. Die Menge an Protein wurde densitometrisch quantifiziert (Image Station, Kodak) und auf die gesamte eluierte Menge normiert. Die

Größenbestimmung von Proteinkomplexen erfolgte relativ zu den Markerproteinen Hsp60 (840 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Cytochrom  $b_2$  (212 kDa), Alkoholdehydrogenase, (150 kDa) und BSA (66 kDa) (Abb. 3).



**Abb. 3: Kalibrierung einer Superose 6-Gelfiltrationssäule**

Bestimmung der Elutionsvolumina verschiedener Markerproteine: Hsp60 (840 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Cytochrom  $b_2$  (212 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa).

### 2.3.7 Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Blaue Polyacrylamid-Nativgelelektrophorese (Schägger und Jagow, 1991; Schägger, 2001) diente der Analyse mitochondrialer Membranproteinkomplexe. Diese erhalten durch den Farbstoff Coomassie Blau G250 eine negative Nettoladung, was sie zur Migration im elektrischen Feld befähigt. Die Größenauftrennung erfolgt mittels eines Gradientengels. Es wurden standardmäßig Trenngele mit einem Gradienten von 3%-13% Polyacrylamid [3-13% (m/v) Acrylamid; 0,09-0,4% (m/v) Bisacrylamid; 0-20% (m/v) Glycerin; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 0,1% (m/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED] mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen und mit dem Sammelgel überschichtet [3% (m/v) Acrylamid; 0,09% (m/v) Bisacrylamid; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 0,1% (m/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED]. Die Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean 3-Gelkammer (Kathodenpuffer: 50 mM Tricin; 7,5 mM Imidazol pH 7,0; 0,02% (m/v) Serva Blau G; Anodenpuffer: 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0).

Zur Probenvorbereitung wurden isolierte Mitochondrien (100  $\mu$ g) zunächst mit einem geeigneten Detergenz (1 g Detergenz/g Protein) in 20  $\mu$ l Solubilisierungspuffer (50 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 50 mM NaCl; 5 mM 6-Aminocapronsäure) 15 min unter Schütteln bei 1400 U/min und 4°C lysiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 90000 g und 4°C (Beckman Ultrazentrifuge Optima) wurde der Überstand mit 5% (v/v) Glycerin und 1  $\mu$ l Probenpuffer versetzt

[5% (m/v) Coomassie Blau G250 Suspension in 500 mM 6-Aminocapronsäure] und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 100 V (maximal 15 mA) und 4°C durchgeführt. Nach etwa einem Drittel des Gellaufs wurde der Kathodenpuffer gegen einen Puffer gleicher Zusammensetzung, jedoch mit 0,002% Farbstoff, ausgetauscht und die Spannung auf 500 V (maximal 15 mA) erhöht. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteine für 2 h bei 200 mA auf eine PVDF-Membran übertragen (2.3.4). Die Proteine Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) dienten als Größenstandards.

### **2.3.8 Analyse von Proteinkomplexen durch Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation**

Die Auftrennung von Proteinkomplexen im Bereich von 200 kDa bis 2 MDa erfolgte nach Tatsuta *et al.* (2004) durch Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten von 10-30% Glycerin.

Zur Ausbildung des Gradienten wurden 2 ml Analysenpuffer [0,05% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat und gegebenenfalls 1 mM ATP und 30% (v/v) Glycerin] mit 2 ml Puffer gleicher Zusammensetzung jedoch nur 10% Glycerin in einem 5ml Zentrifugationsröhrchen (Beckman) überschichtet. Dann wurde das Röhrchen verschlossen, in waagerechte Lage gebracht und für 4,5 h bei 4°C zur Gradientendiffusion belassen. 30 min vor dem Lauf wurde es dann wieder vorsichtig in vertikale Position gebracht. Zur Probenvorbereitung wurden 450 µg Mitochondrien in 90 µl Lysepuffer [0,2% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat; 1 mM PMSF, 10 % (v/v) Glycerin und gegebenenfalls 1 mM ATP] 15 min unter Schütteln (1400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Das Abtrennen von nicht lysiertem Material sowie Proteinaggregaten erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 90000 g und 4°C (Beckman Ultrazentrifuge Optima). Der Überstand wurde dann vorsichtig auf die Oberfläche des Dichtegradienten geladen. Ein typischer Lauf zur Auftrennung im genannten Bereich wurde für 5 h bei 4°C und 50000 U/min (Beckman Ultrazentrifuge Optima, Ausschwingrotor MLS50) durchgeführt. Anschließend erfolgte sofort die Fraktionierung. Dazu wurden Fraktionen zu 400 µl (Fraktion 1: 480 µl) vorsichtig von der Oberfläche abgenommen und mit 80 µl (Fraktion 1: 100 µl) 72 %iger (m/v) TCA gefällt (2.3.2). Mittels SDS-PAGE (2.3.3) und Western-Blot (2.5.3) wurde das zu untersuchend Protein detektiert, densitometrisch quantifiziert (Image Station, Kodak) und auf die gesamte eluierte Menge normiert. Die Größenbestimmung von

Proteinkomplexen erfolgte relativ zu den Markerproteinen Hsp60 (840 kDa), F<sub>1</sub>α (650 kDa), Cytochrom *b*<sub>2</sub> (212 kDa).

### 2.3.9 Affinitätsreinigung von Mdl1

#### *Binden von Mdl1<sup>His</sup> an eine Nickel-Chelatsäule*

Zur Reinigung des Mdl1-Komplexes unter nativen Bedingungen, wurde des Protein mit einer sechs Histidine umfassenden Peptidsequenz am Carboxy-Terminus (Mdl1<sup>His</sup>) im Hefestamm YDG1 (2.2.6) zur Überexpression gebracht und standardmäßig Mitochondrien isoliert (2.4.4). Die Anreicherung des Proteins erfolgte an einer 1 ml HiTrap Chelating HP<sup>®</sup>-Säule (Amersham Biosciences), die nach Angaben des Herstellers zuvor mit 0,5 ml einer 0,1 M NiSO<sub>4</sub>-Lösung beladen sowie mit H<sub>2</sub>O und Laufpuffer [0,05% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat und 25 mM Imidazol/HCl pH 7,4] gewaschen und äquilibriert wurde. Mitochondrien wurden mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in Lysepuffer [0,2% (m/v) Triton X-100; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM K-Acetat pH 7,4; 4 mM Mg-Acetat; 1 mM PMSF; Proteaseinhibitor (Boehringer) nach Angaben des Herstellers] solubilisiert und 30 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge Optima, 90000 g, 4°C). Nach Zugabe von Imidazol/HCl pH 7,4 (Endkonzentration 25 mM) wurde der mitochondriale Extrakt mit dem doppelten Volumen Laufpuffer auf die Säule geladen (0,1 ml/min) und diese im Anschluss mit 4 ml des gleichen Puffers gewaschen (0,4 ml/min). Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch Laufpuffer mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 25-500 mM Imidazol/HCl pH 7,4. Die Fraktionen (500 µl) wurden auf eine maximale Imidazolkonzentration von 100 mM verdünnt, mit TCA [12% (m/v) Endkonzentration] (2.3.2) gefällt und nach einer SDS-PAGE (2.3.3) durch Färbung mit Coomassie-Blau (2.3.4) bzw. nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.5) mittels Western-Blot (2.5.3) analysiert.

#### *Binden von Mdl1<sup>His</sup> an Ni-NTA-Agarose-Partikeln*

Die Isolierung des Mdl1-Komplexes im kleinen Maßstab erfolgte durch Binden von Mdl1<sup>His</sup> an Ni-NTA-Agarose-Partikeln (Quiagen) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen ("Batch"-Verfahren). Der Hefestamm YDG1 (2.2.6) diente zur Überexpression einer mit einem Hexahistidin-Peptid am

Carboxyterminus versehenen Variante des Proteins, während die Expression unter dem endogenen Promoter im Stamm *mdl1*<sup>6His</sup> (YDG2) erfolgte (2.2.6).

Ni-NTA-Agarose-Partikel (100 µl Suspension) wurden 30 s bei 16000 g und 4°C (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde dreimal mit 500 µl Puffer H [20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 200 mM KCl; 4 mM Mg-Acetat; 10% (v/v) Glycerin] mit 0,05% (m/v) Triton X-100 und gegebenenfalls 1 mM ATP gewaschen. Mitochondrien (500 µg) wurden mit 100 µl Lysepuffer [Puffer H mit 0,2% (m/v) Triton X-100; 1 mM PMSF und gegebenenfalls 1 mM ATP] unter Schütteln bei 1400 U/min in Lösung gebracht und 30 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge Optima, 90000 g, 4°C), im gleichen Puffer ohne Detergenz 1:5 verdünnt und mit der äquilibrierten Ni-NTA-Agarose gemischt. Die Proben wurden 2 h im Überkopf-Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Agarosepartikel durch Zentrifugation (30 s bei 16000 g, 4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert und zweimal mit 500 µl Puffer H mit 0,05% (m/v) Triton X-100 und gegebenenfalls 1 mM ATP sowie einmal mit gleichem Puffer und 10 mM Imidazol/HCl pH 7,4 gewaschen. Zur Elution des gebundenen Proteins wurden dem Puffer 100 mM Imidazol pH 7,4 zugesetzt. Die Fraktionen wurden mit TCA [12% (m/v) Endkonzentration] (2.3.2) gefällt, nach einer SDS-PAGE (2.3.3) sowie dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.5) mittels Western-Blot (2.5.3) analysiert und densitometrisch (Image Station, Kodak) quantifiziert. Radioaktiv markiertes Protein wurde durch Exposition von Phosphoreszenzplatten (Phosphorimager, Fuji) detektiert.

#### *Binden von Mdl1 an ADP- und ATP-Agarose-Partikeln*

Die Untersuchung des Nukleotidbindevermögens von Mdl1-Varianten erfolgte an ADP- und ATP-Agarose-Partikeln (Sigma) im "Batch"-Verfahren. Je Ansatz wurden 10 mg der Nukleotid-Agarose mit 400 µl H<sub>2</sub>O inkubiert (4°C, Überkopf-Schüttler). Die Agarose-Partikel wurden 1 min bei 16000 g sedimentiert und dreimal mit Lysepuffer [20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 200 mM KCl; 4 mM Mg-Acetat; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF; 0,2% (v/v) Triton X-100] gewaschen. 600 µg Mitochondrien wurden in 120 µl Lysepuffer 15 min unter Schütteln (1400 U/min) bei 4°C solubiliert und 30 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge Optima, 90000 g, 4°C). 100 µl Extrakt wurden auf die Agarose gegeben und 1 h unter Schütteln (800 U/min) inkubiert. Der Überstand wurde abgetrennt und die Agarose-Matrix mit Lysepuffer [0,05% (v/v) Triton X-100] viermal gewaschen. Die Elution erfolgte unter Zugabe von 10 mM ADP/ATP und anschließend mit SDS-Probenpuffer.

### 2.3.10 Identifizierung von Proteinen mittels MS nach Auftrennung durch SDS-PAGE

Die Identifizierung von Proteinen als Komplexpartner erfolgte durch Auftrennung des Komplexes durch SDS-PAGE (2.3.3) und anschließender Coomassie-Färbung (2.3.4). Das Gel wurde getrocknet, die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten und zur Sequenzierung im Service-labor für Bioanalytik (Zentrum für Molekulare Medizin, Köln) eingereicht. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels "Peptide Mass Fingerprint" (PMF). Dazu wurden aus dem Protein durch Trypsinspaltung Peptide erzeugt und deren Massen durch MALDI-TOF Massenspektrometrie (Bruker MALDI-Reflex IV) bestimmt. In einer Datenbanksuche (MASCOT) wurden diese mit den zu erwartenden Massen der einzelnen Einträge verglichen. Übereinstimmungen wurden von der Suchmaschine statistisch bewertet und ermöglichten die Identifizierung der Proteine mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit.

### 2.3.11 Synthese von radioaktiv markiertem Vorstufenprotein *in vitro*

Mitochondriales Vorstufenprotein, das in isolierte Mitochondrien importiert werden sollte, wurde *in vitro* synthetisiert und dabei mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Dazu wurde zunächst die entsprechende mRNA aus der unter dem SP6-Promotor klonierten cDNA hergestellt und anschließend in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin in Retikulozytenlysat aus Kaninchen translatiert.

#### *Transkription*

Die *in vitro* Synthese von mRNA wurde modifiziert nach der von Melton *et al.* (1984) beschriebenen Methode durchgeführt (Stueber *et al.*, 1984). Ein Standardansatz für eine *in vitro*-Transkription enthielt 120 µl Transkriptionspuffer (40 mM HEPES/KOH pH 7,4; 6 mM Magnesiumacetat; 2 mM Spermidin; 100 µg/ml BSA; 10 mM DTT; 100 µM GTP; je 500 µM ATP, CTP, UTP), 10 µl 2,5 mM 7-Methylguanositriphosphat [<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G], 4,5 µl RNase-Inhibitor (RNasin) (40 U/µl) und 20 µg Plasmid-DNA. Nach Zugabe von 1,5 µl SP6-RNA-Polymerase (25 U/µl) wurde der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 10 M LiCl mit 600 µl kaltem Ethanol (96%) wurde die RNA für 30 min bei -80°C gefällt und anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 30000 g und 4°C sedimentiert (Heraeus Biofuge Stratos). Anschließend wurde mit 600 µl kaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei

30000 g wurde der Überstand gründlich entfernt, die RNA bei 30°C vorsichtig getrocknet und schließlich in 50 µl sterilem Wasser mit 1 µl RNasin (40 U/µl) aufgenommen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### *Translation in Retikulozytenlysat*

Die Translation von Vorstufenprotein erfolgte *in vitro* in Kaninchen-Retikulozytenlysat (Pelham und Jackson, 1976) in Gegenwart von radioaktivem [<sup>35</sup>S]-Methionin. Hierzu wurden 70 µl Retikulozytenlysat, 2 µl eines Gemisches aller proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin (jeweils 1 mM), 8 µl 50 mM [<sup>35</sup>S]-L-Methionin, 2 µl RNasin (40 U/µl) sowie 16 µl RNA gemischt und 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl 0,2 M nichtradioaktives Methionin zugegeben und der Ansatz für weitere 5 min bei 30°C belassen. Schließlich wurden 20 µl 1,5 M Saccharose hinzugefügt und 30 min bei 90000 g und 4°C (Beckman Ultrazentrifuge Optima, 4°C) zentrifugiert, um die Ribosomen mit unvollständig synthetisierten und aggregierten Proteine zu sedimentieren. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.3.12 Autoradiographie und Phosphoreszenzanalyse radioaktiv markierter Proteine**

Radioaktiv markierte Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden mittels Autoradiographie durch Langzeitexposition (mehrere Stunden/Tage) eines Röntgenfilms in einer abgeschlossenen Kassette analysiert. Zur Quantifizierung wurde eine Phosphoreszenzplatte (Fuji) für mehrere Stunden aufgelegt und die angeregten Phosphoreszenzsignale in einem Lesegerät (Phosphorimager, Fuji) detektiert und ausgewertet.

### **2.3.13 ATPase-Aktivitätstest**

Zur Bestimmung der Oligomycin-sensitiven ATP-Hydrolyse-Aktivität der mitochondrialen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* wurde das nach einer bestimmten Zeit bei der Hydrolyse von ATP zu ADP freigesetzte Phosphat in einer Farbreaktion quantifiziert (Tausky und Schorr, 1953; Spannagel *et al.*, 1998). Als empfindlicher Nachweis von Phosphat diente die Bildung eines

Komplexes mit Ammoniumheptamolybdat, dessen Reduktion zur Blaufärbung der Lösung führt. Die Farbintensität kann durch Messung der Extinktion bei 610 nm verfolgt werden.

Zunächst erfolgte ein Zellaufschluss mit Glasperlen und mitochondriale Membranen wurden durch Zentrifugation angereichert. 200 µg mitochondriales Protein in 20 µl SEM-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM EDTA; 250 mM Saccharose) wurden in 900 µl Reaktionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,4; 200 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und nach Zugabe von 2 µl Ethanol bzw. 2 µl Oligomycin (2 mg/ml in Ethanol) für 2 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl ATP (100 mM) gestartet und nach einer zuvor ermittelten Zeit im linearen Bereich der Reaktion (3 min für 200 µg mitochondriales Protein) mit 100 µl TCA [72% (m/v), 4°C] abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 9000 g (0°C, Heraeus Biofuge Stratos) zentrifugiert. 250 µl des Überstandes wurden mit 1,25 ml Farbreagenz [0,8% (m/v) FeSO<sub>4</sub>; 0,66% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>; 0,75 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Extinktion bei 610 nm erfolgte gegen einen Leerwert (250 µl Reaktionspuffer und 1250 µl Farbreagenz). Die Spontanhydrolyse von ATP wurde parallel in einem Reaktionsansatz mit SEM-Puffer ohne Mitochondrien bestimmt. Die Quantifizierung des freigesetzten Phosphats erfolgte durch Kalibrierung mit Proben bekannten Phosphatgehalts (Messungen mit 0-250 nmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

Die Extraktion von Gesamtzellprotein aus Hefe zur Western-Blot-Analyse erfolgte durch alkalische Lyse (Yaffe und Schatz, 1984). 1 ml einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 wurde bei RT für 1 min bei 16000 g (Eppendorf- Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierten Zellen in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 75 µl Aufschlusspuffer [1,85 M NaOH; 7,4% (v/v) β- Mercaptoethanol; 10 mM PMSF; 5% (v/v) Ethanol] gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 575 µl 50% (m/v) TCA (4°C) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, mindestens 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 30000 g und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos). Das Proteinsediment wurde

zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen, bei 56°C getrocknet und in 40 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.3.3).

#### **2.4.2 Schnelle Präparation mitochondrialer Membranen aus *S. cerevisiae***

Die schnelle Präparation mitochondrialer Membranen im kleinen Maßstab zur Western-Blot-Analyse erfolgte durch Aufschluß der Zellen mit Glasperlen. Dazu wurden zunächst 10 ml einer Hefekultur in YP-Medium (YPGal/Lac) mit einer  $OD_{600}=1$  für 5 min sedimentiert (3000 g, RT). Die Zellen wurden in 300 µl eiskaltem SHKCl-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl; 1 mM PMSF) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dem Ansatz wurden Glaskügelchen (0,5 mm), entsprechend einem Volumen von etwa 200 µl, zugegeben. Es wurde viermal 30 s mit einem Vortex-Mixer gemischt und jeweils anschließend 30 s auf Eis gekühlt. Dann wurden 400 µl SHKCl-Puffer (4°C) zugegeben sowie die Glasperlen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 g und 4°C (Heraeus Biofuge Stratos) abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die mitochondriale Fraktion 10 min bei 16000 g und 4°C sedimentiert (Heraeus Biofuge Stratos). Die angereicherten mitochondrialen Membranen wurden in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 min bei RT geschüttelt (1400 U/min). 50 µl des Überstandes (postmitochondriale Fraktion) wurde nach einer TCA-Fällung (siehe 2.3.2) ebenso behandelt. Die Proben wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (2.3.3).

#### **2.4.3 Präparation mitochondrialer Membranen zur Messung der ATPase-Aktivität**

Zur Messung der Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase wurden mitochondriale Membranen nach der bei Arnold *et al.* (1998) beschriebenen Methode isoliert. 30 ml einer Hefekultur in YP-Medium (YPGal/Lac) mit einer  $OD_{600} = 1$  wurden 5 min bei RT zentrifugiert (3000 g, Heraeus Biofuge Stratos) und die sedimentierten Zellen mit 400 µl deionisiertem  $H_2O$  gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 400 µl eiskaltem Homogenisierungspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,0; 5 mM Aminocaprinsäure; 250 mM Saccharose) resuspendiert und Glaskügelchen (0,5 mm), entsprechend einem Volumen von etwa 100 µl, zugegeben. Es wurde 10 mal 1 min mit einem Vortex-Mixer auf höchster Stufe gemischt und jeweils 30 s auf Eis gekühlt. Zur Abtrennung der

Zelltrümmer wurde zweimal für 10 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Die mitochondrialen Membranen wurden 10 min bei 16000 g und 4°C sedimentiert, in SEM-Puffer (250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2) aufgenommen und für den ATPase-Aktivitätstest verwendet.

#### **2.4.4 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae***

Für die Isolierung von Mitochondrien in größerem Maßstab (Herrmann *et al.*, 1994; Zinser und Daum, 1995) wurde der entsprechende Hefestamm in YPGal/Lac-Medium (5 l) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-2 kultiviert. Die Kultur wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 g (RT) sedimentiert (Beckman Avanti J-20XP, Rotor JLA8.1000). Nach einmaligem Waschen mit deionisiertem H<sub>2</sub>O wurden die Zellen in DTT-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,4 und 10 mM DTT) resuspendiert (0,5 g Feuchtwicht/ ml) und 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2000 g und RT (Beckman Avanti J-20XP, Rotor JA10) wurde das Zellsediment mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und in Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4) mit 150 mg Feuchtwicht/ml resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 mg Zymolyase je 1 g Zellmasse wurde 15-30 min bei 30°C geschüttelt. Der enzymatische Abbau der Zellwand (Bildung von Sphäroplasten) wurde durch osmotische Lyse in Wasser getestet. Dafür wurden je 50 µl der Suspension mit 2 ml Wasser gemischt. Die Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die Lösung nach einigen Sekunden klar wurde. Die Sphäroplasten wurden 5 min bei 1100 g und 4°C abzentrifugiert (Beckman Avanti J-20XP, Rotor JA10) und in eiskaltem Homogenisierungspuffer [10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 0,3% (m/v) fettsäurefreies BSA; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF] mit 150 mg Feuchtwicht/ml resuspendiert.

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Aufschluß der Sphäroplasten erfolgte in einem Dounce-Glasmogenerator durch 13 Auf- und Abbewegungen. Anschließend wurde zweimal für 5 min bei 2000 g (Beckman Avanti J-20XP, Rotor JA10) zentrifugiert, um Zelltrümmer und restliches Zellmaterial abzutrennen. Die mitochondriale Fraktion wurde durch erneute Zentrifugation (12 min, 18000 g, 4°C) abgetrennt und in 10 ml kaltem SEM-Puffer (250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2) resuspendiert. Dann wurden nochmals nicht-mitochondriale Bestandteile für 5 min aus der Suspension bei 2000 g entfernt (JA25.50-Rotor) und anschließend die Mitochondrienfraktion 12 min bei 12000 g (bei 4°C) sedimentiert. Die isolierten Mitochondrien wurden in kaltem SEM-Puffer aufgenommen, sodass

sich eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml ergab, Aliquote in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.4.5 Import von Vorstufenprotein in isolierte Mitochondrien**

Isolierte Mitochondrien wurden mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Importpuffer [50 mM HEPES pH 7,2; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei); 0,5 M Sorbitol; 80 mM KCl; 10 mM Mg-Acetat; 2 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM MnCl<sub>2</sub>; 5 mM NADH; 2,5 mM ATP; 10 mM Creatinphosphat; 100 µg/ml Creatinkinase] gegeben und für 3 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurden 5-10% (v/v) Retikulozytenlysate mit Vorstufenprotein (2.3.9) zugegeben und der Ansatz für den Import 30 min bei 25°C inkubiert. Überschüssiges Protein wurde mit 100 µg/ml Proteinase K abgebaut und nach 30 min bei 4°C wurde das Enzym durch Zugabe von 2 mM PMSF inhibiert. Die Mitochondrien wurden bei 9000 g und 4°C (Sigma 3K30) sedimentiert, in SHKCL-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl) gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Kontrolle der Abhängigkeit des Importprozesses vom Membranpotential wurde dieses durch die Zugabe von 50 µM Valinomycin, 800 µM Antimycin und 2 mM Oligomycin zum Importansatz und einer Inkubation auf Eis für 5 min aufgehoben.

