

**Untersuchungen zur dimeren Struktur des  
mitochondrialen Phosphatcarriers aus  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Universität zu Köln**

**vorgelegt von**

**François Olivier Deuber**

**aus Zürich**

**Köln, Oktober 2000**

**Berichterstatter:**

Professor Dr. Reinhard Krämer  
Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 14. Dezember 2000

## Into the dimeric structure of the mitochondrial phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae*

The mitochondrial phosphate carrier (PIC) belongs to the mitochondrial carrier family. Members of this family comprise six transmembrane segments and have been shown to exist as dimers in the solubilized state. PIC, a 32 kD-protein with around 300 amino acids, is responsible for the import of anorganic phosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) into the mitochondrial matrix. The phosphate is used for the synthesis of ATP, thus giving PIC an essential role in the energy household of the respirating cell.

The carrier from *Saccharomyces cerevisiae* can be expressed in *Escherichia coli* in inclusion bodies in large amounts and then reconstituted into proteoliposomes in functionally active form. The experimental systems for reconstitution and measurement of the transport activity were revised and modified to yield higher activity and reproducibility. As a tool for further investigation of functional and structural aspects of the protein a tandem fusion dimer of PIC was created genetically (oder besser „on gene-level“?). The expression of the dimer in *S. cerevisiae* and *E. coli* was studied and characterized in detail. Furthermore the dimeric carrier was investigated after functional reconstitution into proteoliposomes.

## Untersuchungen zur dimeren Struktur des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der mitochondriale Phosphatcarrier (PIC) kann der mitochondrialen Carrierfamilie zugeordnet werden. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie bilden sechs transmembrane Bereiche aus und liegen in solubilisierem Zustand in dimerer Form vor. PIC, ein 32 kD-Protein mit etwa 300 Aminosäuren, ist für die Aufnahme von Phosphat ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) in die mitochondriale Matrix verantwortlich. In der weiteren Funktion des Phosphats als Substrat für die ATP-Synthese ist die essentielle Rolle von PIC für den Energiehaushalt der atmenden Zelle begründet.

Der Carrier aus *Saccharomyces cerevisiae* kann in größeren Mengen in *Escherichia coli* exprimiert werden und aggregiert dabei in *inclusion bodies*. In solubilisierter Form kann PIC funktionell aktiv in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Der experimentelle Ansatz für die Rekonstitution und die Messung der Transportaktivität wurde überarbeitet und mit dem Ergebnis verbessert, höhere Transportaktivität und bessere Reproduzierbarkeit zu erzielen. Als Werkzeug für weitere Untersuchungen von funktionellen und strukturellen Aspekten des Proteins wurde ein Dimer von PIC auf genetischer Ebene konstruiert. Die Expression des genetischen Dimers in *S. cerevisiae* und *E. coli* wurde charakterisiert. Darüber hinaus wurde das Dimer funktionell aktiv in Proteoliposomen rekonstituiert und in diesem System untersucht.

---

1	Einleitung	1
1.1	Funktion von Mitochondrien – Stofftransport durch mitochondriale Carrier	1
1.2	Die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie	2
1.3	Die Struktureigenschaften der mitochondrialen Carrierfamilie	4
1.4	Die funktionelle Einheit der mitochondrialen Carrier	5
1.5	Der Phosphatcarrier	6
1.6	Die Funktionsweise des Phosphatcarriers	6
1.7	Heterodimere des Phosphatcarriers	8
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Verwendete Materialien	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Kits	10
2.1.3	Medien	11
2.1.3.1	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	11
2.1.3.2	Medien zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	11
2.1.4	Verwendete Stämme	12
2.1.5	Verwendete Plasmide	12
2.1.6	Verwendete Oligonukleotide	14
2.2	Mikrobiologische Methoden	14
2.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen	14
2.2.2	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	14
2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	15
2.2.4	Dauerkulturen von Bakterien und Hefen	15
2.3	Molekularbiologische Methoden	16
2.3.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	16
2.3.3	Agarosegelelektrophorese	16
2.3.4	Spaltung von Plasmid-DNA	17
2.3.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	17
2.3.6	Ligierung von Plasmid-DNA	17