#### **2.4.6 Proteintranslation in isolierten Mitochondrien und Analyse exportierter Abbauprodukte durch Gelfiltration ("Peptidexport-Assay")**

Die Translation mitochondrial kodierter Proteine erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von McKee und Poyton (1984) in isolierten Mitochondrien. Es wurden 100 µl 1,5x Translationspuffer (0,9 M Sorbitol; 22,5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 225 mM KCl; 19 mM MgSO<sub>4</sub>; 6 mM ATP; 0,75 mM GTP; 2 mM NADH; 7,5 mM α-Ketoglutarat; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat; 150 µM aller proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin; 4,5 mg/ml fettsäurefreies BSA) mit 33 µl Wasser und 2 µl Pyruvatkinase (2 mg/ml) und 10 µl Mitochondrien-suspension (10 µg/µl) versetzt und 3 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden 5 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin zugesetzt, der Ansatz für weitere 20 min inkubiert und anschließend die [<sup>35</sup>S]-Markierung durch Zugabe von 38 µl 0,2 M Methionin (unmarkiert) abgestoppt. Die Probe wurde 5 min bei 9000 g (4°C) zentrifugiert (Sigma 3K30). Das Sediment wurde zweimal in 500 µl SHKCL-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM KCl) mit 5 mM Methionin gewaschen und jeweils für

3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150  $\mu$ l 1x Translationspuffer mit Pyruvatkinase (25  $\mu$ g/ml) resuspendiert und nach Abnahme einer Translationskontrolle (30  $\mu$ l, bei 4°C) wurde die Probe 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien erneut sedimentiert (3 min; 18000 g), 100  $\mu$ l des Überstandes zur Gelfiltrationsanalyse eingesetzt und das Pellet zur Proteolysekontrolle mit der Translationskontrolle auf einem SDS-Gel aufgetragen. Die Gelfiltration erfolgte mit 40% Acetonitril (v/v) und 0,1% Trifluoressigsäure (v/v) bei 0,3 ml/min an einer Superdex-Chromatographiesäule (Peptide PE 7,5/300). Dabei wurden Fraktionen zu 300  $\mu$ l gesammelt, die nach intensivem Mischen mit je 1 ml Szintillationslösung (Ultima Gold) in einem Szintillationszähler auf den Gehalt radioaktiv markierter Proteolyseprodukte analysiert wurden.

#### **2.4.7 ATP-Depletion in Mitochondrien**

Im Allgemeinen war die Erniedrigung der ATP-Konzentration durch den Verdünnungseffekt bei der Herstellung mitochondrialer Extrakte ausreichend. Nach Importreaktionen erfolgte zusätzlich eine Apyrasebehandlung. Dazu wurde dem Ansatz nach erfolgtem Import 1 U/ml Apyrase zugesetzt und dieser für weitere 10 min bei 25°C inkubiert. Im anschließenden Waschschrift enthielt der Puffer ebenfalls 1 U/ml Apyrase.

### **2.5 Immunologische Methoden**

#### **2.5.1 Affinitätsreinigung von Antiseren**

Die Affinitätsreinigung von Antiseren erfolgte in Anlehnung an die Methode von Harlow und Lane (1988). Hierzu wurde das Peptid-Epitop über den Cysteinrest an eine mit Iodacetyl-Gruppen aktivierte Gelmatrix (SulfoLink<sup>®</sup>, Pierce) kovalent gebunden. Die so erzeugte Affinitätssäule (2ml) wurde zunächst nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM Glycin pH 2,5; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat pH 11,5 und wiederholt mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. 15 ml des Antiserums wurden mit dem gleichen Volumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt und mit Proteaseinhibitoren versetzt (1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,5 mM *o*-Phenantrolin; 1  $\mu$ g/ml Leupeptin). Das verdünnte Serum wurde zweimal mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit je

10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM Natriumchlorid in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 100 mM Zitronensäure/NaOH pH 4,0 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe und Fraktionierung von 10 x 1 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5 und nach einem Waschschrift (10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8) mit 10 x 1 ml 100 mM Natriumphosphat pH 11,5. Die Fraktionen des Eluats (1 ml) wurden mit jeweils 60 µl 1 M Tris/HCl pH 8,8 (für die Glycinelution) bzw. 100 µl 1 M Glycin pH 2,2 (für die Elution im Alkalischen) neutralisiert und der pH-Wert überprüft. In einer SDS-PAGE wurden je 15 µl der Fraktionen aufgetragen und durch Färbung mit Coomassie-Blau die antikörperhaltigen Fraktionen ermittelt und vereinigt. Aliquote wurden bei -80°C aufbewahrt. Die Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen (10 ml) und in TBS (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) mit 0,05% (m/v) NaN<sub>3</sub> bei 4°C gelagert.

### 2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Der immunochemische Nachweis von Proteinen erfolgte auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen bei RT und unter Schwenken, sodass die Membranen gleichmäßig benetzt wurden. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde zunächst für 30 min in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) mit 5% (m/v) Magermilchpulver inkubiert. Es folgte für 1-2 h die Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum (siehe Tabelle 6), das je nach Titer zwischen 1:200 und 1:10000 mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, 10 min in 0,05% (v/v) Triton X-100 in TBS und wieder 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper verwendet, an die das Enzym Meerrettich-Peroxidase kovalent gekoppelt ist. Dieser Antikörper wurde 1:10000 mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer verdünnt und die Membranen damit 60 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit TBS gewaschen und die gebundene Peroxidase mit 2 ml eines 1:1-Gemisches chemolumineszierender Reagenzien nachgewiesen [Lösung 1: 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5; 1 ml Luminol (44 µg/ml in DMSO), 440 µl *p*-Coumarinsäure (15 µg/ml in DMSO), ad 100 ml H<sub>2</sub>O; Lösung 2: 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5; 60 µl 30% Wasserstoffperoxid, ad 100 ml H<sub>2</sub>O]. Die Membranen wurden für 1 min mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und 30 s bis 20 min auf Röntgenfilmen exponiert. Um gebundene Antikörper für nachfolgende Immundekorationen zu entfernen, wurden die Membranen gegebenenfalls viermal 15 min in 100 mM Glycin pH 2,5

gewaschen. Die Quantifizierung von Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Kodak Image Station 440 und dem Programm Kodak 1 D Image Analysis Software.

### 2.5.3 Verwendete Antiseren

Die in Westernblot-Analysen verwendeten polyklonalen Seren (Tab. 6) wurden durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der für die  $F_1\beta$ -Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATPase von *Neurospora crassa* spezifische Antikörper kreuzreagiert mit der  $F_1\beta$ -Untereinheit von *S. cerevisiae* und der GroEL-spezifische Antikörper kreuzreagiert mit Hsp60 aus *S. cerevisiae*.

**Tabelle 6:** In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Mdl1-C	1:200	gerichtet gegen die Peptidsequenz CDEEGKGGVIDLD; Peptid gekoppelt an KLH (entspricht Aminosäuren 677-688 von Mdl1), Young <i>et al.</i> , 2001; affinitätsgereinigt
$F_1\alpha$	1:10000	gereinigtes Protein, $F_1\alpha$ -Untereinheit der $F_1F_0$ -ATP-Synthase aus <i>S. cerevisiae</i>
$F_1\beta$	1:5000	gereinigtes Protein, $F_1\beta$ -Untereinheit der $F_1F_0$ -ATP-Synthase aus <i>N. crassa</i>
Atp6	1:2000	gereinigtes Protein, Untereinheit Atp6 der $F_1F_0$ -ATP-Synthase aus <i>S. cerevisiae</i>
Tim11	1:1000	gereinigtes Protein, Untereinheit e der $F_1F_0$ -ATP-Synthase aus <i>S. cerevisiae</i>
Cyb2	1:1000	Aminosäuren 168-557 mit Hexahistidinpeptid in <i>E. coli</i> exprimiert
Hsp60/GroEL	1:2000	gereinigtes Protein, GroEL aus <i>E. coli</i>

## 2.6 Verwendete Medien

### *E. coli*

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; für  $LB_{Amp}$  wurde nach dem Autoklavieren 100  $\mu$ g/ml Ampicillin zugegeben  
 LB-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 1,5% (m/v) Agar; für  $LB_{Amp}$ -Platten wurden nach dem Autoklavieren 100  $\mu$ g/ml Ampicillin zugegeben  
 SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl; 0,19 g/l Kaliumchlorid  
 SOC-Medium: 10 ml SOB-Medium; 20 mM Glucose; 10 mM  $MgCl_2$

### *S. cerevisiae*

YP-Medium: 10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l (m/v) Pepton pH 5,5 mit HCl einstellen, autoklavieren (gegebenenfalls 20 g/l Agar für Platten)  
 YPD-Medium: 10 g/l Hefeextrakt; 2 g/l Bacto-Pepton pH 5,5 mit HCl einstellen, autoklavieren; 40% (m/v) Glucose (autoklaviert) ad 2% (v/v) zugeben (gegebenenfalls 20 g/l Agar für Platten)  
 YPD-Cycloheximid: Der Cycloheximidgradient wurde durch Überschichtung von YPD-Schrägagar-Medium (0,5  $\mu$ g/ml Cycloheximid) mit YPD-Aggar hergestellt.

YPGalac-Medium:	10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Pepton; 0,5% (v/v) Lactat pH 5,5 mit KOH einstellen, autoklavieren; 40% (m/v) Glucose (autoklaviert) ad 2% (v/v) zugeben
Laktatmedium:	3 g/l Hefeextrakt; 1 g/l Glucose; 1 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 g/l NH <sub>4</sub> Cl; 0,5 g/l CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O; 0,5 g/l NaCl; 1,1 g/l MgSO <sub>4</sub> x6H <sub>2</sub> O; 0,3 ml 1% (m/v) FeCl <sub>3</sub> ; 2% (v/v) Milchsäure pH 5,5 mit KOH einstellen
SCD-Medium:	6,7 g/l Yeast Nitrogen Base mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ohne Aminosäuren, pH 5,5 mit HCl einstellen, autoklavieren; 40% (m/v) Glucose (autoklaviert) ad 2% (v/v) zugeben; 1,5 g/l "Drop Out" Aminosäuremix (Mischung aller Aminosäuren zu gleichen Gewichtsanteilen außer der, die Auxotrophie-abhängig je nach Selektion zugegeben werden), gegebenenfalls 20 g/l Agar für Platten "Drop Out" Aminosäure Mix: je 2 g Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Inositol, Isoleucin, Methionin, <i>para</i> -Aminobenzoesäure, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin; vgl. Anhang A in Burke <i>et al.</i> (2000); Auxotrophie-abhängige Zugabe von Adenin (40 µg/ml), Histidin (20 µg/ml), Leucin (60 µg/ml), Lysin (30 µg/ml), Tryptophan (40 µg/ml), Uracil (20 µg/ml)

## 1.7 Chemikalien, Enzyme und Geräte

### 2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agfa, München:	Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme
Amersham Biosciences, Freiburg:	Superose 6 HR 10/30 -Gelfiltrationssäule, Superdex Peptide PE 7,5/300 - Gelfiltrationssäule, HiTrap <sup>TM</sup> 1 ml Chelating HP-Säule
Applied Biosystems, Foster City, USA:	Big Dye <sup>®</sup> Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit
BD, Franklin Lakes, USA:	Bacto-Trypton, Bacto-Pepton
Biometra, Göttingen:	Reagenzien für die PCR
Biomol, Hamburg:	Tricin
Biorad, München:	Bradford-Reagenz zur Bestimmung der Proteinkonzentration; IgG-Proteinstandard; Antikörper gegen Kaninchen-IgG, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase; Gel Air Cellophan-Folie
Biozym, Hess. Oldendorf:	SP6-RNA-Polymerase
BMA, Rockland, USA:	Agarose für DNA-Gelelektrophorese
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Hefestickstoffquelle (YNB) mit Ammoniumsulfat
Fluka, Buchs, USA:	Lithiumacetat, Lysin, Methionin, Threonin, Trichloressigsäure
Fuji, Düsseldorf:	Röntgenfilme Super RX
Genomed, Bad Oeynhausen:	Jetstar <sup>®</sup> -System zur Plasmidisolierung
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin, DTT, HEPES, NADH, MOPS
GIBCO-BRL, Eggenstein:	Agarose für präparative Gele, T4-Ligase, Restriktionsenzyme, 1 kb-DNA-Größenstandard für Agarosegele
Greiner, Frickenhausen:	Petrischalen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Röhrchen
Heirler, Radolfzell:	Magermilchpulver
ICN Pharmaceuticals, Eschwege:	[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1175 Ci/mmol), Tris
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat MD
NEB, Frankfurt	Restriktionsenzyme, Proteingrößenstandard (Broad Range)
Packard, Groningen, NL:	Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold)
Peqlab, Erlangen:	Desoxynukleosidtriphosphate für PCR
Pharmacia Bioscience, Freiburg:	m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G
Promega, Mannheim:	Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM-Vektoren, RNasin, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, <i>Pfu</i> -DNA-Poylmerase, T4-DNA-Ligase
Qiagen, Hilden:	Gelextraktionssystem, PCR-Reinigungssystem, Ni-NTA-Agarose
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat

Roche, Basel, Schweiz:	ATP, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Phosphokreatin, GTP, Phosphoenolpyruvat
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembranen 0,2 µm, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter
Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Ethanol, Hefeextrakt, Ponceau S, Serva Blau G, Saccharose, Spermidin, TEMED
Sigma-Aldrich, Steinheim:	Adenin, 6-Aminocaprinsäure, Ammoniumperoxodisulfat, BSA (fettsäurefrei), EDTA, Ethidiumbromid, Galactose, Glucose, Glycerin, Heringsspermien-DNA, Luminol, Lyticase, Manganchlorid, Markerproteine für Gelfiltrationschromatographie, β-Mercaptoethanol, <i>p</i> -Cumarinsäure, PMSF, Phenylalanin, Polyethylenglykol (PEG 3350), SDS, Sorbitol, Triton X-100, Uracil, ADP-Agarose (C <sub>8</sub> -gekoppelt), ATP-Agarose (C <sub>8</sub> -gekoppelt)
Sigma-ARK, Darmstadt:	PCR-Primer
Stratagene, La Jolla, USA:	<i>E. coli</i> XL1-Blue
Whatman, Maidstone, England:	Whatman-3MM-Filterpapier

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen

## 2.7.2 Geräte

Agfa, München:	Curix 60-System für die Entwicklung von Röntgenfilmen
Amersham Biosciences, Freiburg:	Stromversorgungsgeräte ES601 für Gelelektrophorese und Proteintransfer; Äkta Purifier- und Äkta Prime- LC-Systeme für die Gelfiltration
Applied Biosystems, Foster City, USA:	ABI PRISM® 3100/3700 Sequenzierer
Bandelin, Berlin:	Ultraschallbad Sonorex RK120P
Beckman Coulter, München:	Zentrifuge Avanti J-20 XP, Rotoren JLA8.100; JA10; JA25.50; Ultrazentrifuge Optima, Rotoren TLA-55; MLS50; Zentrifugationsbecher, Szintillationszähler LS5000 TD
Biorad, München:	PAGE-System MiniProtean3; Gel Air Trockner und Trockenrahmen für Polyacrylamidgele; Photometer (Smart Spec 3000)
Biometra, Göttingen:	programmierbarer Thermostat für PCR-Reaktionen (Thermocycler T3); Taumelschüttler WT12
Brand, Wertheim:	Accu-Jet Pipettierhilfe
Braun, Melsungen:	Glashomogenisatoren, Glasperlen (∅ 0,5 mm)
Bruker	MALDI-Reflex IV
Eppendorf, Hamburg:	Tischzentrifuge 5417C, Thermostat (Thermomixer comfort)
Fuji, Düsseldorf:	Phospho-Imager BAS-1500; Phosphoreszenzplatten
Gilson, Middleton, USA:	Kolbenhubpipetten
Heidolph, Schwabach:	Magnetrührer MR3001, Vortex-Mixer (REAX 2000)
Heraeus, Osterode:	Kühlzentrifuge Biofuge Stratos, Rotoren #3331; #3046
H+P, Oberschleissbach:	Dampfsterilisator 500 E
IKA, Staufen	Schüttler Vibrax VXR
Infors, Bottmingen, Schweiz:	Brutschrank
Kartell, Noviglio, Italien:	Exsikkator
Knick, Berlin:	pH-Meter
Kodak, München:	Image Station 440
Köttermann, Uetze/Hänigsen:	Wasserbad
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
Millipore, Bedford, USA:	MilliQ-Reinstwasseranlage, PVDF-Membran (Immobilon™-P, 0,45 µm)
Roth, Karlsruhe:	Sterilfilter
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembran BA83 (0,2 µm)
Sigma, München:	Kühlzentrifuge 3K30, Rotor 12154-H
Werkstatt LMU, München:	Western-Blotting-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler, Gradientenmischer, PAGE-System (groß), Blot-Kammern

## 3 Ergebnisse

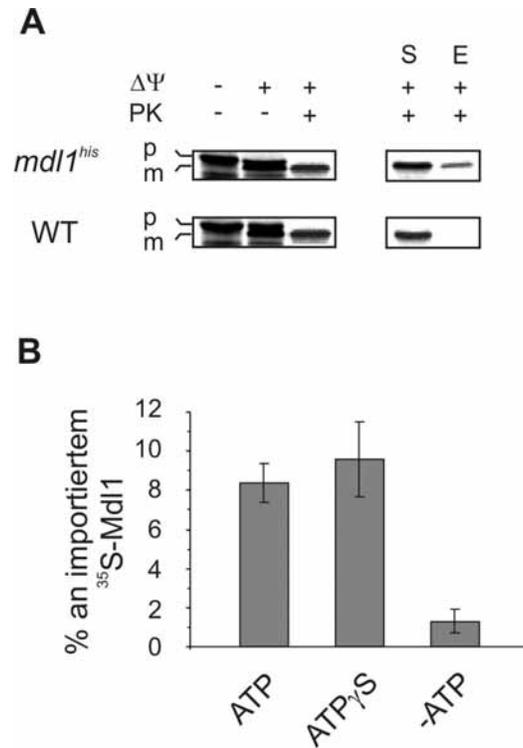
### 3.1 Mdl1 als Bestandteil von Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran

#### 3.1.1 Homooligomerisierung von Mdl1

Mdl1 besitzt als Monomer ein Molekulargewicht von 70 kDa und zeigt in der Ausschlusschromatographie in Gegenwart von ATP das Laufverhalten eines ~200 kDa-Komplexes (Young *et al.*, 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass Mdl1 nicht als heterooligomere Komplexe mit den mitochondrialen ABC-Transportern Mdl2 und Atm1 vorliegt (Young *et al.*, 2001; Chloupková *et al.*, 2003). Demnach könnte es sich um das funktionelle Dimer des Transporters handeln. Daher sollte eine mögliche Homodimerisierung von Vollängen-Mdl1 innerhalb der Mitochondrienmembran untersucht werden. Hierzu wurde der Stamm *mdl1*<sup>6His</sup> (YDG2) erzeugt, in dem das chromosomale *MDL1*-Gen derart modifiziert ist, dass die Expression des Proteins mit sechs Histidinresten am C-Terminus erfolgt (Mdl1<sup>His</sup>). Mdl1 wurde in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin *in vitro* synthetisiert ([<sup>35</sup>S]-Mdl1; 2.3.11) und in Mitochondrien importiert (2.4.5), die aus Wildtyp- und *mdl1*<sup>6His</sup>-Zellen isoliert wurden (Abb. 4A). Der Import erfolgt in Abhängigkeit vom Membranpotential unter Abspaltung der Signalsequenz (Young *et al.*, 2001). Nach proteolytischer Entfernung von nicht-importiertem Vorläufer-Protein wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 solubilisiert und die Membranextrakte mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. In Gegenwart von 100 mM Imidazol konnte gebundenes [<sup>35</sup>S]-Mdl1 von der zuvor mit Mdl1<sup>His</sup>-Mitochondrienextrakten inkubierten Agarose eluiert werden (Abb. 4A). In der Wildtyp-Kontrolle wurde hingegen kein radioaktiv markiertes Protein freigesetzt. Offenbar interagiert [<sup>35</sup>S]-Mdl1 mit endogenem Mdl1<sup>His</sup>, das spezifisch an die Ni-NTA-Matrix bindet. Diese Befunde zeigen, dass Mdl1 in Analogie zu anderen Halbseitentransportern einen homooligomeren Komplex in der mitochondrialen Innenmembran bildet. Höchstwahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Dimer.

Um die Abhängigkeit der Dimerisierung von der Nukleotidbindung zu untersuchen, wurden die ATP-Konzentrationen in den Mitochondrien variiert und nachfolgend die Bindung an Ni-NTA-Agarose untersucht. ATP-Depletion durch Apyrasebehandlung und Solubilisierung ohne Zugabe von ATP führten zu einer deutlich verminderten Bindung von [<sup>35</sup>S]-Mdl1 an Mdl1<sup>His</sup> (Abb. 4B). Andererseits hatte die Gegenwart von ATP einen deutlichen Anstieg von gebundenem radioaktiv

markierten Protein zur Folge. Die Zugabe des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP $\gamma$ S führte ebenfalls zu einer Dimerisierung, die im Vergleich zur Gegenwart von ATP keinen signifikanten Unterschied zeigte (Abb. 4B). Mdl1 dimerisiert somit als Volllängenprotein in der Gegenwart von ATP und ATP $\gamma$ S. Die Dimerisierung findet offensichtlich unabhängig von der Nukleotid-Hydrolyse statt.



**Abb. 4: Homooligomerisierung von Mdl1 in Abhängigkeit von ATP**

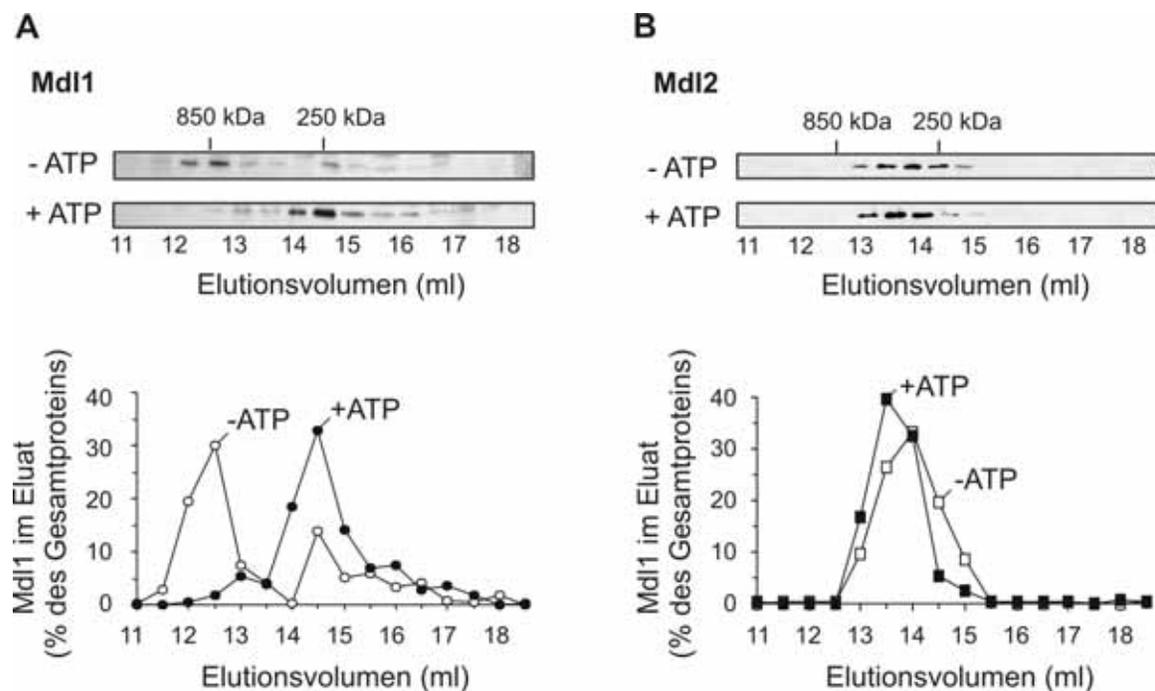
(A) [<sup>35</sup>S]-markiertes Mdl1 wurde *in vitro* in Mitochondrien aus *mdl1<sup>6His</sup>*- oder Wildtyp-Zellen importiert, wie in 2.4.5 beschrieben. Nach Solubilisierung (5 mg/ml) mit Triton X-100 (0,2%) in Gegenwart von ATP wurden die Extrakte mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, gewaschen und mit 100 mM Imidazol eluiert (2.3.9). Aufgetragen sind jeweils 30  $\mu$ g Mitochondrien (p-Vorläuferprotein, m-reifes Protein,  $\Delta\Psi$ -Membranpotential, PK-Proteinase K) bzw. 5% der Gesamtprobe (S-Solubilisierung, E-Eluat).

(B) Quantifizierung von [<sup>35</sup>S]-Mdl1 im Überstand des eluierten Materials in Gegenwart von ATP, ATP $\gamma$ S oder nach Apyrasebehandlung durch SDS-PAGE (2.3.3) und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (2.3.5) mit anschließender Phosphoreszenzanalyse (2.3.12). Das Signal von unspezifisch gebundenem Protein wurde in einem Parallelexperiment mit Extrakten von Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen nach Import von [<sup>35</sup>S]-Mdl1 bestimmt und abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten.