---

2.3.7	Generierung von gezielten Punktmutationen	17
2.3.8	PCR zur Einführung von zusätzlichen Basenpaarabschnitten	17
2.3.9	Sequenzierung von DNA	18
2.4	Klonierung des genetischen Dimers	18
2.5	Homologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.6	Biochemische Methoden	19
2.6.1	SDS-PAGE und Western-Blot	19
2.6.2	Proteinbestimmung	20
2.6.3	Spaltung von Protein mit Faktor Xa-Protease	20
2.7	Untersuchung des Phosphatcarriers	21
2.7.1	Expression und Reinigung des Phosphatcarriers aus <i>E. coli</i>	21
2.7.2	Rekonstitution des Phosphatcarriers in Liposomen	22
2.7.3	Transportmessungen mit <sup>33</sup> P-Phosphat	23
2.7.3.1	Präparation der Anionenaustauschsäulen	23
2.7.3.2	Altes Meßsystem zur Bestimmung der Transportaktivität	23
2.7.3.3	Neues Meßsystem zur Bestimmung der Transportaktivität	24
2.7.3.4	Berechnung der Transportaktivität	25
2.8	Isolierung von Lipiden aus Truthahneiern	26
2.8.1	Isolierung der Lipide	27
2.8.2	Analyse der Lipide	27
2.8.3	Vorbereitung der Lipide zur Rekonstitution	27
2.9	Weitere Optimierungsansätze	28
2.9.1	Variation des zur Rekonstitution verwendeten Detergenz	28
2.9.2	Verwendung unterschiedlicher Verhältnisse von Lipid zu Protein	28
2.9.3	Lipidzusammensetzung nach Wohlrab	28
2.9.4	Alternative Abreicherung von Detergentien nach Jezek	28
2.9.5	Abreicherung der Detergentien durch portionsweise Zugabe der Bio-Beads	29
2.9.6	Extrudieren von Proteoliposomen	29
2.10	Präparation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	29

---

3	Ergebnisse	31
3.1	Transportmessungen mit dem Phosphatcarrier	31
3.1.1	Einführung eines neuen Meßsystem	32
3.1.2	Optimierung des Rekonstitutionssystems	33
3.1.2.1	Rekonstitution mit Lipiden aus Truthahneigelb	35
3.1.3	Charakterisierung des Phosphatcarriers im neuen Rekonstitutions- und Meßsystem	36
3.1.3.1	Kinetische Daten des Phosphatcarriers	36
3.1.3.2	Transportaktivität einer cysteinfreien Mutante	37
3.1.3.3	Inhibitionsmessungen	38
3.2	Konstruktion und Untersuchung eines genetischen Dimers	39
3.2.1	Idee des genetischen Dimers	39
3.2.2	Konstruktion des Expressionsvektors	40
3.2.3	Expression des Dimers	42
3.2.4	Lokalisation des Dimers	43
3.2.5	Rekonstitution des genetischen Dimers	45
3.2.6	Spaltung des genetischen Dimers mit Faktor Xa Protease	46
3.3	Homologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.3.1	Herstellung einer Phosphatcarrier-Deletionsmutante	48
3.3.2	Komplementation der Deletion mit Phosphatcarrier	48
4	Diskussion	51
4.1	Transportmessungen mit heterolog exprimiertem Phosphatcarrier	51
4.1.1	Einführung eines neuen Meßsystems	51
4.1.2	Optimierung der Rekonstitutionsmethode und Charakterisierung des Phosphattransports	52
4.2	Konstruktion und Untersuchung eines genetischen Dimers	53
4.2.1	Das genetische Dimer als Untersuchungsobjekt	53
4.2.2	Das genetische Dimer des Phosphatcarriers	54
4.2.3	Vergleich mit dem Dimer des Nukleotidcarriers	56
4.3	Homologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
5	Zusammenfassung	58
6	Literatur	60

## Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Octaethylenglykolmonododecylether
C <sub>13</sub> E <sub>10</sub>	Decaethylenglykolmonotreddecylether
CIP	alkalische Phosphatase aus Rinderdarm
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Feuchtgewicht
HAc	Essigsäure
HEPES	Hydroxyethylpropansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	tausend Basenpaare
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
MCF	mitochondriale Carrierfamilie
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
NTP	Nitroblau-Tertrazolium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
P <sub>i</sub>	Phosphat (als Dihydrogenphosphat)
PIC	Phosphatcarrier
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RT	Raumtemperatur
SAP	alkalische Phosphatase aus <i>shrimp</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Natrium-N-Lauroylsarcosinat
TRIS	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
U	unit (enzymatische Aktivität)
UPM	Umdrehungen pro Minute
VÄ	Volumenäquivalente
V <sub>max</sub>	maximale Umsatzrate
VV	C32V,C134V,C300V-Mutante des Phosphatcarriers
WT	Wildtyp
z.A.	zur Analyse

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion von Mitochondrien – Stofftransport durch mitochondriale Carrier

Mitochondrien sind energiewandelnde Organellen eukaryotischer Zellen. Die wichtigste Funktion dieser Organellen ist die Bereitstellung von ATP, welches als Energieträger für zahlreiche Prozesse in der ganzen Zelle dient. Die Bildung von ATP aus ADP und Phosphat ist der letzte Schritt der oxidativen Phosphorylierung, bei der Elektronen von Reduktionsäquivalenten schrittweise über die Komplexe der Atmungskette auf elementaren Sauerstoff übertragen werden. Der Fluß der Elektronen zum Sauerstoff ist an den vektoriellen Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix durch die innere mitochondriale Membran nach außen gekoppelt. Dadurch wird ein elektrochemisches Potential aufgebaut. Der Rückstrom der Protonen durch den  $F_0$ -Teil der ATP-Synthase ist mit der ATP-Synthese am  $F_1$ -Teil des Enzyms gekoppelt (siehe Abbildung 1). Diese Zusammenhänge wurden erstmals von Peter Mitchell als chemiosmotische Hypothese publiziert (Mitchell, 1966 und 1976). Neben der ATP-Synthese finden in der mitochondrialen Matrix verschiedene katabole Reaktionen statt, wie z.B. der Tricarbonsäurezyklus, Teile des Harnstoffzyklus, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und zum Teil auch anabole Reaktionen wie Teilschritte der Glukoneogenese. Der Aufbau des elektrochemischen Potentials setzt das Vorhandensein einer Permeabilitätsbarriere voraus. Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Die äußere mitochondriale Membran ist aufgrund der vorhandenen Poreneinheiten permeabel für die meisten Metabolite bis zu einer Masse von zehn Kilodalton (Benz, 1985; Manella *et al.*, 1992 und 1996; Sorgato und Moran, 1993). Die innere mitochondriale Membran hingegen dient als die erforderliche Permeabilitätsbarriere. Der Stofftransport über diese Membran wird von einer Reihe spezifischer Carrierproteine katalysiert (La Noue und Schoolwert, 1979 und 1984; Krämer und Palmieri, 1989 und 1992). Hierdurch wird die Versorgung der mitochondrialen Matrix mit Metaboliten wie z.B. Pyruvat, Malat und Fettsäuren gewährleistet. Die Carrierproteine katalysieren zumeist den Austausch verschiedener Substrate gegeneinander oder koppeln den Transport von Substraten an das über die Membran anliegenden elektrochemische Protonenpotential.