### 3.1.2 Mdl1 als Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes

Die nukleotidabhängige Homooligomerisierung von Mdl1 lässt vermuten, dass der Transporter nach ATP-Depletion überwiegend in der monomeren Form vorliegt. Möglich erscheint aber auch die Assoziation mit einem weiteren Protein der inneren Mitochondrienmembran, wie z.B. die Ausbildung eines Peptidladekomplexes. Eine Möglichkeit wäre die direkte Interaktion mit der *m*-AAA-Protease, wobei die erzeugten Peptide vermittelt durch Mdl1 direkt in den Intermembranraum transportiert werden könnten. Nachfolgend sollte daher der Einfluss von ATP auf die Komplexbildung des Transporters untersucht werden.

Das Elutionsverhalten von Mdl1 wurde unter Verwendung mitochondrialer Extrakte an einer Superose 6-Gelfiltrationssäule in Gegenwart und Abwesenheit von ATP bestimmt (Abb. 5A).



**Abb. 5: Mdl1 als Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes nach Depletion von ATP**

(A) Mdl1 bildet in Gegenwart von 1 mM ATP einen Komplex von 250 kDa und ist nach ATP-Depletion Bestandteil eines 850 kDa-Komplexes in der mitochondrialen Innenmembran.

(B) Mdl2 zeigt unabhängig von der ATP-Konzentration ein natives Molekulargewicht von 450 kDa.

(A, B) Mitochondrien (600 µg) wurden mit Triton X-100 (0,2%) ohne ATP (-ATP) oder nach Zugabe von 1 mM ATP (+ATP) solubilisiert und die Extrakte auf eine Superose 6-Säule aufgetragen (2.3.6). Die eluierten Proteine wurden mit TCA (2.3.2) gefällt und nach einer SDS-PAGE (2.3.3) durch Westernblot mit Antikörpern gegen Mdl1 (A oben) bzw. Mdl2 (B oben) analysiert (2.5.3). Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet und Elutionsprofile relativ zur Gesamtmenge an Protein im Eluat erstellt (A, B unten).

In Gegenwart von ATP konnte Mdl1 in Eluatfraktionen gefunden werden, die einem Molekulargewicht von 250 kDa entsprechen. Wurde der Membranextrakt ohne zusätzliche Zugabe von ATP hergestellt und auf die Säule gegeben, eluiert Mdl1 in einem hochmolekularen Komplex von 850 kDa. Neben der Ausbildung eines Mdl1-Homodimers in Gegenwart von ATP führt ATP-Depletion demnach zur Assoziation von Mdl1 in einem hochmolekularen Komplex der mitochondrialen Innenmembran.

Mdl2 besitzt 46% Sequenzidentität gegenüber Mdl1 (Lill und Kispal, 2001) und weist in Gegenwart von ATP ein natives Molekulargewicht von 300 kDa auf (Young *et al.*, 2001). Mdl1 und Mdl2 bilden voneinander unabhängige Komplexe in der mitochondrialen Innenmembran (Young *et al.*, 2001, Chloupková *et al.*, 2003). Es sollte untersucht werden, ob bei der Komplexbildung von Mdl2 eine ähnliche Abhängigkeit von der ATP-Konzentration wie für Mdl1 vorliegt. Es zeigte sich jedoch, dass die Elution von Mdl2 an der Superose 6-Säule unabhängig von der ATP-Zugabe bei einem nativen Molekulargewicht von 450 kDa erfolgt (Abb. 5B). Offensichtlich ist der für Mdl1 beobachtete Nukleotideffekt für diesen Transporter spezifisch, da Mdl2 trotz hoher Sequenzhomologie und gemeinsamer Lokalisierung in der Innenmembran keine derartige Assoziation in einem hochmolekularen Komplex zeigt.

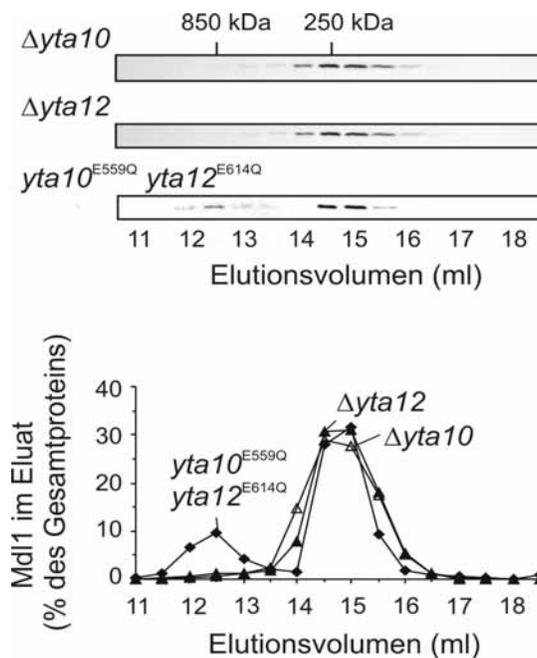
### 3.1.3 Rolle der *m*-AAA-Protease bei der Komplexbildung von Mdl1

Mdl1 ist am Export von Peptiden beteiligt, die bei der Proteolyse von Proteinen in der mitochondrialen Innenmembran durch die *m*-AAA-Protease entstehen (Young *et al.*, 2001). Da die *m*-AAA-Protease selbst Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes ist (Steglich *et al.*, 1999), sollte ihr Einfluss auf die Komplexbildung von Mdl1 untersucht werden. Dazu wurden Mitochondrien aus  $\Delta yta10$ - und  $\Delta yta12$ -Zellen ohne Zugabe von ATP mit Triton X-100 solubilisiert und durch Ausschlusschromatographie an einer Superose 6-Säule analysiert (Abb. 6). Mitochondrien aus  $\Delta yta10$ - bzw.  $\Delta yta12$ -Zellen fehlt jeweils eine Untereinheit der *m*-AAA-Protease. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mitochondrien wurde Mdl1 ausschließlich in Fraktionen gefunden, die einem Molekulargewicht von 250 kDa entsprechen, was eine direkte Interaktion von Mdl1 mit dem Proteasekomplex oder einen indirekten Effekt vermuten lässt.

Die *m*-AAA-Protease besitzt eine chaperonähnliche Aktivität (Arlt *et al.*, 1996) und übt über ihre proteolytische Aktivität Funktionen bei der Biogenese von Atmungskettenkomplexen aus

(Arlt *et al.*, 1998). So unterliegt auch die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase der Kontrolle der *m*-AAA-Protease (Tzagoloff *et al.*, 1994; Paul und Tzagoloff, 1995). Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob eine direkte Interaktion von Mdl1 mit der *m*-AAA-Protease vorliegt, oder ob diese allein für die Assemblierung des Mdl1-Komplexes bei 850 kDa notwendig ist. Punktmutationen im katalytischen Zentrum der Proteaseuntereinheiten ( $Yta10^{E559Q}$  und  $Yta12^{E614Q}$ ) führen zur proteolytischen Inaktivierung, wobei deren Assemblierung erhalten bleibt (Arlt *et al.*, 1998).

Mitochondrien wurden aus Zellen mit gleichzeitiger Expression von  $Yta10^{E559Q}$  und  $Yta12^{E614Q}$  in  $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen gewonnen, in Abwesenheit von ATP mit Triton X-100 solubilisiert und die Extrakte gelchromatographisch an einer Superose 6-Säule getrennt. Die Elution von Mdl1 erfolgte vorwiegend bei 250 kDa. Nur 10% sind als Bestandteil des 850 kDa-Komplexes zu finden (Abb. 6). Diese Befunde zeigen, dass die proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease für die Ausbildung des hochmolekularen Mdl1-Komplexes notwendig ist. Die *m*-AAA-Protease übt möglicherweise einen indirekten Effekt auf die Komplexbildung aus und zeigt keine direkte Interaktion mit dem Transporter (vgl. 3.2.1).



**Abb. 6: Abhängigkeit des Mdl1 enthaltenden hochmolekularen Komplexes von der proteolytischen Aktivität der *m*-AAA-Protease**

Mitochondrien der Stämme  $\Delta yta10$ ,  $\Delta yta12$  und  $yta10^{E559Q} yta12^{E614Q}$  wurden mit Triton X-100 ohne ATP-Zugabe solubilisiert und die Extrakte auf eine Superose 6-Säule aufgetragen (2.3.6). Die Proteine in den Eluatfraktionen wurden mit TCA gefällt (2.3.2) und nach einer SDS-PAGE (2.3.3) durch Western blot (2.5.3) mit Antikörpern gegen Mdl1 analysiert (oben). Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet und Elutionsprofile relativ zur Gesamtmenge an Protein im Eluat erstellt (unten).

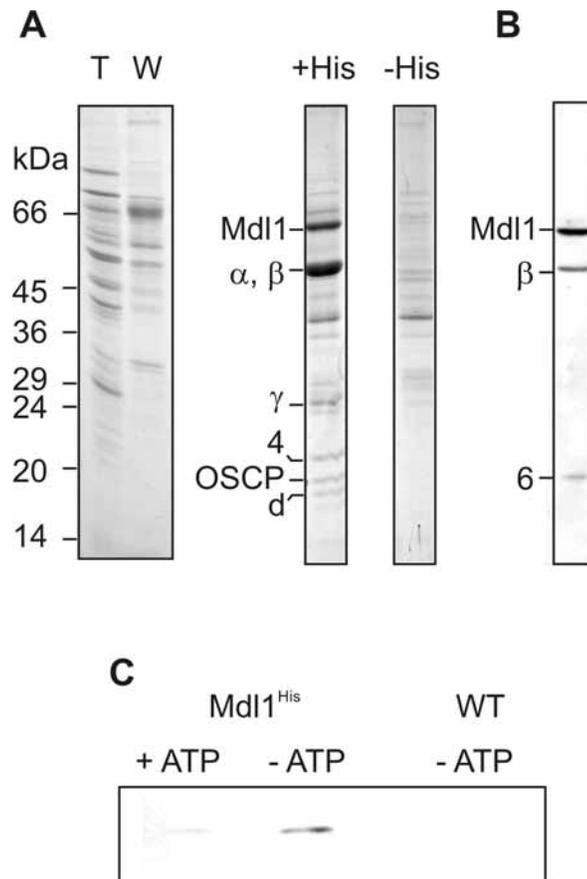
## 3.2 ATP-abhängige Assoziation von Mdl1 mit dem F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasekomplex

### 3.2.1 Mdl1 bindet Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Die *m*-AAA-Protease spielt eine wesentliche Rolle in der Biogenese einer Reihe von Proteinkomplexen in der mitochondrialen Innenmembran (Tzagoloff *et al.*, 1994; Paul und Tzagoloff, 1995, Arlt *et al.*, 1998). Ihre Inaktivierung führt zum Verlust des Mdl1-bindenden 850 kDa-Komplexes. Zur Isolierung und nachfolgenden Identifizierung von Komplexpartnern sollte eine Mdl1-Variante mit einem Hexahistidinpeptid (Mdl1<sup>His</sup>) am C-Terminus unter nativen Bedingungen an einer Ni-chelatisierenden Säule affinitätsgereinigt werden. Dazu wurde das Protein unter einem Galaktose-induzierbaren Promotor im Stamm YDG1 zur Überexpression gebracht. Isolierte Mitochondrien wurden mit Triton X-100 ohne ATP-Zugabe solubilisiert und auf die Säule geladen. Nach dem Waschen wurde das gebundene Material mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert und die Fraktionen nach einer SDS-PAGE durch Coomassie-Blau-Färbung und Westernblot analysiert. Parallel dazu wurde ein Kontrollexperiment mit der nicht bindenden Wildtypform von Mdl1 durchgeführt, um unspezifische Proteinbindung am Säulenmaterial auszuschließen. In der Coomassie-Färbung wurden eine Reihe von Proteinbanden detektiert, die in der Kontrolle nicht auftreten (Abb. 7A). Mittels MALDI-Massenspektrometrie (2.3.10) konnten verschiedene Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase identifiziert werden. Darunter befanden sich die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des F<sub>1</sub>-Subkomplexes sowie die Polypeptide 4, d und OSCP des sogenannten "zweiten Stiels" der ATP-Synthase (Abb. 7A). Durch Immundekoration konnte F<sub>1</sub> $\beta$  sowie die Untereinheit 6 des membrangebundenen F<sub>0</sub>-Sektors nachgewiesen werden (Abb. 7B). Entsprechend dem Ergebnis aus 3.1.3 wurde weder Yta10 noch Yta12 im Eluat gefunden (Abb. 7A, 7B).

Die Elution von Mdl1 im hochmolekularen Bereich erfolgte ausschließlich, wenn Membranen in Abwesenheit von ATP solubilisiert wurden. Nach Zugabe von ATP in den Solubilisierungspuffer wurde eine niedermolekulare Form von Mdl1 nachgewiesen. Nachfolgend sollte überprüft werden, ob diese Nukleotidabhängigkeit für die Interaktion mit der ATP-Synthase gilt. Dazu wurden Mitochondrien aus dem Mdl1<sup>His</sup>-Überexpressionsstamm YDG1 mit und ohne ATP-Zugabe mit Triton X-100 solubilisiert. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mitochondrien. Die Membranextrakte wurden mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und nach einem Waschschrift das gebundene Material mit

Imidazol eluiert (Abb. 7C). Das Eluat wurde anschließend mit einem gegen  $F_1\beta$  gerichteten Antikörper dekoriert. In Übereinstimmung mit den Gelfiltrationsdaten konnte eine spezifische Elution von Mdl1 mit  $F_1\beta$  in Abwesenheit von ATP gefunden werden, wohingegen keine unspezifische Bindung von  $F_1\beta$  zu verzeichnen war.



**Abb. 7: Elution von Mdl1<sup>His</sup> mit Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase durch Ni-NTA-Chromatographie**

(A) Mitochondrien (20 mg) aus Zellen mit Überexpression von Mdl1<sup>His</sup> (+His) bzw. Mdl1 (-His) unter dem ADH-Promotor wurden ohne Zusatz von ATP solubilisiert (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Eine HiTrap-Ni-NTA-Säule (2.3.9) wurde mit dem Membranextrakt beladen und das gebundene Protein nach dem Waschen mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert. 0,25% des Membranextraktes (T), der Wasch- (W) und Eluatfraktionen (+His, -His) wurden nach einer SDS-PAGE (2.3.3) mit Coomassie-Blau gefärbt (2.3.4). Neben der Elution von Mdl1<sup>His</sup> bei 300 mM Imidazol konnten Untereinheiten des  $F_1$ -Subkomplexes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ ) und des  $F_0$ -Sektors (4, d, OSCP) mittels MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

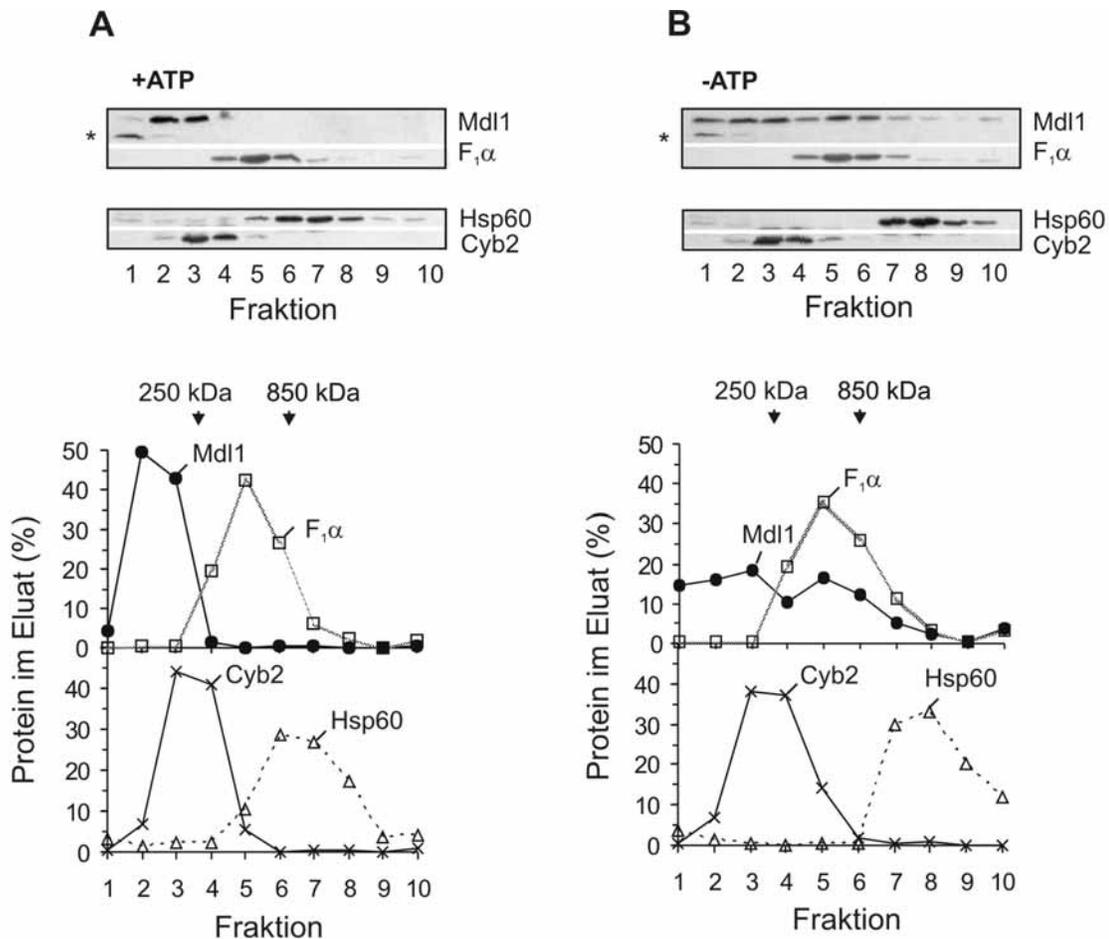
(B) Identifizierung von Mdl1,  $F_1\beta$  und der  $F_0$ -Untereinheit 6 durch Westernblotanalyse (2.5.3) einer Mdl1<sup>His</sup>-Eluatfraktion (+His) mit spezifischen Antikörpern.

(C) Nukleotidabhängige Interaktion zwischen Mdl1 und  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. 1 mg Mdl1<sup>His</sup>- bzw. Mdl1-Mitochondrien (WT) wurden mit und ohne Zugabe von 1 mM ATP (+/- ATP) solubilisiert (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), zu 50  $\mu\text{l}$  Ni-NTA-Agarosepartikeln gegeben und inkubiert (2.3.9). Nach Elution mit 100 mM Imidazol und TCA-Fällung (2.3.2) wurden die Fraktionen mit gegen  $F_1\beta$  gerichtetem Antikörper analysiert (2.5.3).

### 3.2.2 Kofraktionierung von Mdl1 mit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Um die ATP-abhängige Interaktion von Mdl1 und ATP-Synthase zu verifizieren, sollte deren Fraktionierung in einer Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht werden. Es wurden Membranextrakte mit und ohne ATP-Zugabe aus Wildtyp-Mitochondrien hergestellt und die Proteine durch Ultrazentrifugation über einen Glyceringradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden nach einer SDS-PAGE immunochemisch analysiert. Die Dekoration mit Antikörpern gegen bestimmte Markerproteine erlaubte die Zuordnung zu Bereichen mit bestimmter molekularer Masse. Wie in den Gelfiltrationsexperimenten zeigte Mdl1 eine Fraktionierung in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration (Abb. 8). Solubilisierung und Auftrennung ohne ATP-Zugabe in den entsprechenden Puffern führte teilweise zur Kofraktionierung von Mdl1 mit der ATP-Synthase, die im Gegensatz zur Superose 6-Gelfiltration bei etwa 700 kDa detektierbar war (Abb. 8 B, unten). Im Glyceringradienten zeigte auch Hsp60 ein leicht verändertes Laufverhalten in Abhängigkeit von ATP, was auf einen möglichen Assemblierungseffekt des Proteinkomplexes zurückzuführen ist (Dubaque *et al.*, 1997). Andererseits hatte die Gegenwart von ATP keinen Effekt auf das Laufverhalten der ATP-Synthase, während Mdl1 in Fraktionen nahe des Elutionsmaximums von Cytochrom *b*<sub>2</sub> (212 kDa) vorlag (Abb. 8 A, unten). Ein N-terminal verkürztes Mdl1-Fragment, das bei der Membranextraktion entstand, zeigte keine Elution mit der ATP-Synthase. Möglicherweise ist der N-Terminus von Mdl1 für die Assemblierung notwendig.

Die Elution von Mdl1 erfolgt in Größenbereichen, die annähernd mit der Bestimmung durch Ausschlusschromatographie übereinstimmen. Die Assoziation von Mdl1 mit der ATP-Synthase in Abwesenheit von ATP und die Dissoziation des Komplexes bei ATP-Zugabe im Glyceringradienten entsprechen demnach den Ergebnissen, die durch Affinitätsreinigung von Mdl1<sup>His</sup> an Ni-NTA-Agarose und Gelfiltration erhalten wurden.

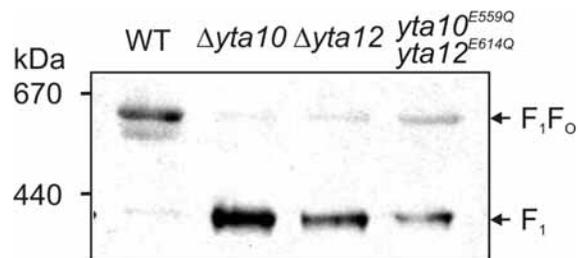


**Abb. 8: Kofraktionierung von Mdl1 und F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase nach Zentrifugation im Glycerin-Dichtegradienten**  
 Wildtyp-Mitochondrien (450 µg) wurden (A) mit ATP (+ATP) und (B) ohne ATP (-ATP) mit Triton X-100 (0,2%) und 10% Glycerin solubilisiert (5 µg/µl). Der Membranextrakt wurde auf einen Glyceringradienten (10-30%) aufgetragen und durch Ultrazentrifugation aufgetrennt (2.3.8). Einzelne Fraktionen wurden nach einer TCA-Fällung (2.3.2) durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot analysiert (2.5.3). Neben Mdl1 und der ATPase-Untereinheit F<sub>1</sub>α wurden die Proteine Hsp60 (840 kDa) und Cytochrom b<sub>2</sub> (212 kDa) als molekulare Größenmarker detektiert. Ein C-terminales proteolytisches Mdl1-Fragment ist durch einen Stern gekennzeichnet.

### 3.2.3 Die Assemblierung der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase in Abhängigkeit von der m-AAA-Protease

Hefezellen, denen eine der m-AAA-Proteaseuntereinheiten Yta10 oder Yta12 fehlt, zeigen Defekte in der Proteolyse mitochondrialer Substrate sowie eine Störung der respiratorischen Aktivität und der Biogenese von Atmungskettenkomplexen (Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Während die proteolytische Inaktivierung beider Untereinheiten durch Punktmutationen im katalytischen Zentrum ähnliche Effekte hat, kann die Aktivität einer der Untereinheiten den pleiotropen Phänotyp kompensieren (Arlt *et al.*, 1998). Deletion von *YTA10* oder *YTA12* führt z.B. zu einer gestörten

Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase und des Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes (Arlt *et al.*, 1998). Paul und Tzagoloff (1995) konnten außerdem eine Beeinträchtigung der Biogenese des  $F_1$ -Sektors der ATP-Synthase und daraus folgend des gesamten ATPase-Superkomplexes beobachten. Hierdurch könnte auch die Interaktion mit Mdl1 gestört sein (vgl. 3.1.3). Daher sollte der Assemblierungsstatus der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in Mitochondrien aus Wildtyp-,  $\Delta yta10$ - und  $\Delta yta12$ -Zellen, sowie in einem Stamm mit beiden Deletionen bei gleichzeitiger Expression der proteolytisch inaktiven Untereinheiten ( $yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$ ) überprüft werden. Dazu wurden Triton X-100-Membranextrakte mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BN-PAGE; 2.3.7) und Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen  $F_1\alpha$  untersucht (Abb. 9). Im Gegensatz zu den aus Wildtypzellen isolierten Mitochondrien konnte für die Stämme  $\Delta yta10$  und  $\Delta yta12$  nahezu keine und aus  $yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$  nur geringe Mengen assemblierte  $F_1F_0$ -ATP-Synthase bei 650 kDa nachgewiesen werden (Abb. 9). In den Mutanten war jedoch eine Anreicherung eines kleineren Komplexes bei 400 kDa zu beobachten, der offensichtlich dem  $F_1$ -Sektor entspricht (Arnold *et al.*, 1998). Das Ergebnis zeigt, dass das Fehlen einer Untereinheit bzw. die proteolytische Deaktivierung beider Untereinheiten der *m*-AAA-Protease die Biogenese des  $F_1F_0$ -Komplexes beeinträchtigt, der  $F_1$ -Sektor jedoch noch in der assemblierten Form vorliegt.

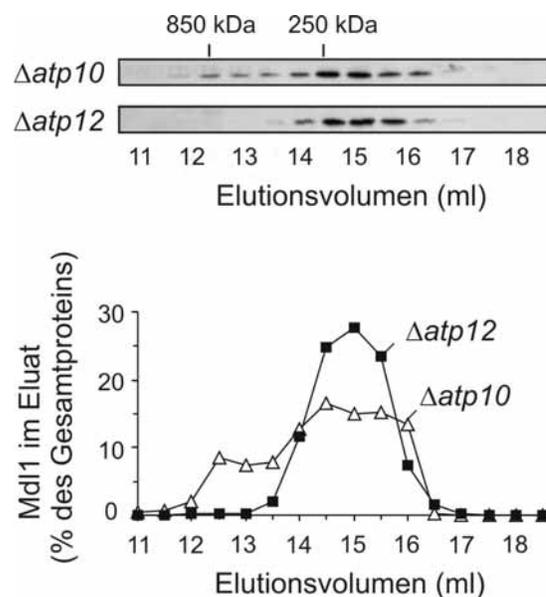


**Abb. 9: Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in Abhängigkeit von der *m*-AAA-Protease**

100  $\mu$ g Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen (WT) sowie aus Hefestämmen mit einer fehlenden Untereinheit der *m*-AAA-Protease ( $\Delta yta10$  bzw.  $\Delta yta12$ ) oder proteolytischer Inaktivierung beider Untereinheiten ( $yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$ ) wurden mit Triton X-100 (1g Detergenz/1g Protein) solubilisiert (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) und in einem Gradientengel (3-13%) unter nativen Bedingungen aufgetrennt (2.3.7). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (2.3.5) erfolgte im Westernblot der Nachweis der ATPase-Komplexe durch einen gegen  $F_1\alpha$  gerichteten Antikörper (2.5.3).

### 3.2.4 Mdl1 bindet an die vollständig assemblierte ATP-Synthase

Die Biogenese der ATP-Synthase wird generell durch eine Reihe von Assemblierungsfaktoren vermittelt, die selbst nicht Bestandteil des Komplexes sind. Während die Chaperone Atp11 und Atp12 für die Integration der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten in  $F_1$  notwendig sind (Ackerman und Tzagoloff, 1990a; Ackerman 2002), ist Atp10 an der Assemblierung von  $F_0$  beteiligt, indem es den Einbau von Atp6 in den Subkomplex vermittelt (Ackerman und Tzagoloff, 1990b, Tzagoloff *et al.*, 2004). Membranextrakte, die durch Solubilisierung von Mitochondrien mit fehlender *m*-AAA-Protease-Aktivität erzeugt wurden, zeigen trotz Abwesenheit von ATP eine Elution von Mdl1 bei 250 kDa. Daher sollte überprüft werden, ob Mutationen die direkt zur Beeinträchtigung der Assemblierung der ATP-Synthase führen, einen vergleichbaren Effekt zur Folge haben. Mitochondrien aus den Hefestämmen  $\Delta atp10$  und  $\Delta atp12$ , denen die Assemblierungsfaktoren Atp10 bzw. Atp12 fehlen, wurden ohne ATP mit Triton X-100 solubilisiert und die Membranextrakte an einer Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt (Abb. 10). Nur 10% des Mdl1-Gesamtproteins



**Abb. 10: Mdl1-Komplexbildung in Abhängigkeit vom Assemblierungsstatus der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase**

Mitochondrien (600  $\mu$ g) aus Zellen mit den fehlenden ATPase-Assemblierungsfaktoren Atp10 ( $\Delta atp10$ ) und Atp12 ( $\Delta atp12$ ) wurden mit Triton X-100 ohne ATP solubilisiert. Die Membranextrakte wurden anschließend auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen (2.3.6) und die Eluatfraktionen mit TCA gefällt (2.3.2). Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper (oben) analysiert (2.5.3) und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Elutionsprofile (unten) wurden relativ zur Gesamtmenge an Protein im Eluat aufgetragen.

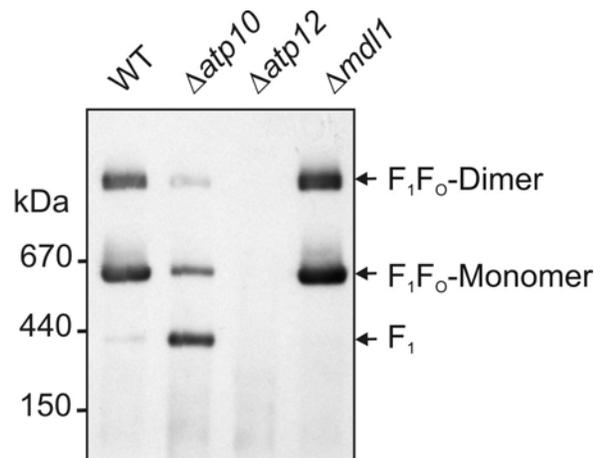
eluierten in Abwesenheit von Atp10, ähnlich wie bei mitochondrialen Extrakten aus dem Stamm *yta10<sup>E559Q</sup>yta12<sup>E614Q</sup>* (Abb. 6), in Fraktionen bei 850 kDa. Das weist auf eine Beeinträchtigung der Interaktion zwischen Mdl1 und der ATP-Synthase hin.

Das Fehlen von Atp10 hat keine Auswirkung auf die Biogenese des F<sub>1</sub>-Subkomplexes (Ackerman und Tzagoloff, 1990b, Tzagoloff *et al.*, 2004). Eine Elutionsmaximum von Mdl1 zwischen 250 kDa und 850 kDa, was einer möglichen Interaktion von Mdl1 mit F<sub>1</sub> entspräche, konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung dazu, dass auch die Blaue Nativgelelektrophorese keine Hinweise auf eine Assoziation von Mdl1 mit F<sub>1</sub> liefert (nicht gezeigt). Für  $\Delta$ *atp12*-Zellen, in denen die Integration der  $\alpha$ -Untereinheit in den F<sub>1</sub>-Subkomplex und damit die Biogenese des gesamten Superkomplexes gestört ist (Ackerman und Tzagoloff, 1990a; Ackerman 2002), zeigte sich für Mdl1 ein Elutionsmaximum ausschließlich bei 250 kDa (Abb. 10). In  $\Delta$ *atp10*-Mitochondrien ist die Biogenese des F<sub>O</sub>-Sektors beeinträchtigt und es kommt zur Akkumulation des F<sub>1</sub>-Subkomplexes. Das hat eine vermehrte Elution von Mdl1 in der homooligomeren Form bei 250 kDa zur Folge. Mdl1 liegt jedoch nicht in einer intermediären Komplexgröße vor, wonach die Interaktion mit der ATP-Synthase über F<sub>1</sub> auszuschließen wäre. Es ist jedoch auch möglich, dass eine Strukturänderung des Subkomplexes durch Fehlen der F<sub>O</sub>-Untereinheiten die Bindung von Mdl1 verhindert.

### 3.2.5 Die Deletion von *MDL1* beeinträchtigt nicht die Assemblierung der ATP-Synthase

Die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase könnte eine Rolle bei deren Assemblierung spielen, wie es für die Chaperone Atp10, Atp11 und Atp12 der Fall ist (Ackerman 2002, Tzagoloff *et al.*, 2004). Daher sollte untersucht werden, ob das Fehlen des ABC-Transporters eine Beeinträchtigung des F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-Komplexes zur Folge hat. Dazu wurden mitochondriale Membranextrakte aus Hefezellen, bei denen eine Disruption des für Mdl1 kodierenden Gens vorliegt ( $\Delta$ *mdl1*), und zum Vergleich aus den oben (3.2.4) beschriebenen Hefestämmen  $\Delta$ *atp10* und  $\Delta$ *atp12* sowie Wildtypzellen mittels BN-PAGE untersucht. Zur Solubilisierung der Membranen wurde erneut Triton X-100 verwendet. Nach der Auftrennung in einem Gradientengel erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran, und die ATP-Synthase-Komplexe wurden mittels Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen F<sub>1</sub> $\alpha$  analysiert (Abb. 11). Wie bei Arnold *et al.* (1998) beschrieben, können unter diesen Bedingungen in Wildtyp-Mitochondrien (WT) zwei Banden bei >1 MDa und 650 kDa nachgewiesen werden, die

dem Dimer und dem Monomer des ATPase-Superkomplexes entsprechen. Das Chaperon Atp10 ist an der Assemblierung von  $F_0$  beteiligt, weshalb in  $\Delta atp10$ -Zellen die Ausbildung des  $F_1F_0$ -Komplexes beeinträchtigt ist (Ackerman und Tzagoloff, 1990b).  $F_1\alpha$  konnte überwiegend in einer Bande bei 400 kDa detektiert werden, die dem löslichen  $F_1$ -Subkomplex der ATPase entspricht (vgl. 3.2.3; 3.2.4). Deletion von *ATP12* ( $\Delta atp12$ ), das an der Integration der  $\alpha$ -Untereinheit in den  $F_1$ -Subkomplex beteiligt ist, führt zu einem vollständigen Verlust des  $F_1F_0$ -Komplexes (Ackerman und Tzagoloff, 1990a). Dementsprechend ist für  $\Delta atp12$ -Mitochondrien keine assemblierte ATP-Synthase detektierbar (vgl. 3.2.4). Im Vergleich dazu zeigte die Abwesenheit des Mdl1-Transporters ( $\Delta mdl1$ ) weder einen Einfluß auf die Assemblierung noch die Homooligomerisierung des ATPase-Komplexes. Im gleichen Verhältnis wie für die Wildtyp-Mitochondrien sind zwei Banden für Monomer (650 kDa) und Dimer (>1 MDa) der ATP-Synthase nachweisbar.  $F_1$  ist somit vollständig in  $F_1F_0$  integriert.



**Abb. 11: Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase nach Disruption von *ATP10*, *ATP12* und *MDL1***

Mitochondrien (100  $\mu$ g) aus Wildtyp-Zellen (WT) und aus Hefestämmen mit den fehlenden ATP-Synthase-Assemblierungsfaktoren Atp10 und Atp12 ( $\Delta atp10$  bzw.  $\Delta atp12$ ) sowie aus  $\Delta mdl1$ -Zellen wurden mit Triton X-100 (1g Detergenz/1g Protein) solubilisiert (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) und in einem Gradientengel (3-13%) unter nativen Bedingungen aufgetrennt (2.3.7). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (2.3.5) erfolgte im Westernblot der Nachweis der ATPase-Komplexe durch einen gegen  $F_1\alpha$  gerichteten Antikörper (2.5.3).

### 3.2.6 Mdl1 bindet über den F<sub>O</sub>-Sektor an die ATP-Synthase

Die Ergebnisse in 3.2.4 lassen vermuten, dass der F<sub>O</sub>-Sektor für eine Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase notwendig ist. Eine gestörte Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors führt nicht zur Elution von Mdl1 in einer intermediären Komplexgröße, die einer Interaktion mit dem F<sub>1</sub>-Subkomplex entsprechen könnte. Zur weiteren Überprüfung dieser Annahme wurde durch Behandlung des Hefestammes YDG1 mit Ethidiumbromid der Stamm YDG3 erzeugt. Die Überexpression der Mdl1-Variante mit C-terminalem Hexahistidinpeptid (Mdl1<sup>His</sup>) erfolgt hier in Zellen mit fehlender mitochondrialer DNA ( $\rho^0$ ).

Aufgrund des Fehlens der mitochondrial kodierten F<sub>O</sub>-Untereinheiten 6, 8 und 9 der ATP-Synthase erfolgt in  $\rho^0$ -Zellen keine Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors in der inneren Mitochondrienmembran, wohingegen es zu einer Akkumulation von löslichen F<sub>1</sub>-Partikeln kommt (Chen und Clark-Walker, 1999). Es wurden Membranen von isolierten Mitochondrien aus *mdl1*<sup>6His</sup> $\rho^0$ - bzw. *mdl1*<sup>6His</sup> $\rho^+$ -Zellen mit Triton X-100 solubilisiert und mit zuvor äquilibrierten Ni-NTA-Agarosepartikeln inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution des gebundenen Materials mit Imidazol sowie die weitere Analyse durch SDS-PAGE und Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen F<sub>1</sub> $\alpha$  und Mdl1. F<sub>1</sub> $\alpha$  konnte in Membranextrakten von  $\rho^+$ -Mitochondrien zusammen mit Mdl1<sup>His</sup> gefällt werden, war in  $\rho^0$ -Mitochondrien jedoch nicht nachweisbar (Abb. 12). Das Vorhandensein der F<sub>O</sub>-Untereinheit in der Membran ist daher



#### Abb. 12: F<sub>O</sub>-vermittelte Interaktion von Mdl1 und der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

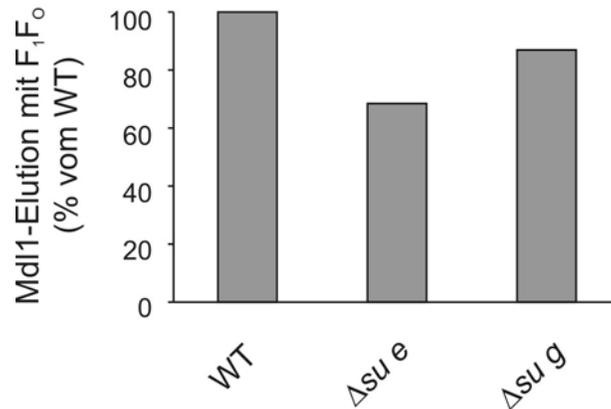
500  $\mu$ g Mitochondrien aus Zellen mit Überexpression von Mdl1<sup>His</sup> und in Gegenwart mitochondrialer DNA ( $\rho^+$ ) oder ohne F<sub>O</sub>-Assemblierung nach DNA-Verlust ( $\rho^0$ ) wurden ohne ATP-Zugabe mit Triton X-100 (0,2%) solubilisiert (5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Die Membranextrakte (T) wurden mit 50  $\mu$ l Ni-NTA-Agarosepartikeln inkubiert (2.3.9), die Elution (E) erfolgte mit 100 mM Imidazol. Nach TCA-Fällung (2.3.2) und SDS-PAGE (2.3.3) wurden F<sub>1</sub> $\alpha$  ( $\alpha F_1\alpha$ ) und Mdl1 ( $\alpha Mdl1$ ) mit spezifischen Antikörpern im Westernblot detektiert (2.5.3).

Voraussetzung für die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Membrandomäne von Mdl1 für die ATP-abhängige Wechselwirkung mit dem  $F_0$ -Sektor des ATPase-Superkomplexes notwendig ist. Tatsächlich zeigt auch ein C-terminales Fragment von Mdl1 bei der Auftrennung im Dichtegradienten keine Fraktionierung mit der ATP-Synthase (Abb. 8).

### **3.2.7 Die Interaktion von Mdl1 mit der $F_1F_0$ -ATP-Synthase erfolgt unabhängig von den nicht essentiellen Untereinheiten e und g**

Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase-Komplexe können als Dimere bzw. in oligomeren Strukturen assoziiert sein (Paumard *et al.*, 2002). Daran sind drei mit  $F_0$  assoziierte Transmembranproteine, Su e, Su g sowie die bisher nur in Hefe gefundene Untereinheit Su k, beteiligt (Arnold *et al.*, 1998). Die  $F_1F_0$ -Superkomplexe spielen vermutlich eine Rolle bei der Ausbildung der Cristae der inneren Mitochondrienmembran und könnten regulatorische Funktionen in Abhängigkeit vom metabolischen Status der Zelle haben (Paumard *et al.*, 2002). Möglicherweise fungieren die nicht essentiellen Untereinheiten selbst als Regulatoren der respiratorischen Aktivität (Levy und Kelly, 1997; Boyle *et al.*, 1999; Hong und Pedersen, 2003). In 3.2.5 konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Mdl1 keinen Einfluss auf die Assemblierung und Dimerisierung des  $F_1F_0$ -Komplexes hat. Die Wechselwirkung der ATP-Synthase mit Mdl1 könnte jedoch eine regulatorische Funktion für den Transporter als auch für die ATP-Synthase einnehmen und möglicherweise von den nicht essentiellen ATP-Synthase-Untereinheiten beeinflusst werden. Daher sollte untersucht werden, wie sich das Fehlen dieser Untereinheiten auf die Interaktion auswirkt.

Die Solubilisierung mitochondrialer Membranen mit Triton X-100 führt überwiegend zur Extraktion monomerer  $F_1F_0$ -Komplexe. Unter diesen Bedingungen sollte die Assemblierung von Mdl1 in dem 850 kDa-Komplex in Abwesenheit von ATP untersucht werden. Die Auftrennung der Membranextrakte erfolgte durch Superose 6-Ausschlusschromatographie. Mit dem Fehlen der Untereinheiten g und e in den Stämmen  $\Delta su g$  und  $\Delta su e$  konnte nur eine geringfügig Beeinträchtigung der Interaktion mit Mdl1 gefunden werden (Abb. 13), was jedoch höchstwahrscheinlich auf die verminderte *in vitro*-Stabilität des ATP-Synthase Komplexes nach der Solubilisierung zurückzuführen ist. Das Fehlen der nicht-essentiellen ATPase-Untereinheiten zeigt demnach keinen Einfluss auf die Assemblierung mit Mdl1.



**Abb. 13: Einfluss der Dimer-spezifischen ATP-Synthase-Untereinheiten auf die Kofraktionierung von Mdl1 mit dem F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Komplex**

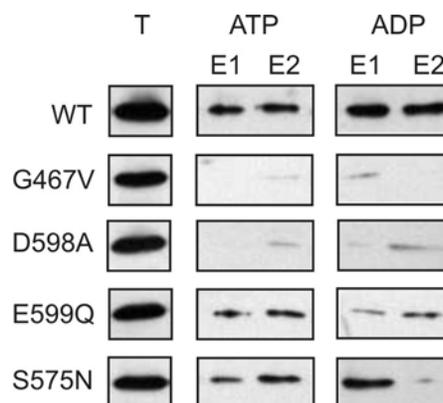
Mitochondrien (600 µg) aus Zellen mit fehlenden Dimer-spezifischen ATP-Synthase-Untereinheiten Su e ( $\Delta su e$ ) und Su g ( $\Delta su g$ ) wurden mit Triton X-100 ohne ATP solubilisiert, die Membranextrakte anschließend auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen (2.3.6) und die Eluatfraktionen mit TCA gefällt (2.3.2). Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper analysiert (2.5.3). Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt ist die Elution von Mdl1 mit F<sub>1</sub>α bei 850 kDa bezogen auf Membranextrakte aus Wildtyp-Zellen (WT).

### 3.2.8 Bedeutung der Mdl1-Aktivität für die Assemblierung mit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Sowohl der F<sub>1</sub>-Sektor der ATP-Synthase wie auch die Nukleotidbindedomäne von Mdl1 besitzen ATPase-Aktivität. Eine nukleotidabhängige Interaktion von Mdl1 mit dem F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase-Komplex könnte durch die Nukleotidbindung einer der Komponenten beeinflusst werden. Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, wie sich eine Inaktivierung der Nukleotidbindung und der ATPase-Aktivität von Mdl1 auf die Assemblierung mit der ATP-Synthase auswirkt. Dazu wurde die Assemblierung der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase mit Mdl1-Varianten, die verschiedene Punktmutationen in den konservierten Nukleotidbindedomänen enthalten, untersucht.

Der Austausch eines hochkonservierten Glycins gegen Valin ( $mdl1^{G467V}$ ) im Walker A-Motiv ("P-Loop"), bzw. das Ersetzen eines Aspartatrestes gegen Alanin ( $mdl1^{D598A}$ ) im Walker B-Motiv sowie von Serin gegen Asparagin ( $mdl1^{S575N}$ ) in der LSGGQ-Signatur führen zum Verlust des Peptidexports aus Mitochondrien durch Mdl1 infolge der Inaktivierung des Transporters (Young *et al.*, 2001). Die Mutation des ersten konservierten Glycins in der Walker A-Sequenz führt auch in TAP1 zum Verlust bzw. zur starken Beeinträchtigung der ATP-Bindung und einem damit einhergehenden Verlust der Peptidbindung (Saveanu *et al.*, 2001). Als weitere Mdl1-Variante wurde

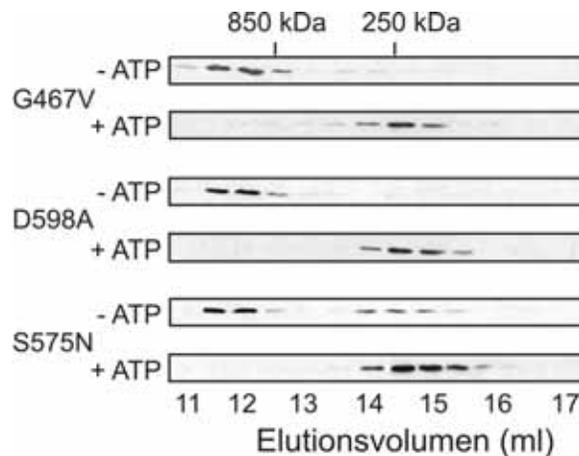
Glutamat gegen Glutamin an Position 599 ausgetauscht (*mdl1*<sup>E599Q</sup>). Diese Mutation führt zu einem fast vollständigen Verlust der ATP-Hydrolyseaktivität isolierter Nukleotidbindedomänen von Mdl1, wohingegen die ATP-Bindung erhalten bleibt (Janas *et al.*, 2003). Um genauere Aussagen über die Mdl1-Varianten treffen zu können, sollte zunächst ihre Nukleotidbindung an einer ATP- bzw. ADP-Agarosematrix überprüft werden. Hierzu wurden Mitochondrien aus den entsprechenden Stämmen isoliert, unter Verwendung von Triton X-100 solubilisiert und mit den Nukleotid-Agarosepartikeln inkubiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe eines Überschusses der entsprechenden Nukleotide bzw. von SDS-Probenpuffer. Die immunochemische Analyse der Eluatfraktionen mit Mdl1-spezifischem Antikörper ergab für Mdl1 ohne Mutation (WT) ein etwas stärkeres Signal für die Bindung an ADP-Agarose (Abb. 14). Die "P-Loop"-Mutation G467V und der Aminosäureaustausch D598A im Bereich des Walker B-Motivs führten zu einem völligen Verlust sowohl der ATP-, wie auch der ADP-Bindung, während die Mutation S575N in der LSGGQ-Signatur eine deutlich geringere Bindung von Mdl1 an ADP- und ATP-Agarose zur Folge hatte (Abb. 14). Gleiches gilt für die Mutation E599Q, obwohl diese nur um eine Aminosäure versetzt zur Position der Walker B-Mutation lokalisiert ist (Abb. 14).



**Abb. 14: Einfluss von Punktmutationen in der Nukleotidbindedomäne von Mdl1 auf die Bindung von ATP- und ADP-Agarose**

Mitochondrien (120 µg) aus Wildtyp-Zellen oder Stämmen mit Überexpression von Mdl1 mit den Punktmutationen G467V, D598A, E599Q und S575N wurden mit Triton X-100 (0,2%) solubilisiert. Die Membranextrakte (5 µg/µl) wurden mit ATP- und ADP-Agarosepartikeln inkubiert (ATP, ADP). Nach dem Waschen wurde das gebundene Material mit einem Überschuss (10 mM) an entsprechendem Nukleotid (E1) und danach mit SDS-Probenpuffer (E2) eluiert (2.3.9). Die Eluatfraktionen wurden TCA-gefällt (2.3.2) und die Proben durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper analysiert (2.5.3).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Nukleotidbindung von Mdl1 auf die Interaktion mit der ATP-Synthase ausübt, wurden Triton-Membranextrakte aus Mitochondrien mit den oben erwähnten Mdl1-Mutationen G467V, D598A und S575N mit und ohne ATP-Zugabe in Superose 6-Gelfiltrationsläufen untersucht. Die verschiedenen Mdl1-Varianten fraktionierten wie das Wildtyp-Protein in der Abwesenheit von ATP bei 850 kDa (Abb. 15). Die Zugabe von ATP führte



**Abb. 15: Inaktivierung von Mdl1 hat keinen Einfluss auf die Kofraktionierung mit der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase**

Mitochondrien (600  $\mu$ g) aus Stämmen, die Mdl1-Varianten mit den Punktmutationen G467V, D598A und S575N überexprimieren wurden mit Triton X-100 (0,2%) ohne bzw. mit ATP-Zugabe (-/+ ATP) solubilisiert. Die Membranextrakte (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) wurden an einer Superose 6-Säule aufgetrennt (2.3.6). Die Proteine in den Eluatfraktionen wurden TCA-gefällt (2.3.2) und die Proben durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper analysiert (2.5.3).

unabhängig von den Mutationen bei allen Proteinvarianten zu einer Elution im niedermolekularen Bereich bei 250 kDa, wie es auch im Wildtyp beobachtet wurde (Abb. 5; Abb. 8). Die Mutationen G467V und D598A führten zu einem vollständigen Verlust der ATP-Bindung. Eine Fraktionierung von Mdl1 im Größenbereich des Monomers, wie man es für das inaktivierte Protein erwarten würde, ist jedoch kaum zu beobachten. Möglicherweise führen die Mutationen zu Konformationsänderungen, die eine Dimerisierung von Mdl1 auch ohne ATP-Bindung zur Folge haben. Möglicherweise ist auch nur die ATPase-Aktivität beeinträchtigt. Nukleotidbindung und Dimerisierung könnten noch erfolgen, während der Nukleotidaustausch erschwert und das Dimer in einem Übergangszustand stabilisiert wäre.