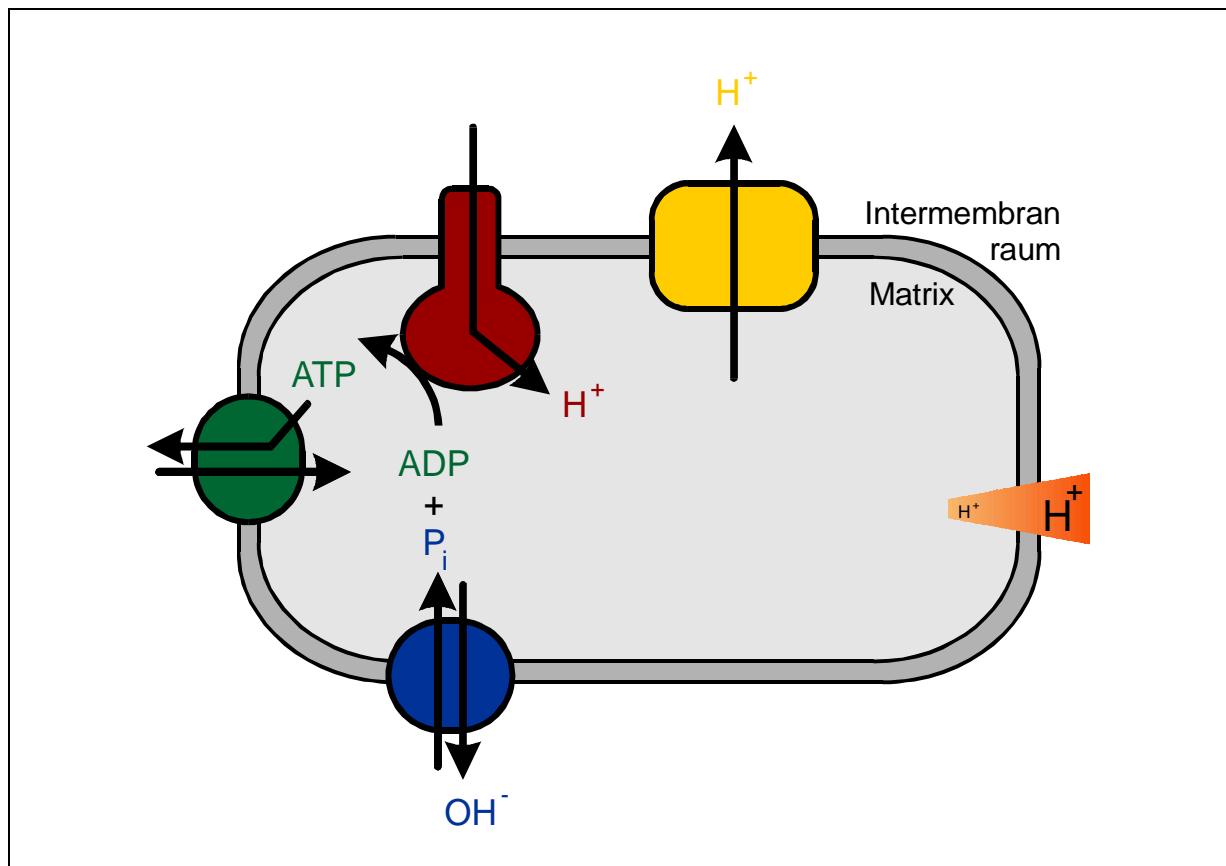


Abbildung 1: schematische Darstellung eines Mitochondriums mit den Bestandteilen, die für die oxidative Phosphorylierung relevant sind: Das elektrochemische Protonenpotential (orange) über die innere Mitochondrienmembran (grau) wird durch die Atmungskette (gelb) aufrecht erhalten. Er dient als Triebkraft für die Bildung von ATP an der  $F_0F_1$ -ATPase (rot). Die Substrate für diese Reaktion, ATP und ADP bzw. Phosphat werden vom Nukleotidcarrier (grün) bzw. dem Phosphatcarrier (blau) über die Membran transportiert.

## 1.2 Die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie

Mitochondriale Carrier aus einer Vielzahl von Organismen wurden untersucht und charakterisiert. Entscheidende neue Perspektiven wurden durch die Sequenzierung des Hefegenoms eröffnet. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnten in Hefe 35 offene Leserahmen identifiziert werden, die eventuell für mitochondriale Carrier kodieren. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit und ihrer zum Teil bekannten Funktion wurden sie – neben weiteren homologen Genen aus anderen Organismen – der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) zugeordnet (Paulsen *et al.*, 1998). Vor Abschluß der Sequenzierung des Hefegenoms waren Funktion und Primärsequenz von nur neun der 35 Proteine, die durch diese Gene kodiert werden, bekannt. Vier weitere mitochondriale Carrier waren funktionell charakterisiert worden, ohne daß ihre Primärstrukturen bekannt waren. Mittlerweile wurden drei weitere Gene als für mitochondriale Carrier kodierend identifiziert und zudem die Primärstruktur des zuvor nur funktionell bekannten Ornithincarriers bestimmt (vgl. Tabelle 1).