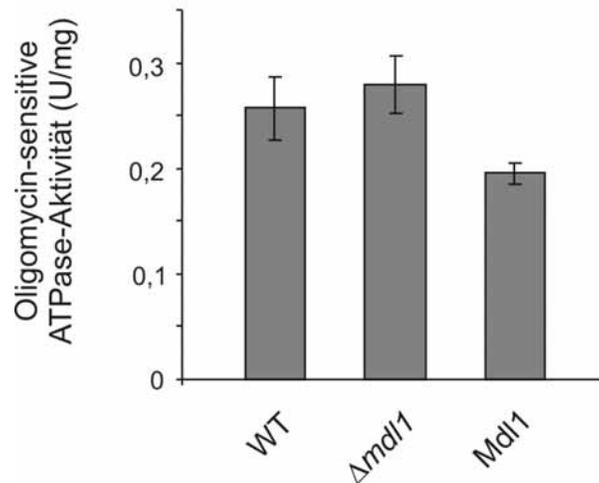
Es kann somit gefolgert werden, dass die erhöhte Affinität von Mdl1 zur ATP-Synthase bei niedrigen ATP-Konzentrationen nicht durch den Nukleotidbindestatus oder die ATP-Hydrolyse des

Transporters beeinflusst wird. Demnach ist die Nukleotidabhängigkeit der Assemblierung vielmehr auf die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase zurückzuführen.

### 3.2.9 Mdl1 zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität der ATP-Synthase

Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase vermittelt unter Ausnutzung des Protonengradienten der mitochondrialen Innenmembran die ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat. Bei Erniedrigung bzw. Entkopplung des Protonengradientens erfolgt bei Umkehr des Protonentransportes ATP-Hydrolyse durch die  $F_1$ -ATPase. Diese kann durch Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphates nach ATP-Zugabe bestimmt werden. Oligomycin bindet an die  $F_0$ -Untereinheit nahe des Protonenkanals, wodurch der Protonentransfer und damit sowohl die Synthese als auch die Hydrolyse von ATP gehemmt wird (Papa *et al.*, 2000). Der freie  $F_1$ -Sektor besitzt ungekoppelt an den Protonentransport ebenso eine ATP-Hydrolyseaktivität, die nicht durch Oligomycin gehemmt wird. Somit ermöglicht die Messung der ATP-Hydrolyse mit und ohne Oligomycin die Unterscheidung zwischen intakter  $F_1F_0$ -ATPase und der Aktivität des dissoziierten  $F_1$ -Sektors sowie anderer ATPasen.

Zur Beantwortung der Frage, ob Mdl1 einen Einfluss auf die Aktivität der ATP-Synthase hat, wurde die Oligomycin-sensitive ATP-Hydrolyseaktivität mitochondrialer Membranen bestimmt. Diese wurden zuvor aus Wildtypzellen sowie Stämmen mit Deletion von *MDL1* ( $\Delta mdl1$ ) und Überexpression des Proteins unter dem ADH-Promotor isoliert. Das Fehlen von Mdl1 zeigte keine Änderung der Oligomycin-sensitiven ATPase-Aktivität, während Überexpression von Mdl1 unter dem ADH-Promotor zu einer leichten Verringerung führte (Abb. 16). Der signifikante Unterschied zum Wildtyp und zu  $\Delta mdl1$  nach Überexpression ist jedoch sehr gering. Möglicherweise handelt es sich hierbei lediglich um einen indirekten Effekt der Protein-Überexpression. Die unveränderte Oligomycin-Sensitivität der ATP-Synthase in  $\Delta mdl1$  zeigt, dass die Assemblierung von  $F_1$  und  $F_0$  nicht beeinträchtigt ist, was in Übereinstimmung zu vorangegangenen Untersuchungen steht (vgl. 3.2.5). Da das Fehlen von Mdl1 keinen Einfluss auf die spezifische ATPase-Aktivität des  $F_1F_0$ -Komplexes hat, übt der Transporter offenbar keine regulatorische Funktion auf die ATP-Synthase aus. Durch direkte Interaktion wäre dies auch unwahrscheinlich, da ein stöchiometrisches Missverhältnis vorliegt, in dem die Menge an  $F_1F_0$ -Komplexen das Expressionsniveau von Mdl1 mindestens um den Faktor 30 übersteigt (Ghaemmaghami *et al.*, 2003).



**Abb. 16: Mdl1 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Oligomycin-sensitiven  $F_1F_0$ -ATP-Synthase**

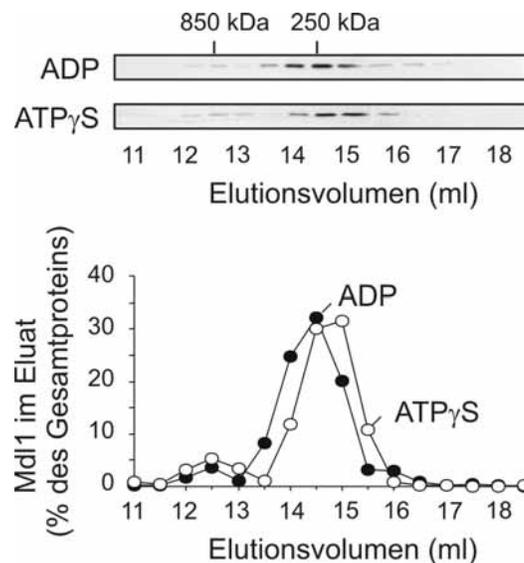
Die spezifische Aktivität für die ATP-Hydrolyse der  $F_1F_0$ -ATPase wurde an mitochondrialen Membranen (200  $\mu$ g) aus Wildtyp-Zellen (WT) sowie aus Stämmen gemessen (2.3.13), die eine Deletion von *MDL1* ( $\Delta mdl1$ ) tragen bzw. Mdl1 unter dem ADH-Promotor überexprimieren (Mdl1). Dargestellt ist die Differenz der Messungen ohne und mit Zugabe von Oligomycin (4  $\mu$ g/ml). Die spezifische Aktivität wurde in U/mg Protein als Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

### 3.2.10 Die $F_1F_0$ -ATPase-Aktivität beeinflusst die Interaktion mit Mdl1

Die Aktivität des  $F_1F_0$ -ATP-Synthase-Komplexes wird überwiegend durch den Protonengradienten an der mitochondrialen Innenmembran beeinflusst (Schoupe *et al.*, 1999). Dabei spielen der ATPase-Inhibitor Inh1 sowie zwei zusätzliche Proteine in *S. cerevisiae* eine entscheidende Rolle, indem sie die ATP-Hydrolyse-Aktivität des Enzyms bei verringertem Protonengradienten hemmen (Hashimoto *et al.*, 1983; Venard *et al.*, 2003). Es konnte aber auch der Einfluss von Nukleotiden auf die Enzymaktivität nach Verlust des Protonengradienten gezeigt werden. Die Gegenwart von ATP oder ADP führt zu einer verstärkten ATPase-Deaktivierung, möglicherweise über Konformationsänderungen des ATPase-Inhibitor-Komplexes (Galante *et al.*, 1981; Schoupe *et al.*, 1999).

Da die ATP-abhängige Dissoziation von Mdl1 vom  $F_1F_0$ -Komplex unabhängig von der ATP-Bindung an Mdl1 erfolgt, könnte die Nukleotidbindung bzw. die Aktivität der ATP-Synthase von Bedeutung sein. ADP und das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon ATP $\gamma$ S sollten zur Inaktivierung der  $F_1F_0$ -ATPase führen. In Gelfiltrationsexperimenten konnte, wie nach Zugabe von ATP, die Elution von Mdl1 bei 250 kDa beobachtet werden (Abb. 17). Das bedeutet, dass

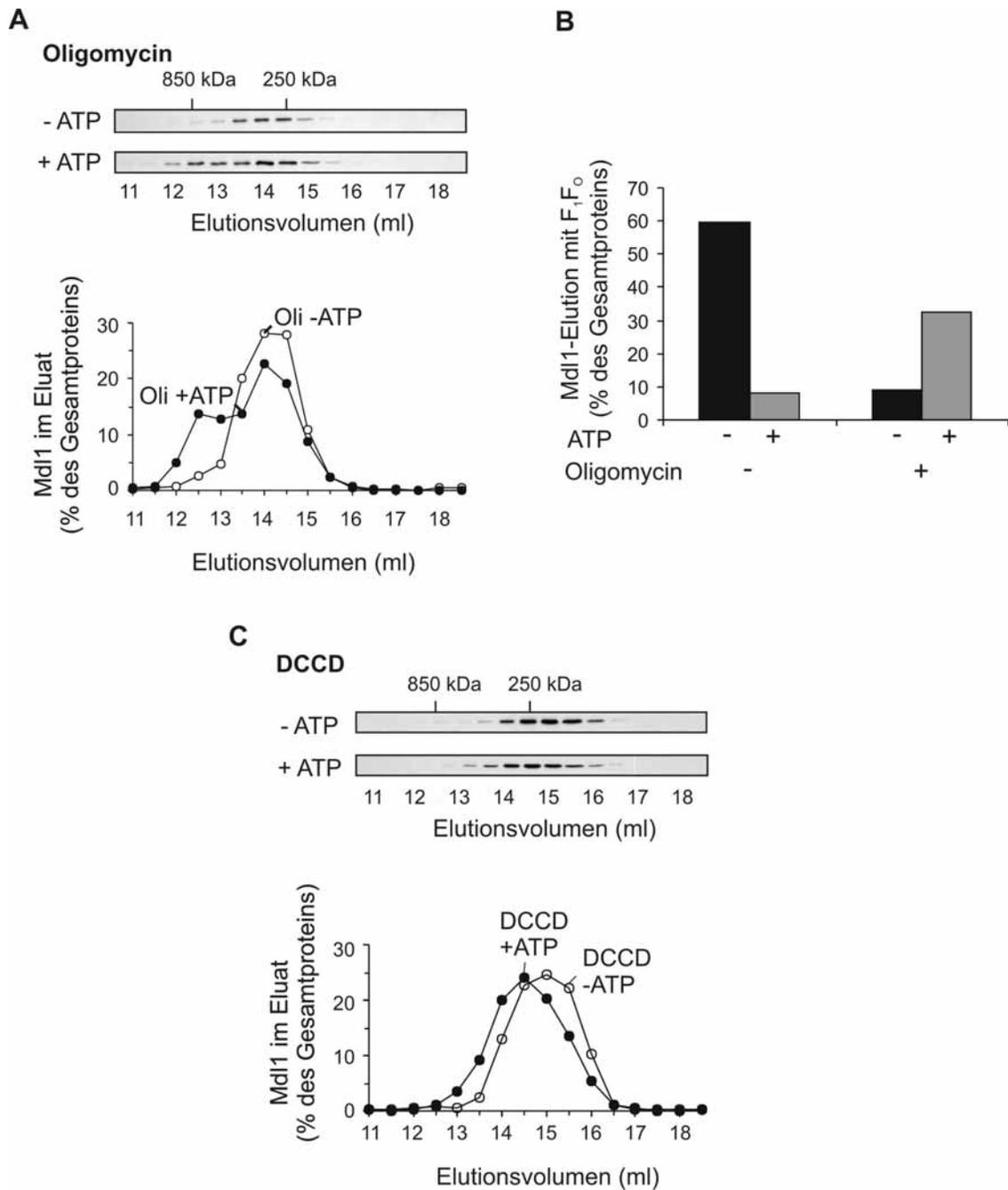
möglicherweise die Inaktivierung der  $F_1F_0$ -ATPase zum Verlust der Interaktion mit Mdl1 führt. Um diese Annahme näher zu überprüfen, wurde der Einfluss spezifischer Inhibitoren der ATP-Synthase auf die Assemblierung des hochmolekularen Komplexes untersucht.



**Abb. 17: Assemblierung von Mdl1 nach Zugabe von ADP bzw. ATP $\gamma$ S**

Mitochondrien (600  $\mu$ g) von Wildtyp-Zellen wurden in Gegenwart von ADP oder ATP $\gamma$ S (je 1 mM) durch Triton X-100 (0,2%) lysiert und die erhaltenen Membranextrakte (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) an einer Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt (2.3.6). Die fraktionierten Proteine wurden TCA-gefällt (2.3.2) und die Proben durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper (oben) analysiert (2.5.3). Die Auswertung der Signale erfolgte densitometrisch und die Elutionsprofile wurden relativ zur Gesamtmenge an Protein im Eluat erstellt (unten).

Neben Oligomycin, das an die  $F_0$ -Untereinheit der ATP-Synthase bindet (Papa *et al.*, 2000), gibt es weitere Substanzen, die die Aktivität des  $F_1F_0$ -Komplexes spezifisch hemmen. So bindet DCCD kovalent an eine an der Protonentranslokation beteiligte Carboxyl-Seitenkette eines konservierten Glutamatrestes (in einigen Organismen Aspartat) in der C-terminalen Transmembran-Helix der Untereinheit 9 (Nicholls und Ferguson, 2001). Mitochondrien wurden nach Zugabe eines der beiden Inhibitoren mit Triton X-100 in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP solubilisiert. Die Membranextrakte wurden dann durch Superose 6-Gelfiltration aufgetrennt und in den Eluatfraktionen enthaltenes Mdl1 nach SDS-PAGE und Membrantransfer immunochemisch detektiert. Inaktivierung der ATP-Synthase sowohl durch Oligomycin als auch durch DCCD führte auch ohne Zugabe von ATP zur Elution von Mdl1 bei 250 kDa, d.h. zu dessen Dissoziation vom  $F_1F_0$ -Komplex (Abb. 18A, 18C). Die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase hängt somit offenbar von deren Aktivität ab.



**Abb. 18: Assemblierung von Mdl1 in Abhängigkeit von der Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase**

Mitochondrien (600  $\mu$ g) aus Wildtyp-Zellen wurden mit (A) Oligomycin (50  $\mu$ g/ml) bzw. (C) mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) (50  $\mu$ M) versetzt. Nach Zugabe (+ATP) oder in Abwesenheit von ATP (-ATP) wurden Triton X-100-Membranextrakte (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) hergestellt und diese an einer Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt (2.3.6). Die fraktionierten Proteine wurden TCA-gefällt (2.3.2) und die Proben durch SDS-PAGE (2.3.3) und Westernblot mit Mdl1-spezifischem Antikörper analysiert (2.5.3).

(B) Quantifizierung der Elution von Mdl1 mit der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase bei 850 kDa ohne und mit Oligomycinzugabe in Gegenwart (+ATP) oder Abwesenheit von ATP (-ATP).

Die Zugabe von ATP in Gegenwart von DCCD hat keinen weiteren Einfluss auf das Elutionsverhalten von Mdl1 (Abb. 18C). Die gleichzeitige Zugabe von Oligomycin und ATP führten dagegen zu einer Umkehr des Oligomycineffektes. Das heißt, ein Teil von Mdl1 assembliert mit dem  $F_1F_0$ -Komplex (Abb. 18A, 18B). Möglicherweise wird hierdurch eine Konformationsänderung an der ATP-Synthase erzeugt, die zur Interaktion mit Mdl1 führt.

### **3.3 Einfluss der $F_1F_0$ -ATP-Synthase auf den durch Mdl1 vermittelten Peptidexport**

#### **3.3.1 Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP-Synthase und der mitochondriale Peptidexport**

Die Ergebnisse in den vorangegangenen Abschnitten lassen vermuten, dass die Interaktion von Mdl1 mit der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase an deren Aktivität gebunden ist. Ihre Hemmung mit spezifischen Inhibitoren wie Oligomycin und DCCD führt zum Verlust der Wechselwirkung mit Mdl1 (Abb. 18). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die ATP-Synthase tatsächlich einen regulatorischen Einfluss auf die Peptidexportfunktion von Mdl1 ausübt. Eine Inaktivierung der ATP-Synthase müsste zu einem Anstieg der Mdl1-Aktivität führen, wenn die Interaktion einen hemmenden Effekt auf die Transporterfunktion haben sollte. Nach Oligomycinzugabe konnte ein solcher Effekt jedoch nicht beobachtet werden (Young *et al.*, 2001).

Mitochondrial kodierte Atmungskettenproteine können in Gegenwart von [ $^{35}$ S]-Methionin in isolierten Mitochondrien durch *in organello*-Translation erzeugt werden (McKee und Poyton, 1984; Black-Schaefer *et al.*, 1991). Da die im Zellkern kodierten Assemblierungspartner fehlen, werden sie durch die AAA-Proteasen abgebaut (Arlt *et al.*, 1996). Ein heterogenes Spektrum von Abbauprodukten wird dabei von den Mitochondrien freigesetzt und kann mittels Gelfiltration analysiert werden (Young *et al.*, 2001). Neben dem vollständigen Abbau zu freien Aminosäuren, der durch ein Elutionsmaximum von [ $^{35}$ S]-Methionin repräsentiert wird, können zwei weitere Maxima mit Oligopeptiden von 600-200 Da und 2100-600 Da unterschieden werden (Young *et al.*, 2001). Mdl1 und die *i*-AAA-Protease sind am Export von Peptiden der Größe 2100-600 Da maßgeblich beteiligt.

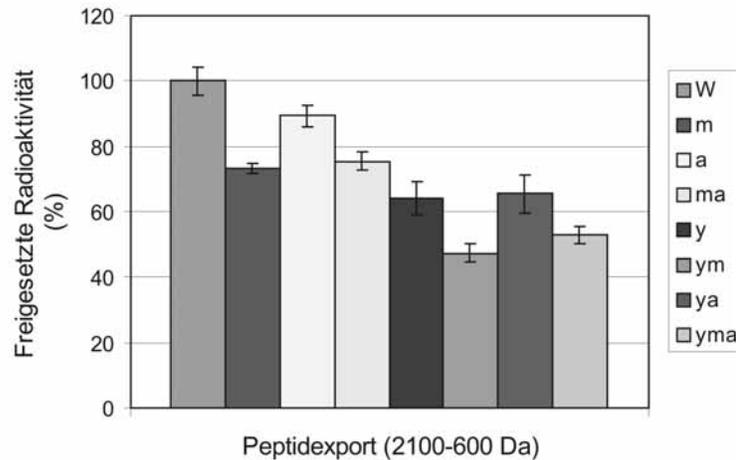
Es erscheint möglich, dass der durch Mdl1 vermittelte mitochondriale Peptidexport durch Störung der Assemblierung der ATP-Synthase beeinflusst wird. Häufig führt eine generelle

Beeinträchtigung einer mitochondrialen Funktion zum Verlust des mitochondrialen Genoms und damit auch zu einer gestörten Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors der ATP-Synthase (Contamine und Picard, 2000). Dabei sollte es in der inneren Mitochondrienmembran vermehrt zum Abbau von an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Proteinkomplexen kommen. Eine zusätzliche Aktivierung von Mdl1 wäre notwendig, um die proteolytischen Abbauprodukte der *m*-AAA-Protease aus der Matrix zu entfernen.

Um den Einfluss einer beeinträchtigten Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors der ATP-Synthase zu überprüfen, sollte der Peptidexport in verschiedenen Stämmen, denen Atp10 fehlt untersucht werden. Atp10 ist ein Chaperon, das an der Integration der F<sub>O</sub>-Untereinheit Atp6 in den Subkomplex beteiligt ist (Tzagoloff *et al.*, 2004). Das Fehlen von Atp10 führt dazu, dass nur noch eine verminderte Zahl an funktionsfähigen ATP-Synthase-Komplexen assembliert werden, während ein großer Anteil frei löslicher F<sub>1</sub>-Subkomplexe vorliegt (vgl. 3.2.5). In solchen Stämmen ist die respiratorische Kompetenz eingeschränkt. Es ergab sich die Frage, inwieweit ein quantitativer Einfluss auf die exportierten Peptide besteht. Ausgehend vom Wildtyp-Stamm und den Stämmen  $\Delta mdl1$  und  $\Delta yme1$  wurden durch Disruption von *ATP10* die Stämme  $\Delta mdl1\Delta atp10$ ,  $\Delta mdl1\Delta yme1$ ,  $\Delta yme1\Delta atp10$  und  $\Delta mdl1\Delta yme1\Delta atp10$  erzeugt und Mitochondrien isoliert. Nach *in organello* Translation in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin und Proteolyse wurde das freigesetzte radioaktive Material im Überstand durch Gelfiltration aufgetrennt (Young *et al.*, 2001). Das Elutionsmaximum bei 2100-600 Da wurde relativ zum Wildtyp quantifiziert und aufgetragen (Abb. 19). Die Deletion von *MDL1* und *YME1* führten zu einem um 30% bzw. 35% verminderten Peptidexport. Das Fehlen beider Proteine zeigt den durch Young *et al.* (2001) beschriebenen kumulativen Effekt, wobei hier ein Rückgang auf unter 50% zu verzeichnen war. Die Abwesenheit von Atp10 hatte eine Verringerung auf 90% im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien zur Folge (Abb. 19). Der weitere Rückgang auf 70% nach zusätzlicher Deletion von *MDL1* ( $\Delta mdl1\Delta atp10$ ) zeigte, dass in  $\Delta atp10$  noch ein durch Mdl1 vermittelter Peptidtransport stattfindet. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *ATP10* im  $\Delta yme1$ -Hintergrund zu keiner weiteren Abnahme des Peptidexports. In der Disruptionsmutante  $\Delta mdl1\Delta yme1\Delta atp10$  kam es zu einer geringfügigen Erhöhung gegenüber  $\Delta mdl1\Delta yme1$  (Abb. 19).

Entgegen den Erwartungen führt die gestörte Assemblierung der F<sub>O</sub>-Untereinheiten nicht zu einem Anstieg des Peptidexports. Ebenso kann der Rückgang des Peptidexports aus Atp10-defizienten Mitochondrien nicht eindeutig auf eine Einschränkung der Aktivität von Mdl1 zurückgeführt werden. In Abwesenheit von Mdl1, wie auch der *i*-AAA-Protease, zeigt die Deletion

von *ATP10* keinen Einfluss auf den Peptidexport. Da die hier gewählten experimentellen Bedingungen nur Peptide von mitochondrial kodierten Proteinen, wie den  $F_0$ -Untereinheiten 6, 8 und 9 der ATP-Synthase berücksichtigen, kann auch ihre generell gestörte Insertion in die Membran bei  $\Delta atp10$ -Zellen zu einem verminderten Abbau durch die AAA-Proteasen und zu dem beobachteten Rückgang im Peptidexport führen.



**Abb. 19: Einfluss der Beeinträchtigung der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in  $\Delta atp10$  auf den Peptidexport bei 2100-600 Da**

Die *in organello*-Translation mitochondrialer Proteine erfolgte in Gegenwart von [ $^{35}$ S]-Methionin in isolierten Mitochondrien. Die Proteolyse der Translationsprodukte wurde anschließend durch Inkubation bei 37°C induziert und die Überstände an einer Superdex-Peptidsäule aufgetrennt (2.4.6). Die Radioaktivität in den Fraktionen wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt (2.4.6). Das exportierte Material im Elutionsmaximum I bei 2100-600 Da wurde relativ zum Wildtyp quantifiziert, jeweils in der Reihenfolge WT (W),  $\Delta mdl1$  (m),  $\Delta atp10$  (a),  $\Delta mdl1\Delta atp10$  (ma),  $\Delta yme1$  (y),  $\Delta yme1\Delta mdl1$  (ym),  $\Delta yme1\Delta atp10$  (ya),  $\Delta yme1\Delta mdl1\Delta atp10$  (yma).

### 3.3.2 Mdl1 zeigt keinen Einfluss auf die Aktivierung des *PDR*-Weges infolge einer Beeinträchtigung des $F_0$ -Sektors der ATP-Synthase

Die Funktion des Peptidexports aus Mitochondrien ist bisher weitgehend unklar. Offenbar dient er der schnellen Freisetzung proteolytischer Abbauprodukte aus der Matrix. In Säugerzellen kann durch Präsentation mitochondrialer Peptid-Antigene an der Zelloberfläche die Integrität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe überwacht werden (Gu *et al.*, 2003). Das Fehlen einer Antigenpräsentation bei Hefezellen lässt vermuten, dass der mitochondriale Peptidexport durch Yme1 und Mdl1 Aufgaben erfüllt, die möglicherweise auch der Kontrolle der mitochondrialen Funktion dienen. In *S. cerevisiae* sind zwei von den Mitochondrien ausgehende (retrograde) Signal-

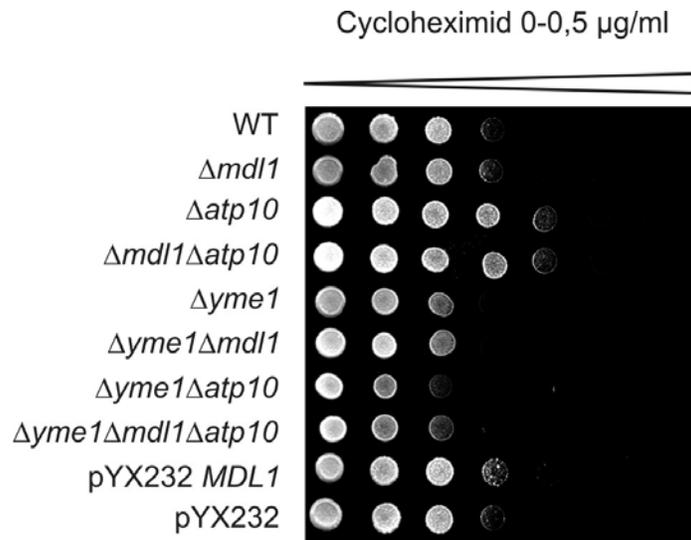
wege, der *RTG*- und der *PDR*-Weg, am besten untersucht, die durch Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung aktiviert werden: Über den *RTG*-Weg wird durch die Transkriptionsfaktoren Rtg1 und Rtg3 die Genexpression von Enzymen mit anaplerotischen Funktionen für den Citratzyklus reguliert. (Liu und Butow, 1999). Im *PDR*-Weg führt der Verlust der mitochondrialen DNA oder eine Störung in der Assemblierung von Atmungskettenkomplexen zur posttranslationalen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pdr3, der u.a. die Induktion des Resistenz-vermittelnden ABC-Transporters Pdr5 bewirkt (Hallstrom und Moyer-Rowley, 2000). Als Folge zeigen die Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Substanzen wie Oligomycin oder Cycloheximid. Wie die Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem Zellkern abläuft, ist bisher nicht bekannt. Zhang und Moyer-Rowley (2001) zeigten, dass eine Beeinträchtigung in der Assemblierung des  $F_0$ -Sektors der ATP-Synthase zur Aktivierung des Signalweges und zur Cycloheximidresistenz infolge der Expression von Pdr5 führt.

Es ist denkbar, dass die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase eine Rolle in der retrograden Aktivierung von Pdr3 spielt und daher Peptide die Signalfunktion in diesem Weg darstellen. Nachfolgend wurde untersucht, wie sich das Fehlen von Mdl1 bzw. Yme1 in Stämmen ohne und mit Beeinträchtigung der Assemblierung des  $F_0$ -Subkomplexes der ATP-Synthase auf deren Wachstum auf YPD-Medium mit steigender Konzentration von Cycloheximid auswirkt. Dazu wurden die Stämme W303-1A,  $\Delta md11$  und  $\Delta atp10$  sowie  $\Delta md11\Delta atp10$  verwendet. Die fehlende Expression von *ATP10* führt zu einer gestörten Biogenese von  $F_0$  (Tzagoloff, 2004) und somit zur Aktivierung von Pdr3 (Zhang und Moyer-Rowley, 2001). Der Stamm  $\Delta atp10$  zeigt demnach auch eine erhöhte Cycloheximidtoleranz (Abb. 20). Die Deletion von *MDL1* hat im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Toleranz gegenüber Cycloheximid zur Folge. Ebenso konnte nach Überexpression des Transporters keine Veränderung in der Cycloheximidresistenz verglichen zur Vektorkontrolle beobachtet werden (Abb. 20). Die Doppelmutation  $\Delta md11\Delta atp10$  zeigt dementsprechend keinen Unterschied zum Stamm  $\Delta atp10$ .

Um den Einfluss der *i*-AAA-Protease zu untersuchen, wurden die entsprechenden Stämme mit zusätzlicher Deletion von *YME1* ( $\Delta yme1$ ,  $\Delta yme1\Delta md11$ ,  $\Delta yme1\Delta atp10$  und  $\Delta yme1\Delta md11\Delta atp10$ ) verglichen. In Übereinstimmung mit Zhang und Moyer-Rowley (2001) wurde eine ähnliche Resistenz von Wildtyp und  $\Delta yme1$  gegenüber Cycloheximid beobachtet. Gleiches gilt für die Doppelmutation  $\Delta yme1\Delta md11$  (Abb. 20). Abwesenheit der *i*-AAA-Protease bei gleichzeitiger Störung der  $F_0$ -Assemblierung ( $\Delta yme1\Delta atp10$ ) führt im Gegensatz zu  $\Delta atp10$  zu keiner erhöhten

Cycloheximidresistenz. Ebenso verhält sich der Stamm mit zusätzlicher Deletion von *Mdl1* (Abb. 20).

*Mdl1* übt offensichtlich keinen Einfluss auf den durch *Pdr3* vermittelten retrograden Signalweg aus. Jedoch führt die Abwesenheit der *i*-AAA-Protease zum Verlust der Cycloheximidresistenz bei gestörter Biogenese des  $F_0$ -Sektors der ATP-Synthase im Stamm  $\Delta yme1\Delta atp10$ .



**Abb. 20: Cycloheximidresistenz in Abhängigkeit der Assemblierung der  $F_0$ -ATP-Synthase und der Einfluss von *Mdl1* und der *i*-AAA-Protease**

Die Stämme Wildtyp (WT),  $\Delta mdl1$ ,  $\Delta atp10$ ,  $\Delta mdl1\Delta atp10$ ,  $\Delta yme1$ ,  $\Delta yme1\Delta mdl1$ ,  $\Delta yme1\Delta atp10$ ,  $\Delta yme1\Delta mdl1\Delta atp10$  sowie der *Mdl1* Überexpressionsstamm pYX232-*MDL1* und die Vektorkontrolle (pYX232) wurden über Nacht in YPD-Flüssigmedium bis zu einer  $OD_{600} \sim 1$  kultiviert und Zellen entsprechend einer  $OD_{600} = 0,8$  in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Je 5  $\mu$ l Zellsuspension wurden auf einer YPD-Platte mit ansteigender Cycloheximidkonzentration (0-0,5  $\mu$ g/ml) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 4 Tage bei 30°C.

## 4 Diskussion

### 4.1 Nukleotidbindung und Dimerisierung von Mdl1

In der vorliegenden Arbeit wurde der mitochondriale ABC-Transporter Mdl1 in *S. cerevisiae* biochemisch näher charakterisiert. In Gelfiltrationsexperimenten eluiert Mdl1 nach ATP-Zugabe als 250 kDa-Komplex. Das Volllängenprotein bildet in Gegenwart von ATP ein Homooligomer, das offenbar dem funktionellen Dimer entspricht. Die Depletion von ATP führt weitestgehend zum Verlust der Interaktion, während unter diesen Bedingungen Mdl1 in einem hochmolekularen Komplex vorliegt. Die Nukleotidabhängigkeit der Dimerisierung weist auf eine zentrale Rolle der Nukleotidbindedomänen bei diesem Vorgang hin.

Die Nukleotidbindedomänen aller ABC-Transporter, wie auch Mdl1, enthalten konservierte Sequenzen, die für ATP- oder GTP-bindende Proteine typisch sind (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990): Die "Walker A"-Sequenz ist für die Interaktion mit dem Adenin-Ring und den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatresten notwendig, während das "Walker B"-Motiv mit der  $\gamma$ -Phosphatbindung wechselwirkt und an der Hydrolyse beteiligt ist (Schneider und Hunke, 1998). Die LSGGQ-Signatur vermittelt wahrscheinlich die Dimerisierung der Nukleotidbindedomänen, indem sie mit dem  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen ATP der zweiten Domäne in Wechselwirkung tritt (Jones und George, 1999; Smith *et al.*, 2002). Die Mutationen der "Walker"-Motive und der LSGGQ-Signatur führten zur Inaktivierung der Mdl1-Homologe TAP und Ste6 (Berkower und Michaelis, 1991; Browne *et al.*, 1996; Saveanu *et al.*, 2001) sowie zur Beeinträchtigung des Mdl1-vermittelten Peptidexports (Young *et al.*, 2001).

Die ATP- und ADP-Bindung sowie der Einfluss der Mutation konservierter Aminosäurereste innerhalb der Nukleotidbindedomäne von Mdl1 wurde näher untersucht. Mdl1 kann sowohl ATP- wie auch ADP binden, das an Agarosepartikeln immobilisiert ist. Von der ATP-Agarose konnte wider Erwarten weniger Protein eluiert werden. Das ist möglicherweise auf eine niedrigere Affinität des Mdl1-Dimers an der Agarose zurückzuführen, und die Immobilisierung des Nukleotids könnte eine sterische Beeinträchtigung zur Folge haben. Die Mutationen G467V und D598A der konservierten "Walker A"- bzw. "Walker B"-Sequenzen der Nukleotidbindedomäne von Mdl1 führen zu einem vollständigen Verlust der ATP- und ADP-Bindung. Offenbar besitzt das "Walker B"-Motiv auch Funktionen in der Stabilisierung des Nukleotids im katalytischen Zentrum. Die

Mutation S575N in der LSGGQ-Signatur zeigt keinen Einfluss auf die ATP-Bindung, während die Wechselwirkung mit ADP beeinträchtigt ist. Demnach kann Nukleotidbindung stattfinden, offensichtlich jedoch keine Dimerisierung sowie ATP-Hydrolyse. Die Mutation E599Q entspricht einem Austausch des hoch konservierten Glutamatrestes C-terminal des "Walker B"-Motivs durch Glutamin. Auch hier kann Nukleotidbindung beobachtet werden, die nur leicht beeinträchtigt ist. Dies stimmt mit Beobachtungen an den isolierten Nukleotidbindedomänen von Mdl1 überein, bei denen die Mutation E599Q zu einer Hemmung der ATP-Hydrolyse führt, wobei ein dimerer, ATP-bindender Übergangszustand stabilisiert wird (Smith *et al.*, 2002; Janas *et al.*, 2003).

Der Befund einer Homodimerisierung von Mdl1 in Gegenwart von ATP und die Dissoziation des Komplexes nach ATP-Depletion steht demnach im Einklang mit dem für die isolierten Nukleotidbindedomänen beschriebenen ATPase-Zyklus (Janas *et al.*, 2003). Hier erfolgt die Stabilisierung des ATP-induzierten Dimers mittels  $\text{BeF}_x$  bzw. einer durch Mutation beeinträchtigten ATPase-Aktivität, während ATP-Hydrolyse zur Dissoziation führt. Ausgehend von Beobachtungen an isolierten Nukleotidbindedomänen weiterer Transporter sowie der Struktur der Vollängenproteine MsbA und BtuCD wurde ein Modell zur Funktionsweise von ABC-Transportern aufgestellt, das von einer abwechselnden Assoziation und Dissoziation der Nukleotidbindedomänen ausgeht (Gaudet und Wiley, 2001; Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Locher *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003). Dabei werden die Membrandomänen entsprechend zusammengeführt bzw. voneinander getrennt und ermöglichen so den Transport an der Membran. Entsprechend der Beobachtung von Janas *et al.* (2003) für die isolierten Nukleotidbindedomänen sollte Mdl1 bei der Dimerisierung in Gegenwart von ATP ein Molekül des Nukleotids je ABC-Domäne gebunden haben. Im Gegensatz zu den isolierten löslichen Domänen konnte in dieser Arbeit für das Vollängenprotein eine Dimerisierung auch in Gegenwart des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  mit etwa gleicher Effizienz wie mit ATP beobachtet werden. Die Interaktion zweier Mdl1-Monomere erfolgt offensichtlich unabhängig von der ATP-Hydrolyse. Die Beobachtung stützt die Annahme, dass es sich bei dem in Gegenwart von ATP isolierten Dimer um das ATP/ATP-Intermediat des Transporters handelt (vgl. Abb. 2).

Schließlich stellt sich die Frage, warum das Mdl1-Vollängenprotein im Gegensatz zu den isolierten Nukleotidbindedomänen als stabiles Dimer isoliert werden kann. Ähnlich wie für den TAP-Transporter beschrieben (Chen *et al.*, 2003), sollte auch bei Mdl1 die Peptidbindung zur Stimulierung der ATPase-Aktivität führen. Da mit der Extraktion von Mdl1 aus der Mitochondrienmembran die Peptidsubstrate stark verdünnt vorliegen, könnte dies die ATPase-

Aktivität beeinträchtigt und durch Stabilisierung des Übergangszustandes die Isolierung des Dimers in Gegenwart von ATP erklären. In Abwesenheit von ATP würde hingegen durch den Verdünnungseffekt bei der Solubilisierung die Freisetzung von ADP und  $P_i$  begünstigt. Dabei kommt es zur Dissoziation der ABC-Domänen, was eine verminderte Interaktion der Transmembrandomänen zur Folge hat und die vorwiegende Isolierung von Mdl1-Monomeren erklären würde.

## 4.2 Komplexbildung von Mdl1 in Abhängigkeit der Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP-Synthase

Die Ausbildung des hochmolekularen Mdl1-Komplexes erfordert die vollständige Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. Dies wird u.a. dadurch bestätigt, dass Mdl1 beim Fehlen der Assemblierungsfaktoren Atp10 und Atp12, die an der Biogenese der ATP-Synthase beteiligt sind (Ackerman, 2002; Tzagoloff *et al.*, 2004), als 250 kDa-Komplex vorliegt. Da die *m*-AAA-Protease ebenfalls an der Assemblierung der ATP-Synthase beteiligt ist (Arlt *et al.*, 1998), führt ihre Abwesenheit auch zum Verlust der Assemblierung des hochmolekularen Mdl1-Komplexes. Gleiches gilt für die proteolytische Inaktivierung der Untereinheiten der *m*-AAA-Protease. Eine direkte Wechselwirkung von Mdl1 mit der *m*-AAA-Protease konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch hat die Deletion von *MDL1* selbst keinen Einfluss auf die Ausbildung des ATP-Synthase-Komplexes.

Der Einfluss der proteolytischen Aktivität der *m*-AAA-Protease auf den Assemblierungsstatus der ATP-Synthase wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Paul und Tzagoloff (1995) beschreiben eine Beeinträchtigung der Assemblierung des  $F_1$ -Sektors der ATP-Synthase durch Deletion von *YTA10* oder *YTA12* nach Ultraschall-Aufschluss der Mitochondrien und anschließender Dichtegradientenzentrifugation. Demnach verhindert, ähnlich wie in  $\Delta$ *atp12*-Mitochondrien, das Fehlen von  $F_1$  die Integration der  $F_0$ -Untereinheiten in die Membran, womit es zur Beeinträchtigung der Biogenese der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase kommt. Anders als von Paul und Tzagoloff (1995) beobachtet, konnte in mitochondrialen Triton X-100-Extrakten eine  $F_1$ -Assemblierung sowohl nach Disruption von *YTA10* und *YTA12*, als auch in Gegenwart der proteolytisch inaktiven Varianten gefunden werden. Dagegen ist die Assemblierung von  $F_1$  mit  $F_0$  beeinträchtigt. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass allein die proteolytische Inaktivierung der *m*-AAA-Protease zum Verlust des  $F_1F_0$ -Komplexes führt. Arlt *et al.* (1998) zeigten bereits, dass

nach proteolytischer Inaktivierung beider Untereinheiten der *m*-AAA-Protease die Expression von Cox1 und Cob und somit die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase und des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes beeinträchtigt ist. Die inaktiven Varianten von Yta10 und Yta12 führen nicht zum vollständigen Verlust des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Komplexes, was, ähnlich wie in *Δatp10*, mit der Elution eines kleinen Teils von Mdl1 im 850 kDa-Komplex einhergeht.

Die Assemblierung des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Komplexes ist offenbar für die Aktivität von Mdl1 nicht essentiell. So kann in Abwesenheit des F<sub>0</sub>-Assemblierungsfaktors Atp10 kein erhöhter Peptidexport durch Mdl1, sondern vielmehr ein leichter Rückgang beobachtet werden. Das kann jedoch auch auf eine Verringerung von mitochondrial kodierten ATP-Synthase-Untereinheiten in *Δatp10*, wie von Tzagoloff *et al.* (2004) beobachtet, zurückzuführen sein. Eine verminderte Expression dieser mitochondrial kodierten Proteine könnte zu einer Abnahme der proteolytischen Abbauprodukte führen, die Mdl1 als Transport-Substrate dienen.

### 4.3 Interaktion von Mdl1 mit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Die Analyse mitochondrialer Extrakte durch Gelfiltration ohne ATP-Zugabe zeigt die Assemblierung von Mdl1 in einem 850 kDa-Komplex. Die Zugabe von ATP führt hingegen zu dessen Dissoziation und zur Elution eines 250 kDa-Komplexes, der vermutlich dem Mdl1-Dimer entspricht. Im Gegensatz dazu kann für Mdl2, das nächste Homolog von Mdl1 in der inneren Mitochondrienmembran, kein hochmolekularer Komplex gefunden werden. Mdl1 besitzt hohe Sequenzhomologie zu den Untereinheiten des TAP-Transporters TAP1 und TAP2. Dieser bildet einen hochmolekularen Peptidladekomplex, der neben MHC I aus verschiedenen Chaperon-ähnlichen Proteinen zusammengesetzt ist (Cresswell *et al.*, 1999). In Gegenwart von ATP dissoziiert der TAP-Transporter von diesem Komplex.

Um die in den Mitochondrien erzeugten Peptide dem Export durch Mdl1 zuzuführen, wäre ein Beteiligung von Chaperonen denkbar. Aber auch die Assoziation mit der *m*-AAA-Protease, an der die durch Mdl1 exportierten Peptide freigesetzt werden, erschien möglich. Der hochmolekulare Komplex wurde nach Expression von Mdl1<sup>His</sup> durch Ni-Affinitätschromatographie gereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die massenspektrometrische Identifizierung der Komplex-bildenden Proteine in Abwesenheit von ATP konnte eine Beteiligung von Chaperonen oder der *m*-AAA-Protease nicht bestätigen. Es wurden jedoch Untereinheiten sowohl des F<sub>0</sub>-, wie des F<sub>1</sub>-Sektors der

ATP-Synthase gefunden, woraus gefolgert werden kann, dass Mdl1 an den assemblierten  $F_1F_0$ -Komplex bindet. In Übereinstimmung mit der Dissoziation des 850 kDa-Komplexes in Gegenwart von ATP konnten unter diesen Bedingungen keine ATP-Synthase-Untereinheiten isoliert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase in Abwesenheit von ATP konnte mittels Dichtegradientenzentrifugation sowie durch BN-PAGE (Ergebnis nicht gezeigt) bestätigt werden. Mdl1 bindet über den  $F_0$ -Sektor an die ATP-Synthase, da beim Verlust der  $F_0$ -Untereinheiten in  $\rho^0$ - oder  $\Delta atp10$ -Mitochondrien keine Interaktion mit dem  $F_1$ -Subkomplex zu beobachten ist. Demnach erfolgt die Wechselwirkung mit  $F_0$  wahrscheinlich über die Transmembrandomäne von Mdl1.

Der  $F_1F_0$ -ATP-Synthasekomplex besitzt ein Molekulargewicht von annähernd 600 kDa (Velours und Arselin, 2000). Die Assoziation mit einem Mdl1-Monomer würde nicht mit der ermittelten Komplexgröße übereinstimmen. Weitere Bindungspartner wurden jedoch nicht gefunden. Die Differenz könnte der Größe des Mdl1-Dimerkomplexes in Gegenwart von ATP entsprechen. Andererseits ist für Membranproteine über diesen experimentellen Ansatz nur eine annähernd genaue Bestimmung des Molekulargewichtes möglich. Durch Micellenbildung bei der Extraktion von Membrankomplexen kann es zu einem veränderten Laufverhalten in der Gelfiltration und zu abweichenden Größenbestimmungen relativ zu löslichen Proteinen kommen (Clarke, 1975). So wird durch Größenbestimmung mittels BN-PAGE ein Komplex bestehend aus Mdl1 und der ATP-Synthase bei 670 kDa und Mdl1 als Dimer bei 200 kDa gefunden (Ergebnis nicht gezeigt).

Während die Größenbestimmung des Komplexes mittels Gelfiltration auf die Bindung eines Mdl1-Dimers hinzuweisen scheint, ist die Dimerisierung von Mdl1 und die daraus folgende Aktivierung der ATP-Hydrolyse für die Wechselwirkung mit der ATP-Synthase offenbar nicht notwendig. So zeigt die Mutation der LSGGQ-Signatur bei erhaltener Fähigkeit zur Nukleotidbindung aber einer beeinträchtigten ATPase-Aktivität der NBD keine Auswirkungen auf die Komplexbildung mit der ATP-Synthase. Das impliziert, dass Mdl1 auch in der monomeren Form binden kann. Eine Beeinträchtigung der Nukleotidbindung an Mdl1 zeigt keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit der ATP-Synthase, da auch nach Mutation der "Walker A"- bzw. "Walker B"-Sequenz der Nukleotidbindedomänen Mdl1 in Gegenwart von ATP von der ATP-Synthase dissoziiert. Demnach sollte der Nukleotidbindungsstatus an  $F_1$  Auswirkungen auf die Wechselwirkung mit Mdl1 haben.