Mit einem Anteil von bis zu zwölf Prozent am gesamten in der Membran vorhandenen Protein (Klingenberg, 1981) ist der Nukleotidcarrier der am häufigsten vorkommende mitochondriale Carrier. Er katalysiert den Austausch von ADP gegen ATP und ist dadurch direkt an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt. Der Phosphatcarrier importiert das für die Phosphorylierungsreaktion benötigte Phosphat. Der Aspartat/Glutamat-Carrier ist zusammen mit dem Ketoglutarat-Carrier Bestandteil des Aspartat/Malat-*Shuttles*, durch den der Import von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien realisiert wird.

Neben diesen vier für die elementaren Funktionen der Mitochondrien absolut essentiellen Carriern, die ubiquitär synthetisiert werden, gibt es einige Carrier, die in höheren Eukaryoten primär in bestimmten Geweben synthetisiert werden. Dazu gehört z.B. der Ornithincarrier, der hauptsächlich in Leber und Niere synthetisiert wird (Krämer und Palmieri, 1992). Darüber hinaus existiert teilweise eine gewebespezifische Synthese bestimmter Isoformen von mitochondrialen Carriern als Anpassung an spezielle energetische Bedürfnisse, z.B. im Falle des Phosphatcarriers (Dolce *et al.*, 1996).

Es wurden bisher 15 mitochondriale Carrier in intakten Mitochondrien und zum Teil in rekonstituierten Systemen untersucht. Aufgrund theoretischer Betrachtungen muß es außerdem noch eine Reihe von Carriern für den Import von Cofaktoren und Substraten des mitochondrialen Stoffwechsels geben, die nicht in den Mitochondrien synthetisiert werden. Diese Forderung nach weiteren Carriern wird durch die oben erwähnte hohe Zahl an putativen Carrier im Hefegenom unterstützt. Erste Untersuchungen an Transportsystemen für Thiaminpyrophosphat und Coenzym A (Tahiliani *et al.*, 1992) wurden schon vor der vollständigen Sequenzierung des Hefegenoms durchgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Carrier der mitochondrialen Carrierfamilie. Die angegebenen Literaturzitate stellen jeweils nur eine ungewertete Auswahl der verfügbaren Literatur dar.

Carrier	Import	Export	Primärstruktur	Heterologe Überexpression	Literatur
Nukleotid- <sup>2)</sup>	ADP	ATP	+	+	Aquila <i>et al.</i> , 1982
Phosphat-	Phosphat	1)	+	+	Aquila <i>et al.</i> , 1987 Runswick <i>et al.</i> , 1987
Aspartat-Glutamat-	Glutamat	Aspartat	-	-	Dierks und Krämer, 1990
Oxoglutarat-Malat-	Ketoglutarat	Malat	+	+	Runswick <i>et al.</i> , 1990 Fiermonte <i>et al.</i> , 1993
Pyruvat-	Pyruvat	1)	-	-	Bolli <i>et al.</i> , 1989
Dicarboxylat-	Malat	Phosphat	+	+	Kaplan und Pedersen, 1985
Citrat-	Citrat	Malat	+	+	Kaplan <i>et al.</i> , 1993
Carnitin-	Acylcarnitin	Carnitin	+	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1992a Indiveri <i>et al.</i> , 1997a
Ornithin-	Ornithin	Citrullin	+	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1992b Indiveri <i>et al.</i> , 1997b
Succinat-Fumarat-	Succinat	Fumarat	+	-	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
Oxodicarboxylat-	u.a. 2-Oxoglutarat	2-Oxoadipat	+	-	Palmieri <i>et al.</i> , 2000
Oxalacetat-	Oxalacetat	1)	+	+	Palmieri <i>et al.</i> , 1999
Uncoupling-Protein	Protonen		+	+	Lin <i>et al.</i> , 1980 Klingenberg, 1990
Glutamin- <sup>2)</sup>	Glutamin	Glutamin	-	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1998

<sup>1)</sup> der Transport findet im Antiport mit einem Hydroxylion oder im Symport mit einem Proton statt