Die Interaktion von Mdl1 mit der ATP-Synthase könnte eine regulatorische Funktion während des Peptidexports durch Mdl1 einnehmen. Da die ATP-Synthase im Vergleich zu Mdl1 mindestens

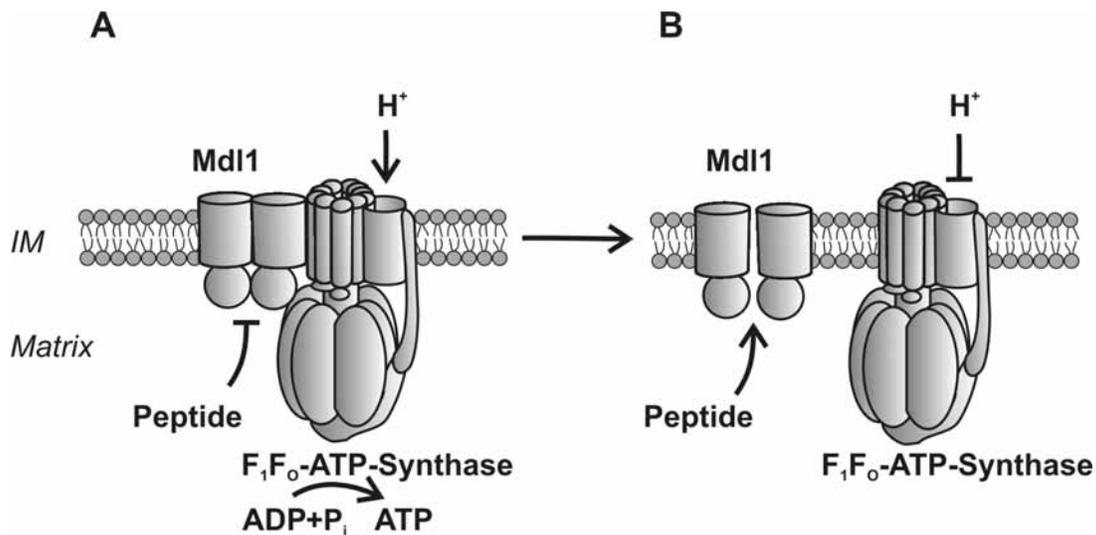
30-fach im molaren Überschuss vorliegt (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), ist anzunehmen, dass eine Regulation der  $F_1F_0$ -ATPase-Aktivität durch Mdl1 auszuschließen ist. Tatsächlich zeigen weder Deletion von *MDL1* noch Überexpression einen Einfluss auf die Oligomycin-sensitive ATPase. Möglicherweise übt die ATP-Synthase eine regulatorische Funktion auf Mdl1 aus, woraus sich eine Verbindung zwischen Peptidexport und oxidativer Phosphorylierung ergeben würde. Nach diesem Modell könnte die Aktivität von Mdl1 an den energetischen Status der Mitochondrien und somit an die respiratorische Aktivität der Zelle gekoppelt sein. Hier erfolgt die Bildung von ATP in Abhängigkeit des Protonengradienten. Eine Verminderung der respiratorischen Aktivität, z.B. unter fermentativen Bedingungen, führt zu einer Abnahme des Protonengradienten, was teilweise eine Umkehr der Reaktion am  $F_1F_0$ -Komplex unter ATP-Hydrolyse wie auch eine Hemmung der ATPase-Aktivität zur Folge haben kann. Konformationsänderungen von  $F_0$  in Abhängigkeit der ATP-Synthase-Aktivität könnten entscheidend für die Interaktion mit Mdl1 sein. Denkbar wäre ein Modell, bei dem die Freisetzung und Aktivierung von Mdl1 durch Inaktivierung der ATP-Synthase erfolgt. Das würde eine zusätzliche Aktivierung des Peptidexports bei beeinträchtigter oxidativer Phosphorylierung ermöglichen, wie es bei der Fehlassemblierung von Atmungskettenkomplexen, z.B. bei oxidativem Stress, oder bei der Anpassung an den fermentativen Stoffwechselweg der Fall ist. In Übereinstimmung mit diesem Modell dissoziiert Mdl1 vom  $F_1F_0$ -Komplex nach Zugabe der an  $F_0$  bindenden ATP-Synthase-Inhibitoren Oligomycin oder DCCD. Das deutet darauf hin, dass Mdl1 mit der aktiven ATP-Synthase in Wechselwirkung tritt. Dem entspricht auch die Freisetzung von Mdl1 nach Zugabe von ATP $\gamma$ S oder ADP. Beide Nukleotide sollten die ATPase-Aktivität von  $F_1F_0$  durch Bindung an das katalytische Zentrum beeinträchtigen und zur Inaktivierung des Enzyms führen. Dagegen steht der ATP-Effekt im scheinbaren Widerspruch zu einer Assoziation von Mdl1 mit der aktiven ATP-Synthase. Obwohl die Hydrolyseaktivität der  $F_1F_0$ -ATPase unter diesen Bedingungen begünstigt sein sollte, dissoziiert Mdl1 vom  $F_1F_0$ -Komplex. Möglicherweise ist dies auf den Einfluss des ATPase-Inhibitorproteins Inh1 zurückzuführen. Inh1 bindet wahrscheinlich, wie sein Homolog IF<sub>1</sub> im Rind, bei Abnahme des pH in der Matrix an  $F_1$  und wirkt so einer unkontrollierten ATP-Hydrolyse entgegen (Hashimoto *et al.*, 1981; Hashimoto *et al.*, 1990; Mimura *et al.*, 1993; Cabezón *et al.*, 2002). IF<sub>1</sub> bindet als Dimer, ausgelöst durch eine pH-abhängige Konformationsänderung des Peptids (Cabezón *et al.*, 2001). Galante *et al.* (1981) zeigten, dass die Hemmung der ATP-Synthase in Gegenwart von ATP beschleunigt wird, und schlugen vor, dass ATP der Auslöser für die Überführung des aktiven  $F_1$ -IF<sub>1</sub>-Komplexes in die inaktive Form ist. Auch Schoupe *et al.* (1999) konnten eine Inaktivierung der ATPase in Gegenwart von ATP bei

fehlendem Membranpotential (Lyse der Mitochondrien) gefolgt von einer allmählichen Reaktivierung finden. Letztere ist vermutlich auf die anschließende Dissoziation des Inhibitorproteins vom  $F_1F_0$ -Komplex zurückzuführen (Schoupe *et al.*, 1999). Die Funktion von ATP bei der ATPase-Inaktivierung durch Inh1 könnte einerseits in der Bindung des Nukleotids im aktiven Zentrum liegen, andererseits könnte auch ein Übergangszustand seiner katalytischen Umsetzung eine wichtige Rolle spielen. Schoupe *et al.* (1999) konnten zeigen, dass auch AMPPNP als nicht hydrolysierbares ATP-Homolog die Inaktivierung begünstigt und somit die Nukleotidbindung ausreichend ist. Letzteres steht mit den hier erhaltenen Daten insofern in Übereinstimmung, dass  $ATP\gamma S$  ebenfalls zu einem Verlust der Interaktion zwischen Mdl1 und der ATP-Synthase führt. Offensichtlich bewirkt die Gegenwart von ATP eine Inaktivierung der ATP-Synthase und die Freisetzung von Mdl1. Andererseits scheint die Bindung des Inhibitorproteins Inh1 nicht unmittelbar die Dissoziation des Transporters vom  $F_1F_0$ -Komplex zu bewirken, da die Deletion des *INH1*-Gens die Bildung des hochmolekularen Komplexes in Gegenwart von ATP nicht begünstigt (Ergebnis nicht gezeigt). Möglicherweise liegt der Wechselwirkung mit Mdl1 eine komplexe Konformationsänderung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase zu Grunde. So sind außerdem die Peptide STF1 und STF2 an der Hemmung der ATPase-Aktivität beteiligt (Cabezón *et al.*, 2002). Ebenso wenig kann dieses Modell die teilweise Wiederherstellung der Bindung von Mdl1 an die ATP-Synthase bei Oligomycinzugabe in Gegenwart von ATP erklären. Offensichtlich liegt dieser Beobachtung ein sekundärer Effekt zu Grunde.

Es scheint denkbar, dass andere Proteinkomponenten, wie die nicht-essentiellen Untereinheiten der ATP-Synthase einen direkten Einfluss auf die Komplexbildung haben. So bildet die ATP-Synthase in Hefe, vermittelt durch die nicht-essentiellen Untereinheiten e und g, dimere Superkomplexe (Arnold *et al.*, 1998). Als Funktion einer solchen Dimerisierung wird angenommen, dass sie bei der Ausbildung der mitochondrialen Cristae eine Rolle spielt (Paumard *et al.*, 2002; Arselin *et al.*, 2004). Aber auch eine Regulation der  $F_1F_0$ -ATPase-Aktivität durch die Untereinheit e wird diskutiert (Dienhart *et al.*, 2002). Dem entsprechen experimentelle Befunde von Levy und Kelly (1997), die eine verminderte Transkription von für e kodierende mRNA in myotubulären Zellen, ausgelöst durch Hypoxie, zeigen. Sowohl e, wie auch g sind mit dem  $F_0$ -Sektor der ATP-Synthase assoziiert. Sie könnten also ähnlich der Dimerisierung des  $F_1F_0$ -Komplexes direkt eine Interaktion mit Mdl1 beeinflussen. In dieser Arbeit konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Die Disruptionen der Gene *ATP21* und *ATP20*, die für die Untereinheiten e bzw. g kodieren (Arnold *et al.*, 1997; Boyle *et al.*, 1999), zeigen keinen Effekt auf die Ausbildung des 850 kDa-Komplexes.

Inwieweit andere Untereinheiten die Wechselwirkung mit Mdl1 steuern, müsste durch Quervernetzungsexperimente des hochmolekularen Komplexes näher untersucht werden.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten auf eine Interaktion von Mdl1 mit der aktiven Form der ATP-Synthase schließen, während deren Inaktivierung zur vollständigen Dissoziation von Mdl1 führt (Abb. 21). Der Mdl1-F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Komplex könnte somit der Lokalisierung des Transporters innerhalb bestimmter Subkompartimente der Mitochondrienmembran dienen. Es ist wahrscheinlich, dass Mdl1 nach Dissoziation von der ATP-Synthase aktiviert wird (Abb. 21).



**Abb. 21: Modell der Regulation des Peptidexports durch Mdl1 in Abhängigkeit von der Aktivität der ATP-Synthase**

(A) Die Wechselwirkung von Mdl1 mit der aktiven ATP-Synthase könnte zur Inaktivierung des Transporters führen. (B) Eine verminderte Aktivität der ATP-Synthase (z.B. bei beeinträchtigter oxidativer Phosphorylierung infolge einer gestörten Assemblierung von Atmungskettenkomplexen) könnte die Freisetzung von Mdl1 und eine zusätzliche Aktivierung des Peptidexports zur Folge haben.

Unter diesen Bedingungen konnte das funktionelle Mdl1-Dimer nachgewiesen werden. So könnte der Peptidexport in Abhängigkeit der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien kontrolliert werden. Allerdings führte die Hemmung der ATP-Synthase mit Oligomycin zu keinem Anstieg des Peptidexports (Young *et al.*, 2001). Ursache hierfür könnte sein, dass nach *in organello*-Synthese der mitochondrialen Translationsprodukte und der gestörten Assemblierung der Atmungskettenkomplexe die Transportaktivität von Mdl1 bereits maximal ist. Andererseits führt die Überexpression von Mdl1 auch nicht zu einem erhöhten Peptidexport (Young *et al.*, 2001), was auf eine Limitierung in der Bereitstellung der Transport-Substrate deutet. Eine mögliche Kopplung des Peptidexports an die respiratorische Aktivität der Mitochondrien wird von experimentellen Daten

von Chloupková *et al.* (2003) gestützt. Diese deuten auf eine Funktion von Mdl1 bei der Reaktion der Zelle auf oxidativen Stress. Als Ursache für die Suppression der oxidativen Stress induzierenden Mutation  $\Delta atm1$  durch Überexpression von Mdl1 vermuten sie die Fähigkeit, mehr Abbauprodukte der *m*-AAA-Protease aus den Mitochondrien zu transportieren und damit eine erhöhte Stresstoleranz herbeizuführen. Möglicherweise wird Mdl1 bei Schädigung von Atmungskettenkomplexen oder mit dem Wechsel zum fermentativen Stoffwechsel aktiviert. In beiden Fällen kommt es zur Inaktivierung der ATP-Synthase und es werden vermehrt Atmungskettenproteine abgebaut. Tatsächlich stammt eine Vielzahl der aus den Mitochondrien exportierten Peptide aus dem Abbau von Proteinkomplexen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind (Augustin *et al.*, 2004; zur Veröffentlichung eingereicht).

#### 4.4 Mögliche Funktionen des mitochondrialen Peptidexports

Nach den hier diskutierten Modellvorstellungen sollte eine verminderte oxidative Phosphorylierung über eine verringerte Aktivität der ATP-Synthase zur Aktivierung von Mdl1 führen. Damit würden vermehrt Abbauprodukte der *m*-AAA-Protease aus den Mitochondrien transportiert werden. Es stellt sich die Frage, ob der Peptidexport durch Mdl1 und die *m*-AAA-Protease lediglich der Eliminierung von Abbauprodukten aus der Matrix dient, oder möglicherweise auch eine intrazelluläre Signalfunktion einnimmt. Dadurch könnte z.B. eine koordinierte Expression von mitochondrial und nuklear kodierten Genen erreicht werden.

Zwischen Mitochondrien und dem Zellkern existieren zahlreiche Signalwege, die die Expression von kernkodierten Genen in Abhängigkeit der mitochondrialen Funktion regulieren (Butow und Avadhani, 2004). Ausgelöst werden diese durch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, z.B. durch Verlust der mitochondrialen DNA. Die mitochondriale Stressantwort, das heißt eine transkriptionale Aktivierung mitochondrialer Chaperone im Zellkern infolge einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine und Störung der Proteinbiosynthese in den Mitochondrien, konnte bisher nur in höheren Eukaryonten gefunden werden (Zhao *et al.*, 2002, Yoneda *et al.*, 2004, Kuzmin *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* ist der RTG-Weg am besten charakterisiert (Liao und Butow, 1993; Liu und Butow, 1999). Dieser wird vermutlich durch eine verminderte zelluläre Glutamatkonzentration infolge einer beeinträchtigten respiratorischen Aktivität der Mitochondrien induziert. Durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Rtg1 und

Rtg3, sowie deren Transfer zum Zellkern, wird die Expression von Enzymen anaplerotischer Funktionen des Citratzyklus eingeleitet. Die Regulation des *RTG*-Signalweges erfolgt auch durch Inaktivierung der Kinasen Tor1/2. Der TOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen des Stickstoff/Kohlenstoff-Metabolismus durch die GATA-Transkriptionsfaktoren Gln3 und Gat1 (Beck und Hall, 1999) in Abhängigkeit der verfügbaren Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle. An Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und oxidativer Stress zur Aktivierung des *RTG*-Weges über mTOR führt (Kim *et al.*, 2002). Das Signal, dass zur Inaktivierung der TOR-Kinase und somit zur Aktivierung von TOR- und *RTG*-Weg führen ist bisher nicht bekannt. Es scheint denkbar, dass von den Mitochondrien exportierte Peptide daran beteiligt sein könnten.

Ein weiteres Beispiel retrograder Regulation von Mitochondrien zum Zellkern in *S. cerevisiae* ist der *PDR*-Weg (Devaux *et al.*, 2002). Der Verlust der mitochondrialen DNA führt dabei zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Pdr1 und Pdr3, die die Genexpression von verschiedenen ABC-Transportern, Permeasen und Proteinen der Membranbiogenese regulieren. Das von den Mitochondrien ausgehende Signal ist unbekannt. Es wäre auch hier denkbar, dass Peptide, die von den Mitochondrien exportiert werden, eine solche Funktion einnehmen. Dieser Idee entspräche, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pdr3 posttranslational erfolgt (Hallstrom und Moye Rowley, 2000). Sie führt u.a. zur erhöhten Expression des ABC-Transporters Pdr5, der Resistenzen gegenüber verschiedene zelltoxische Verbindungen wie Oligomycin oder Cycloheximid vermittelt, indem sie aus der Zelle transportiert werden. Neben dem Verlust mitochondrialer DNA führt auch die gestörte Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase bzw. der ATP-Synthase zur Aktivierung der Expression von *PDR5* durch Pdr3. Letzteres ist für die Disruption von *OXA1* der Fall (Zhang und Moye Rowley, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass allein die fehlerhafte Assemblierung des  $F_0$ -Sektors der ATP-Synthase zur Aktivierung von Pdr3 führt. Die Vermutung, dass Mdl1 über die Interaktion mit der ATP-Synthase am *PDR*-Signalweg beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weder das Fehlen des Transporters in  $\Delta atp10$ -Zellen, noch seine Überexpression zeigten Veränderungen in der Resistenz gegenüber Cycloheximid. Mdl1 liefert jedoch neben der *i*-AAA-Protease nur einen Teil der aus den Mitochondrien exportierten Peptide. Das Fehlen der *i*-AAA-Protease im  $\Delta atp10$ -Hintergrund führt, anders als die Deletion von *MDL1*, tatsächlich zum Verlust der Cycloheximidresistenz, die durch das Fehlen des  $F_0$ -Assemblierungsfaktors induziert wird. Dieser Befund ist insofern interessant, da er dem Ergebnis von Zhang und Moye-Rowley (2001) für die Mutation  $\Delta oxa1\Delta yme1$  gleicht. Die Autoren begründen den Effekt mit einer

teilweisen Wiederherstellung der ATP-Synthase durch Stabilisierung der  $F_0$ -Untereinheiten in  $\Delta oxal1$  nach Deletion von *YME1* (Lemaire, *et al.*, 2000). Gegen die Auswirkung des Assemblierungsstatus der ATP-Synthase spricht das Vorhandensein von reduzierten Konzentrationen an intaktem  $F_1F_0$ -Komplex in  $\Delta atp10$ -Zellen. Die Mutation  $\Delta atp10\Delta yme1$  führt jedoch nicht zu einer Zunahme der  $F_1F_0$ -Assemblierung (nicht gezeigt). Demnach müsste ein anderes Signal in  $\Delta atp10$ -Zellen für die Aktivierung der *PDR5*-Expression durch Pdr3 eine Rolle spielen. Eine interessante Hypothese wäre, den durch die *i*-AAA-Protease freigesetzten Peptiden eine solche Funktion zuzuschreiben. Augustin *et al.* (2004) konnten eine Vielzahl von Peptiden identifizieren, die aus Mitochondrien von *S. cerevisiae* exportiert werden. Es handelt sich dabei u.a. um Abbauprodukte von Atmungskettenkomplexen, die durch die *i*-AAA-Protease erzeugt werden. Durch Mdl1 exportierte Peptide konnten bisher jedoch nicht innerhalb des heterogenen Peptidspektrums abgegrenzt werden. Die Identifizierung solcher Peptide und ihrer möglichen Rezeptoren würden es erlauben, nähere Aussagen über die Funktion des Peptidexports zu treffen. Andererseits könnten diese transportierbaren Substrate direkt in funktionellen Analysen nach der Rekonstitution von Mdl1 in Proteoliposomen genutzt werden.

Über die Signalfunktion von Peptiden innerhalb der Zelle ist bisher nur wenig bekannt. Eine Regulation der Expression durch Peptide wird z.B. für den Peptidtransporter Ptr2 angenommen (Turner *et al.*, 2000). Vermutlich binden und aktivieren dabei in die Zelle importierte Peptide die Ubiquitin-Ligase Ubr1 (Ptr1), was zur Ubiquitinierung und zum Abbau des *PTR2*-Repressors Cup9 führt. Limitierend für diesen Signalweg ist offenbar auch die Halbwertszeit der Peptide. Möglicherweise üben bestimmte Peptid-bindende Proteine eine Schutzfunktion im Cytosol aus. Untersuchungen hierzu wurden von Reits *et al.* (2003) durchgeführt. Sie fanden, dass Peptide durch Diffusion innerhalb der Zelle transportiert werden und so den TAP-Transporter am ER erreichen. Der Abbau der Peptide ist offensichtlich effizienter als ihr Transport und erfolgt stets vom Aminoterminus. Höchstwahrscheinlich spielt die Interaktion von Peptiden mit Chaperonen nur eine untergeordnete Rolle (Reits *et al.*, 2003). Vielmehr binden Peptide im Zellkern an Chromatin-assoziierte Proteine und sind so möglicherweise vor dem Abbau geschützt. Die Hypothese einer Signalfunktion mitochondrialer Peptide innerhalb der Zelle wirft auch die Frage nach der Spezifität eines solchen Signalweges auf, da ein heterogenes Spektrum proteolytischer Abbauprodukte aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Augustin *et al.*, 2004; zur Veröffentlichung eingereicht).

## 5 Zusammenfassung

Der ABC-Transporter Mdl1 ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und vermittelt den Export von Peptiden, die bei der Proteolyse mitochondrialer Proteine durch die *m*-AAA-Protease erzeugt werden. Die biochemische Charakterisierung von Mdl1 und die Identifizierung von Bindungspartnern sollten Hinweise auf die Funktion des mitochondrialen Peptidexports in der Zelle geben.

Mdl1 besitzt in Gegenwart von ATP ein natives Molekulargewicht von 250 kDa, während in Abwesenheit von ATP ein hochmolekularer Komplex von 850 kDa identifiziert werden konnte. Weitere Analysen zeigten, dass Mdl1 nach Zugabe von ATP einen homooligomeren, wahrscheinlich dimeren Komplex in der inneren Mitochondrienmembran bildet. Die Annahme, dass Mdl1 während des Peptidexports direkt mit der *m*-AAA-Protease in Wechselwirkung tritt, konnte nicht bestätigt werden. Die Isolierung des mit Mdl1 assoziierten hochmolekularen Komplexes mittels Affinitätschromatographie und die Analyse der Proteinkomponenten durch MALDI-Massenspektrometrie führten zur Identifizierung von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase als Bindungspartner. Die Inaktivierung der *m*-AAA-Protease führt zum Verlust dieses hochmolekularen Komplexes. Die Ursache hierfür liegt in einer Beeinträchtigung des  $F_1F_0$ -Komplexes, da die Assemblierung des  $F_0$ -Sektors primär von der proteolytischen Aktivität der *m*-AAA-Protease abhängig ist.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Wechselwirkung mit Mdl1 innerhalb der Membran über Untereinheiten des  $F_0$ -Sektors in Abhängigkeit von der ATPase-Aktivität der ATP-Synthase erfolgt. Andererseits zeigen Nukleotidbindung und -hydrolyse von Mdl1 keinen Einfluss auf die Interaktion. Verschiedene Befunde deuten darauf hin, dass Mdl1 in einer inaktiven Form mit dem  $F_1F_0$ -Komplex in Wechselwirkung tritt. Obwohl bisher keine direkten Hinweise dafür gefunden wurden, könnte dies eine Regulation des Peptidexports durch Mdl1 in Abhängigkeit von der Aktivität der ATP-Synthase und somit der respiratorischen Aktivität der Zelle ermöglichen. Dies würde Vermutungen über eine Funktion von Mdl1 bei der Reaktion der Zelle auf oxidativen Stress entsprechen. Unter diesen Bedingungen kommt es vermehrt zum Abbau von Atmungskettenkomplexen und zum Verlust mitochondrialer DNA. Eine Aktivierung von Mdl1 infolge einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung könnte den erhöhten Exportbedarf nach Proteolyse von Atmungskettenkomponenten kompensieren. Hinweise auf eine Signalfunktion des Peptidexports durch Mdl1 zwischen Mitochondrien und Zellkern konnten bisher nicht gefunden werden. Andererseits führt der Verlust der *i*-AAA-Protease zu einer Beeinträchtigung des *PDR*-Signalweges.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abele, R. and Tampé, R. (1999). Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 405-419.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.
- Ackerman, S. H. (2002). Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 101-105.
- Ackerman, S. H. and Tzagoloff, A. (1990a). Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4986-4990.
- Ackerman, S. H. and Tzagoloff, A. (1990b). *ATP10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 9952-9959.
- Alberts, P., Daumke, O., Deverson, E. V., Howard, J. C. and Knittler, M. R. (2001). Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. *Curr Biol* **11**, 242-251.
- Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, A., Schueck, N. D., Dean, M. and Koeller, D. M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Genet.* **8**, 743-749.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 361-398.
- Amuthan, G., Biswas, G., Ananadatheerthavarada, H. K., Vijayasarathy, C., Shephard, H. M. and Avadhani, N. G. (2002). Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* **21**, 7839-7849.
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W. and Langer, T. (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the *m*-AAA protease. *EMBO J.* **17**, 4837-4847.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T. (1996). The YTA10-12-complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**, 875-885.
- Arnold I, Bauer MF, Brunner M, Neupert W, Stuart RA. (1997) Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Lett.* **411**, 195-200.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* **17**, 7170-7178.
- Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J. and Raes, M. (2002). CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J.* **21**, 53-63.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J. (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* **279**, 40392-40399.

- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T. and Casari, G. (2003). Loss of *m*-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* **163**, 777-787.
- Augustin, S., Nolden M., Müller S., Hardt O., Arnold I., Langer T. (2004). Characterisation of peptides released from mitochondria: evidence for constant peptide efflux. (zur Veröffentlichung eingereicht).
- Ausubel, F. J., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Banfi, S., Bassi, M. T., Andolfi, G., Marchitello, A., Zanotta, S., Ballabio, A., Casari, G. and Franco, B. (1999). Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. *Genomics* **59**, 51-58.
- Bauer, B. E., Wolfger, H. and Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 217-236.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-80.
- Beck, T. and Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**, 689-692.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. and Bishop, D. F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256-3264.
- Berkower, C. and Michaelis, S. (1991). Mutational analysis of the yeast *a*-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *Embo J* **10**, 3777-3785.
- Berkower, C., Taglicht, D. and Michaelis, S. (1996). Functional and physical interactions between partial molecules of STE6, a yeast ATP-binding cassette protein. *J Biol Chem* **271**, 22983-22989.
- Black-Schaefer, C. L., McCourt, J. D., Poyton, R. O. and McKee, E. E. (1991). Mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Proteolysis of nascent chains in isolated yeast mitochondria optimized for protein synthesis. *Biochem J.* **274**, 199-205
- Bowman, S., Ackerman, S. H., Griffiths, D. E. and Tzagoloff, A. (1991). Characterization of ATP12, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 7517-7523.
- Boyer, P. D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* **1140**, 215-250.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* **66**, 717-749
- Boyle, G. M., Roucou, X., Nagley, P., Devenish, R. J. and Prescott, M. (1999). Identification of subunit g of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem* **262**, 315-323.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Browne, B. L., McClendon, V. and Bedwell, D. M. (1996). Mutations within the first LSGGQ motif of Ste6p cause defects in *a*-factor transport and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**, 1712-1719.

- Butcher, G. W. and Young, L. L. (2000). Mitochondrially encoded minor histocompatibility antigens. *Landes Bioscience*.
- Butow, R. A. and Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* **14**, 1-15.
- Cabezón E, Butler PJ, Runswick MJ, Carbajo RJ, Walker JE. (2002) Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem*. **277**, 41334-41341.
- Cabezón E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. (2001). The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J*. **20**, 6990-6996.
- Campbell, C. L., Tanaka, N., White, K. H. and Thorsness, P. E. (1994). Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell* **5**, 899-905.
- Casari, G. and Rugarli, E. (2001). Molecular basis of inherited spastic paraplegias. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 336-342.
- Casari, G., De-Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., DeMichele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. and Ballabio, A. (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**, 973-983.
- Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett* **555**, 102-105.
- Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Roninson, I. B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**, 381-389.
- Chen, J., Sharma, S., Quijcho, F. A. and Davidson, A. L. (2001). Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1525-1530.
- Chen, M., Abele, R. and Tampe, R. (2003). Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* **278**, 29686-29692.
- Chen, X. J. and Clark-Walker, G. D. (1999). Alpha and beta subunits of F1-ATPase are required for survival of petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**, 898-908.
- Chloupkova, M., LeBard, L. S. and Koeller, D. M. (2003). MDL1 is a High Copy Suppressor of ATM1: Evidence for a Role in Resistance to Oxidative Stress. *J. Mol. Biol.* **331**, 155-165.
- Clarke, S. (1975). The size and detergent binding of membrane proteins. *J Biol Chem* **252**, 5459-5469.
- Contamine, V. and Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 281-315.
- Coppola, M., Pizzigoni, A., Banfi, S., Casari, G., Bassi, M. T. and Incerti, B. (2000). Identification and characterization of YME1L1, a novel paraplegin related gene. *Genomics* **66**, 48-54.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* **172**, 21-28.
- Csere, P., Lill, R. and Kispal, G. (1998). Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast *Atm1p*. *FEBS Lett.* **441**, 266-270.

- de Jong, M. C., Slootstra, J. W., Scheffer, G. L., Schroeijers, A. B., Puijk, W. C., Dinkelberg, R., Kool, M., Broxterman, H. J., Meloen, R. H. and Scheper, R. J. (2001). Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res* **61**, 2552-2557.
- De Sagarra, M. R., Mayo, I., Marco, S., Rodriguez-Vilarino, S., Oliva, J., Carrascosa, J. L. and Castano, J. G. (1999). Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J Mol Biol* **292**, 819-825.
- Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S. and Strathern, J. (1994). Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* **10**, 377-383.
- Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156-1166.
- Decottignies, A. and Goffeau, A. (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**, 137-145.
- Desautels, M. and Goldberg, A. L. (1982). Liver mitochondria contain an ATP-dependent, vanadate-sensitive pathway for the degradation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1869-1873.
- Devaux, F., Carvajal, E., Moye-Rowley, S. and Jacq, C. (2002). Genome-wide studies on the nuclear PDR3-controlled response to mitochondrial dysfunction in yeast. *FEBS Lett* **515**, 25-28.
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. and Stuart, R. A. (2002). Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem* **277**, 39289-39295.
- Druley, T. E., Stein, W. D. and Roninson, I. B. (2001). Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity. *Biochemistry* **40**, 4312-4322.
- Dubaquie, Y., Looser, R. and Rospert, S. (1997). Significance of chaperonin 10-mediated inhibition of ATP hydrolysis by chaperonin 60. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9011-9016.
- Fischer-Lindahl, K., Byers, D. E., Dabhi, V. M., Hovik, R., Jones, E. P., Smith, G. P., Wang, C. R., Xiao, H. and Yoshino, M. (1997). H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 851-879.
- Galante, Y. M., Wong, S. Y. and Hatefi, Y. (1981). Mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein: reversible interaction with complex V (ATP synthetase complex). *Biochemistry* **20**, 2671-2678.
- Garcia-Alvarez, N., Teichert, U. and Wolf, D. H. (1987). Proteinase yscD mutants of yeast. Isolation and characterization. *Eur J Biochem* **163**, 339-46.
- Gaudet, R. and Wiley, D. C. (2001). Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J* **20**, 4964-4972.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741.
- Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. and Walker, J. E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Biol* **7**, 1055-1061.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Gileadi, U. and Higgins, C. F. (1997). Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter associated with antigen presentation (Tap1) expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**, 11103-11108.

- Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D., Cryer, D. R. and Marmur, J. (1970). The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biol* **52**, 323-335.
- Goldstein, A.L., Pan, X., and McCusker, J.H. (1999). Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 507-511.
- Gorbulev, S., Abele, R. and Tampe, R. (2001). Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3732-3737.
- Gottesmann, S. (1999). Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 142-147.
- Grivell, L. A. (1989). Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem.* **182**, 477-493.
- Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**, 121-164.
- Gu, Y., Wang, C., Roifman, C. M. and Cohen, A. (2003). Role of MHC class I in immune surveillance of mitochondrial DNA integrity. *J. Immunol.* **170**, 3603-3607.
- Guélin, E., Rep, M. and Grivell, L. A. (1996). Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in the degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V. *FEBS Lett.* **381**, 42-46.
- Hallstrom, T. C. and Moye-Rowley, S. W. (2000). Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 37347-37356.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press.
- Harris, M. R., Lybarger, L., Yu, Y. Y., Myers, N. B. and Hansen, T. H. (2001). Association of ERp57 with mouse MHC class I molecules is tapasin dependent and mimics that of calreticulin and not calnexin. *J Immunol* **166**, 6686-6692.
- Hashimoto T, Negawa Y, Tagawa K. (1981). Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J Biochem (Tokyo)*. **90**, 1151-1157.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1983). Binding properties of an intrinsic ATPase inhibitor and occurrence in yeast mitochondria of a protein factor which stabilizes and facilitates the binding of the inhibitor to F1F0-ATPase. *J Biochem (Tokyo)* **94**, 715-720.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1990). Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* **108**, 17-20.
- Herrmann, J. M., Fölsch, H., Neupert, W. and Stuart, R. A. (1994). Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation in Celis, D. E. (Ed), *Cell biology: A laboratory handbook*, Academic Press, pp. 538-544.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**, 205-210.
- Higgins, C. F. and Gottesman, M. M. (1992). Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**, 18-21.
- Higgins, C. F. And Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Biol* **11**, 918-926.

- Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516-521.
- Hogue, D. L., Liu, L. and Ling, V. (1999). Identification and characterization of a mammalian mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *J. Mol. Biol.* **285**, 379-389.
- Holland, I. B. and Blight, M. A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**, 381-399.
- Holland I. B., Cole S. P. C., Kuchler K. And Higgins C. F. (2003) ABC Proteins-From Bacteria to Man. Academic Press, *Elsevier Science*.
- Hong, S. and Pedersen, P. L. (2003). Subunit E of mitochondrial ATP synthase: a bioinformatic analysis reveals a phosphopeptide binding motif supporting a multifunctional regulatory role and identifies a related human brain protein with the same motif. *Proteins* **51**, 155-161.
- Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Ambudkar, S. V., Ko, Y. H., Pedersen, P. L., Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1998). Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites. *J Biol Chem* **273**, 16631-16634.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C. and Tampé, R. (2003). The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ABC transporter Mdl1p. *J. Biol. Chem.* **278**, 26862-26869.
- Jones, P. M. and George, A. M. (1999). Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 187-202.
- Juhola, M. K., Shah, Z. H., Grivell, L. A. and Jacobs, H. T. (2000). The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.* **481**, 91-95.
- Karrasch, S. and Walker, J. E. (1999). Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol* **290**, 379-384.
- Karttunen, J. T., Lehner, P. J., Gupta, S. S., Hewitt, E. W. and Cresswell, P. (2001). Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7431-7436.
- Kelly, A., Powis, S. H., Kerr, L. A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. and Townsend, A. (1992). Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* **355**, 641-644.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-175.
- King, M., Su, W., Chang, A., Zuckerman, A. and Pasternak, G. W. (2001). Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci* **4**, 268-274.
- Kispal, G., Csere, P., Buiard, B. and Lill, R. (1997). The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* **418**, 346-350.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and NFS1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981-3989.

- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. and Goldberg, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- Koopmann, J. O., Post, M., Neefjes, J. J., Hammerling, G. J. and Momburg, F. (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur J Immunol* **26**, 1720-1728.
- Kremmidiotis, G., Gardner, A. E., Settasatian, C., Savoia, A., Sutherland, G. R. and Callen, D. F. (2001). Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics* **76**, 58-65.
- Kuchler, K., Dohlman, H. G. and Thorner, J. (1993). The a-factor transporter (STE6 gene product) and cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 1203-1215.
- Kuchler, K., Sterne, R. E. and Thorner, J. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *Embo J* **8**, 3973-3984.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Kuzmin EV, Karpova OV, Elthon TE, Newton KJ. (2004). Mitochondrial respiratory deficiencies signal up-regulation of genes for heat shock proteins. *J Biol Chem*. **279**, 20672-20677.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U. K., Beguin, F. and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47**, 69-85.
- Langer, T. (2000). AAA proteases - cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 207-256.
- Langer, T. and Neupert, W. (1996). Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia* **52**, 1069-1076.
- Lankat-Buttgereit, B. and Tampe, R. (2002). The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* **82**, 187-204.
- Lapinski, P. E., Neubig, R. R. and Raghavan, M. (2001). Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem* **276**, 7526-7533.
- Leighton, J. and Schatz, G. (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J.* **14**, 188-195.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J. and Dujardin, G. (2000). Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F<sub>0</sub>-ATPase subunit accumulation in an *oxal1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23471-23475.
- Leonhard, K., Guiard, B., Pellechia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W. and Langer, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* **5**, 629-638.

- Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T. (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* **15**, 4218-4229.
- Levy, F. H. and Kelly, D. P. (1997). Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *Am J Physiol* **272**, C457-C465.
- Liao, X. and Butow, R. A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* **72**, 38-46.
- Lill, R. and Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 352-356.
- Lill, R. and Kispal, G. (2001). Mitochondrial ABC transporters. *Res. Microbiol.* **152**, 331-340.
- Lill, R. and Kispal, G. (2003). ABC transporters in mitochondria. in Holland, B. I., Cole, S. P. C., Kuchler, K. and Higgins, C. F. (Eds), *ABC proteins from bacteria to man.*, Academic Press, pp. 515-531.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C. and Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**, 1157-1166.
- Liu, Z. and Butow, R. A. (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* **19**, 6720-6728.
- Locher, K. P., Lee, A. T. and Rees, D. C. (2002). The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091-1098.
- Loo, T. W. and Clarke, D. M. (1994a). Functional consequences of glycine mutations in the predicted cytoplasmic loops of P-glycoprotein. *J Biol Chem* **269**, 7243-7248.
- Loo, T. W. and Clarke, D. M. (1994b). Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J Biol Chem* **269**, 7750-7755.
- Loo, T. W. and Clarke, D. M. (2000). Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein is blocked by disulfide cross-linking between the nucleotide-binding sites. *J Biol Chem* **275**, 19435-19438.
- Mannella, C. A. (1992). The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 315-320.
- McGrath, J. P. and Varshavsky, A. (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* **340**, 400-404.
- McKee, E. E. and Poyton, P. (1984). Mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Optimal conditions for protein synthesis in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**, 9320-9331.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* **12**, 7035-7056.
- member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* **15**, 4441-4452.
- Meredith, D. and Boyd, C. A. (2000). Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell Mol Life Sci* **57**, 754-778.

- Meyer, T. H., van Endert, P. M., Uebel, S., Ehring, B. and Tampe, R. (1994). Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* **351**, 443-447.
- Michaelis, S. and Berkower, C. (1995). Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 291-307.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N. and Tagawa, K. (1993). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha- and beta-subunits of F1FoATPase upon de-energization of mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* **113**, 350-354.
- Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T. and Seino, S. (2000). MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **275**, 17536-17540.
- Moody, J. E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J. F. and Thomas, P. J. (2002). Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* **277**, 21111-21114.
- Mueller, D. M. (2000). Partial assembly of the yeast mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 391-400.
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., and Ohashi, A. (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for the degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome *c* oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4441-4452.
- Neumann, L. and Tampe, R. (1999). Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J Mol Biol* **294**, 1203-1213.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43.
- Nicholls, D. G. And Ferguson S. J. (2001). Bioenergetics 3. Academic Press, *Elsevier Science*, 195-210.
- Nijenhuis, M. and Hämmerling, G. J. (1996). Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol* **157**, 5467-5477.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinosita, K., Jr. (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* **386**, 299-302.
- Ogura, T. and Wilkinson, A. J. (2001). AAA+ superfamily of ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells* **6**, 575-597.
- O'Keefe T., Hill C., Ross R. P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 1506-1515.
- Otto, M. and Gotz, F. (2001). ABC transporters of staphylococci. *Res Microbiol* **152**, 351-356.
- Palkova, Z., Devaux, F., Icovova, M., Minarikova, L., Le Crom, S. and Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* **13**, 3901-3914.
- Pamer, E. and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**, 323-358.

- Papa, S., Zanotti, F. and Gaballo, A. (2000). The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 401-411.
- Paul, M. F. and Tzagoloff, A. (1995). Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit F<sub>1</sub>-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **373**, 66-70.
- Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J. M., Brethes, D. and Velours, J. (2002). Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **41**, 10390-10396.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. and Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221-230.
- Pearce, D. A. and Sherman, F. (1995). Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J. Biol. Chem.* **270**, 1-4.
- Pelham, H. R. and Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **67**, 247-256.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W. and Neeffjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97-108.
- Romsicki, Y. and Sharom, F. J. (2001). Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* **40**, 6937-6947.
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C. and Higgins, C. F. (1997). Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* **272**, 10685-10694.
- Rosenberg, M. F., Velarde, G., Ford, R. C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I. D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K. J. and Higgins, C. F. (2001). Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J* **20**, 5615-5625.
- Rothstein, R. J. and Sherman, F. (1980). Genes affecting the expression of cytochrome *c* in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* **94**, 871-889.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T. and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**, 103-114.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Russel D. W., Irwin N., Janssen K. A. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press., Vol. 1-3

- Sapperstein, S., Berkower, C. and Michaelis, S. (1994). Nucleotide sequence of the yeast STE14 gene, which encodes farnesylcysteine carboxyl methyltransferase, and demonstration of its essential role in a-factor export. *Mol Cell Biol* **14**, 1438-1449.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- Sauna, Z. E. and Ambudkar, S. V. (2001). Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem* **276**, 11653-11661.
- Sauna ZE, Muller M, Peng XH, Ambudkar SV. (2002). Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1). *Biochemistry.* **41**, 13989-4000.
- Saveanu, L., Daniel, S. and van Endert, P. M. (2001). Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem* **276**, 22107-22113.
- Schägger, H. (2001). Blue-native gels to isolated protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* **65**, 231-244.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schmidt, M., Lupas, A. N. and Finley, D. (1999). Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 584-591.
- Schneider, E. and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1-20.
- Schoupe, C., Vaillier, J., Venard, R., Rigoulet, M., Velours, J. and Haraux, F. (1999). Activation and deactivation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase in yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 105-117.
- Senbongi, H., Ling, F. and Shibata, T. (1999). A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA. *Mol Gen Genet* **262**, 426-436.
- Serwold, T., Gaw, S. and Shastri, N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* **2**, 644-651.
- Shah, Z. H., Hakkaart, G. A. J., Arku, B., DeJong, L., Van der Speck, H., Grivell, L. and Jacobs, H. T. (2000). The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast *yme1* disruptant. *FEBS Lett.* **478**, 267-270.
- Sharom, F. J., Liu, R. and Romsicki, Y. (1998). Spectroscopic and biophysical approaches for studying the structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochem Cell Biol* **76**, 695-708.
- Shirihai, O. S., Gregory, T., Yu, C., Orkin, S. H. and Weiss, M. J. (2000). ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *EMBO J.* **19**, 2492-2502.
- Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J. and Hunt, J. F. (2002). ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**, 139-149.

- Sollner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* **62**, 107-115.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Chaignepain, S. and Velours, J. (1998). Topography of the yeast ATP synthase F0 sector by using cysteine substitution mutants. Cross-linkings between subunits 4, 6, and f. *Biochemistry* **37**, 615-621.
- Stahlberg, H., Kutejova, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., Engel, A. and Suzuki, C. K. (1999). Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6787-6790.
- Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T. (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the *m*-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3435-3442.
- Stock, D., Leslie, A. G. and Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705.
- Stueber, D., Ibrahimi, I., Cutler, D., Dobberstein, B. and Bujard, H. (1984). A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences. *Embo J* **3**, 3143-3148.
- Suzuki, C. K., Suda, K., Wang, N. and Schatz, G. (1994). Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**, 273-276.
- Tatsuta, T., Model K. and Langer T. (2004). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. (zur Veröffentlichung eingereicht).
- Taussky, H. H. and Shorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* **202**, 675-685.
- Thorsness, P. E., White, K. H. and Fox, T. D. (1993). Inactivation of *YME1*, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5418-5426.
- Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Bouloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S. and Ogura, T. (1993). Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1352-1357.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Turner, G. C., Du, F. and Varshavsky, A. (2000). Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* **405**, 579-583.
- Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W. and Herrmann, J. M. (2004). Atp10p assists assembly of Atp6p into the FO unit of the yeast mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 19775-19780
- Tzagoloff, A., Yue, J., Jang, J. and Paul, M. F. (1994). A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26144-26151.
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K. H., Jung, G. and Tampé, R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8976-8981.
- Urbatsch IL, Julien M, Carrier I, Rousseau ME, Cayrol R, Gros P. (2000). Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry*. 2000 **39**, 14138-14149.

- Van Dyck, L. and Langer, T. (1999). ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 825-842.
- Van Dyck, L., Neupert, W. and Langer, T. (1998). The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* **12**, 1515-1524.
- Van Dyck, L., Pearce, D. A. and Sherman, F. (1994). PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 238-242.
- Van Endert, P. M. (1999). Role of nucleotides and peptide substrate for stability and functional state of the human ABC family transporters associated with antigen processing. *J Biol Chem* **274**, 14632-14638.
- Van Endert, P. M., Saveanu, L., Hewitt, E. W. and Lehner, P. (2002). Powering the peptide pump: TAP crosstalk with energetic nucleotides. *Trends Biochem Sci* **27**, 454-461.
- Van Endert, P. M., Tampé, R., Meyer, T., Tisch, R., Bach, J. and McDevitt, H. O. (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**, 491-500.
- Velours, J. and Arselin, G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 383-390.
- Venard, R., Brethes, D., Giraud, M. F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* **42**, 7626-7636.
- Vos J. C., Spee P., Momburg F. and Neefjes J. (1999). Membrane Topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol*, **163**, 6679-6685
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W. (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* **13**, 5135-5145.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Wang, J., Hartling, J. A. and Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447-456.
- Weber, E. R., Rooks, R. S., Shafer, K. S., Chase, J. W. and Thorsness, P. E. (1995). Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of *yme1* yeast lacking mitochondrial DNA. *Genetics* **140**, 435-442.
- Weber-Ban, E. U., Reid, B., Miranker, A. D. and Horwich, A. L. (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**, 90-93.
- Wipf, D., Ludwig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. and Frommer, W. B. (2002). Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 139-147.
- Yaffe, M. P. and Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4819-4823.
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S. G., Harding, H. P. and Ron, D. (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci* **117**, 4055-4066.

- Young, J. and Holland, I. B. (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 177-200.
- Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J. and Langer, T. (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**, 2135-2138.
- Zhang, F., Hogue, D. L., Liu, L., Fisher, C. L., Hui, D., Childs, S. and Ling, V. (2000a). M-ABC2, a new human mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *FEBS Lett.* **478**, 89-94.
- Zhang, X. and Moye-Rowley, W. S. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance gene expression inversely correlates with the status of the F(0) component of the mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* **276**, 47844-47852.
- Zhang F, Zhang W, Liu L, Fisher CL, Hui D, Childs S, Dorovini-Zis K, Ling V. (2000b). Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J Biol Chem.* **275**, 23287-23294.
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T. and Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **21**, 4411-4419.
- Zinser, E. and Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 493-536.

## 7 Verwendete Abkürzungen

AAA	<u>A</u> TPases associated with a variety of cellular <u>a</u> ctivities
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
AMPPNP	Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
BN-PAGE	Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DTT	1,5-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin ( <i>M. crenulata</i> )
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
MALDI	"Matrix assisted Laser Dissorption Ionisation"
m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G	7-Methylguanosintriphosphat
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)propylsulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
m/v	Masseanteil
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid

NBD	Nukleotidbindedomäne
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm
Oli	Oligomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PDR</i>	<u>P</u> leiotropic <u>D</u> rug <u>R</u> esistance
PEG	Polyethylenglycol
<i>pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Raumtemperatur
<i>RTG</i>	<u>R</u> etrograde Signalling
SC	synthetisches Vollmedium
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Saccharose/EDTA/β-Mercaptoethanol-Puffer
Su	Untereinheit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
<i>taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	ultraviolett
v/v	Volumenanteil
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glucose-Medium
YPG	Hefeextrakt/Pepton/Glycerin-Medium

## 8 Anhang

### Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit

Galluhn, D. und Langer, T. (2004)

**"Reversible assembly of the ABC-Transporter Mdl1 with the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase in mitochondria"**

*J. Biol. Chem.*, **279**, 38338-38345

Abstract:

The half-ABC transporter Mdl1 is localized in the inner membrane of mitochondria and mediates the export of peptides generated upon proteolysis of mitochondrial proteins. The physiological role of the peptides released from mitochondria is currently not understood. Here, we have analyzed the oligomeric state of Mdl1 in the inner membrane and demonstrate nucleotide-dependent binding to the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. Mdl1 forms homodimeric complexes in the presence of ATP, but was found in association with the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase at low ATP levels. Mdl1 binds membrane-embedded parts of the ATP synthase complex after assembly of the F<sub>1</sub>- and F<sub>0</sub>-moieties. Whereas independent of Mdl1 activity, complex formation is impaired upon inhibition of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase with oligomycin or *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. These results are consistent with an activation of Mdl1 upon dissociation from the ATP synthase and suggest a coupling of peptide export from mitochondria to the activity of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase and the cellular energy metabolism.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Thomas Langer für die Überlassung des Themas, für die Betreuung dieser Arbeit und seinem steten Interesse am Verlauf der Experimente. Besonders geschätzt habe ich die ständige Möglichkeit zur Diskussion wissenschaftlicher Probleme und Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich für die Bereitschaft, die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen, und für seine Beteiligung am 'Thesis Committee'.

Dr. Michael Knittler möchte ich ebenfalls für sein Mitwirken im 'Thesis Committee' danken, für sein stetes Interesse am Verlauf der Arbeit und seine aufmunternde Art.

Besonders möchte ich auch Dr. Takashi Tatsuta danken, der bei allen technischen und experimentellen Problemen stets ein geduldiger Ansprechpartner war. Dr. Isabel Arnold möchte ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Matthias Cramer danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und Problemchen des Institutalltags und für die Unterstützung bei der Betreuung des Kaninchenstalls. Ein Dank gilt auch Dr. Brigitte Kisters-Woike und Susanne Scheffler bei der Lösung organisatorischer Fragen.

Ein großes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter(innen) der Arbeitsgruppen Langer und Dohmen, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die Verbreitung von guter Stimmung zu einem angenehmen Arbeitsumfeld beigetragen haben. Besonders danke ich meinen unmittelbaren Laborkolleg(inn)en Dr. Mafalda Escobar-Henriquez Dias, Martin Graef, Steffen Augustin, Metodi Metodiev, Tanja Engmann und Olaf Hardt, mit denen ich viel gelacht habe, aber auch über Wissenschaft und andere ernste Seiten des Lebens diskutieren konnte. Besonderer Dank gilt auch dem "Zollstock-Team" Mark Nolden und Mirko Koppen, für ihren positiven Einfluss auf das Laborleben und ihre Hilfsbereitschaft, nicht nur beim Korrekturlesen der Arbeit. Vielen Dank auch allen, die an einer kulturellen Bereicherung des Lebens außerhalb des Labors beteiligt waren.

Für die seelische Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten, möchte ich allen Freunden und insbesondere meinen Eltern danken.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Köln im Oktober 2004

Dominik Galluhn

Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit:

Galluhn D. und Langer T. (2004).

*J. Biol. Chem.*, **279**, 38338-38345