<sup>2)</sup> es ist unklar, ob dieser Carrier tatsächlich zur MCF gehört

### 1.3 Die Struktureigenschaften der mitochondrialen Carrierfamilie

Alle mitochondrialen Carrier bestehen aus etwa 300 Aminosäuren und haben ein apparentes Molekulargewicht von 30 bis 32 Kilodalton. Die strukturellen Informationen über die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie beschränken sich aufgrund fehlender 3D-Strukturdaten weitgehend auf aus Hydropathieplots abgeleitete putative Sekundärstrukturen. So weisen alle mitochondrialen Carrier ein gemeinsames Motiv von sechs transmembranen Helices auf, welche alternierend hydrophobe und amphipatische Eigenschaften besitzen (Aquila *et al.*, 1987; Walker, 1992; Palmieri *et al.*, 1993a) und durch hydrophile *loops* miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 2). Die sechs Helices bilden jeweils paarweise eine tripartite Struktur von drei Abschnitten mit je ca. 100 Aminosäuren. Mit Hilfe von *diagon-plots* konnte gezeigt werden, daß die Abschnitte untereinander eine relativ hohe Ähnlichkeit aufweisen (Saraste und Walker, 1982). Eine evolutionäre Erklärung für die Struktur der mitochondrialen Carrier geht von der Existenz eines gemeinsamen Urgens aus, welches für zwei transmembrane Bereiche kodiert (Klingenberg, 1989 und 1990) und dessen

Trimerisierung zeitgleich mit dem Auftreten der ersten Eukaryoten vor 1,5 Millionen Jahren vermutet wird (Kuan und Saier, 1993).

Im Gegensatz zu den transmembranen Bereichen sind die Aminosäuresequenzen in den *loops* nicht konserviert. Man vermutet hier die für die Substraterkennung und das *gating* wichtigen Bereiche (Walker, 1992; Kuan und Saier, 1993).

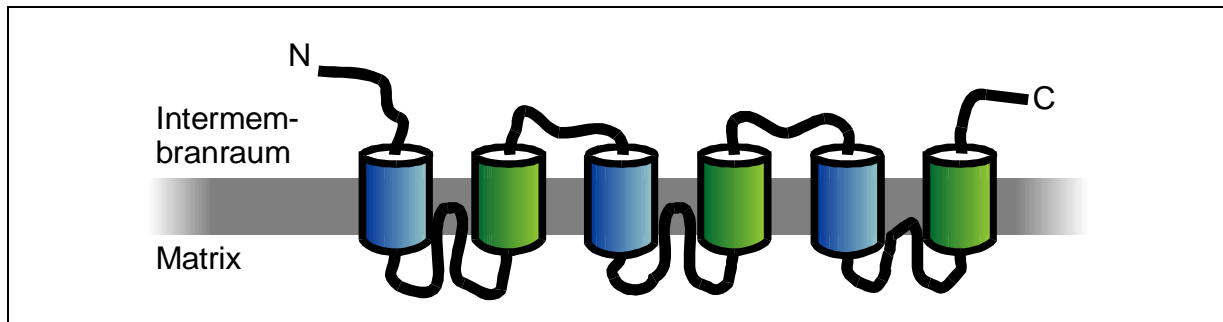


Abbildung 2: Schematische Darstellung der aus Hydropathieplots abgeleiteten Anordnung des Phosphatcarriers mit sechs transmembranen Helices. Deutlich wird die tripartite Struktur und der alternierende Charakter der Helices (blau: hydrophob, grün: amphiphatisch)

## 1.4 Die funktionelle Einheit der mitochondrialen Carrier

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß mitochondriale Carrier nicht in ihrer monomeren Form, sondern als Dimer aktiv sind. Einer der ersten überzeugenden Hinweise auf eine Dimerisierung wurde beim Nukleotidcarrier gefunden: die beobachtete Bindungsstöchiometrie von einem Molekül Carboxyatractylosid – einem hochspezifischen Inhibitor – zu zwei Untereinheiten des Nukleotidcarriers (Riccio *et al.*, 1975). Desweiteren konnte durch *crosslinking* und analytische Ultrazentrifugation (Hackenberg und Klingenberg, 1980; Lin *et al.*, 1980) gezeigt werden, daß die Carrier nach Solubilisierung mit Hilfe von nichtionischen Detergentien in einer dimeren Form vorliegen. Ebenfalls konnte beim Nukleotidcarrier die Möglichkeit der Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke nachgewiesen werden (Majima *et al.*, 1995).

Studien an intakten Mitochondrien aus Rinderherzen ergaben, daß weniger als ein Molekül des irreversiblen Inhibitors N-Ethyl-maleimid pro Monomer Phosphatcarrier nötig ist, um den Phosphattransport zu inhibieren (Guerin *et al.*, 1993). Analysen des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* im rekonstituierten System zeigten, daß vermutlich die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten an Position 28 zweier Monomere den Phosphattransport inhibieren kann (Phelps *et al.*, 1991).

Neben diesen experimentellen Befunden gibt es einen generellen Konsens bezüglich der Minimalausstattung eines sekundären Carrierproteins (Henderson, 1990; Maloney, 1990; Marger und Saier, 1993). Dieser besagt, daß etwa zwölf transmembrane Helices nötig sind, um Transport bzw. Kopplung zu bewerkstelligen. Dieser Konsens wird durch

theoretische Überlegungen unterstützt, die speziell für mitochondriale Carrier ein Homodimer als funktionelle Einheit fordern (Klingenberg, 1981). Für bakterielle sekundäre Transportsysteme, die in der Regel etwa zwölf (10 bis 14) transmembrane Helices aufweisen, konnte hingegen gezeigt werden, daß diese in der monomeren Form aktiv sind (Sahin-Toth *et al.*, 1994). Andere Transporter aus höheren Eukaryoten, z.B. die Zucker-Uniporter (GLUT-Familie) und die Na<sup>+</sup>-gekoppelten Symporter (SGLT-Familie) sind sowohl als Mono-, als auch als Oligomere aktiv. Die Interaktionen der Monomere wurden hier als regulatorische Phänomene gedeutet (Hebert und Carruthers, 1991; Bell *et al.*, 1993, Zolotta *et al.*, 1995).

## 1.5 Der Phosphatcarrier

Der Phosphatcarrier ist ein typisches Mitglied der mitochondrialen Carrierfamilie. Die Primärstruktur des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien wurde sowohl durch Proteinsequenzierung (Aquila *et al.*, 1982) als auch durch DNA-Sequenzierung aufgeklärt (Runswick *et al.*, 1987). Sie zeigt die typische tripartite Struktur mit sechs transmembranen Helices (siehe Abbildung 2). Sowohl N- als auch C-Terminus des Phosphatcarriers liegen auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (Capobianco *et al.*, 1991). Der Phosphatcarrier besitzt einen relativ hohen Anteil polarer Aminosäuren (39 %) und unter physiologischen Bedingungen einen hohen Überschuß (etwa zehn) von positiven Ladungen.

Bei einem Vergleich der transmembranen Bereiche des Phosphatcarriers untereinander sind einige konservierte Bereiche zu erkennen, so z.B. je ein Glycin am Anfang der geradzahigen Helices, je ein Prolin am Ende der ungeraden Helices und jeweils zwei Reste nach den Prolinen eine negativ geladene Aminosäure.

Im Phosphatcarrier wurde außerdem ein sich wiederholendes Strukturmotiv in der ersten und dritten Helix gefunden (Phelps *et al.*, 1991): X-Pro-X-(Asp/Glu)-X-X-(Lys/Arg)-X-(Arg/Lys)-X. In der fünften Helix fehlt dieses Strukturmotiv. Die interne Ähnlichkeit des dritten Teils ist insgesamt geringer als die der ersten beiden Teile.

## 1.6 Die Funktionsweise des Phosphatcarriers

Der Phosphatcarrier ist für die Aufnahme des für die ATP-Bildung (siehe 1.1) benötigten Phosphats in die Mitochondrien verantwortlich. Die Triebkraft des Transportes besteht aus dem elektrochemischen Protonenpotential über die innere mitochondriale Membran (siehe Abbildung 1). Der gekoppelte Transport von einem Proton und einem Phosphatanion (in der Form H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), der als Phosphat-Protonen-Symport oder Phosphat-Hydroxyl-Antiport beschrieben wird, ist elektroneutral. Er ist

somit nur von den beiden Substratgradienten, nicht jedoch vom Membranpotential abhängig.

Darüber hinaus katalysiert der Phosphatcarrier einen homologen Austausch von Phosphat. Die Eigenschaft, das eigene Substrat homolog austauschen zu können, haben nahezu alle sekundären Carrier.

Als dritte Transportart ist der Efflux-Modus bekannt. Er wird durch Reaktion des Phosphatcarriers mit Quecksilber(II)chlorid induziert (Stappen, 1993). Im Efflux-Modus ist der Phosphatcarrier in der Lage, ein breites Spektrum von Substraten aus den Mitochondrien zu schleusen. Ob dieser Transportmodus eine Bedeutung *in vivo* hat, ist nicht geklärt.

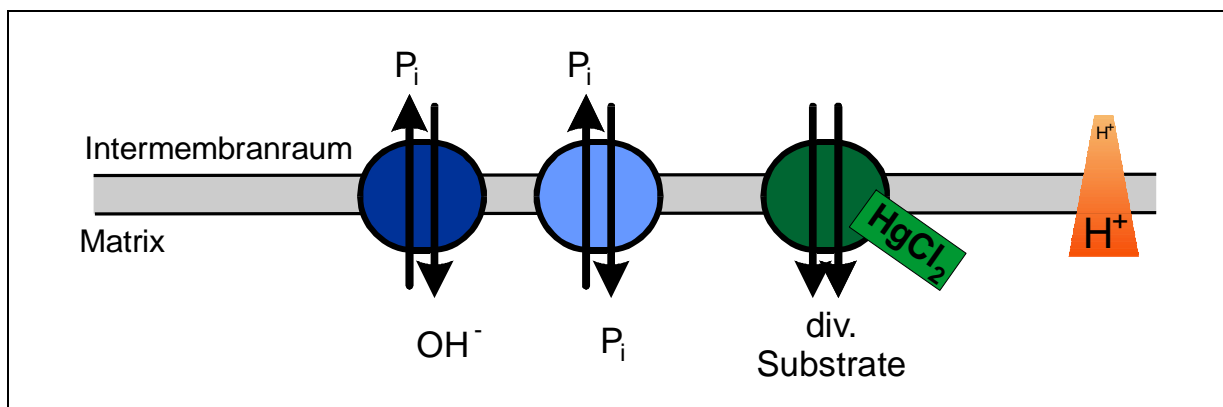


Abbildung 3: schematische Darstellung der drei Transportmodi des mitochondrialen Phosphatcarriers: Das elektrochemische Protonenpotential (orange) dient als Triebkraft für den Uniport-Modus, die Phosphataufnahme (dunkelblau). Der Antiport-Modus, der homologe Austausch von Phosphat (hellblau), ist hingegen energieneutral. Im Gegensatz zu diesen beiden physiologischen Transportmodi ist der Quecksilberchlorid-induzierte Efflux-Modus (grün) in dieser Form unphysiologisch.

### 1.7 Heterodimere des Phosphatcarriers

Für die Generierung von Heterodimeren des Phosphatcarriers wurde von Andreas Schroers im Rahmen seiner Dissertationsarbeit ein experimenteller Ansatz entwickelt (Schroers, 1998). Unter Heterodimer wird ein Dimer des Phosphatcarriers verstanden, in dem die beiden Monomere nicht identisch sind. Das Spektrum der Veränderung kann den Austausch einzelner Aminosäurereste bis hin zur Deletion von ganzen Bereichen des Proteins umfassen.

Das Verfahren zur Generierung der Heterodimere basiert auf zwei Monomerarten, die C-terminal unterschiedlich markiert sind. Dazu wurden ein HIS6-tag und ein FLAG-tag verwendet. Diese gestatten die spezifische Bindung an spezielles Säulenmaterial und somit die Reinigung mittels Affinitätschromatographie: Die beiden unterschiedlich markierten Monomere werden durch Dialyse in dimere Form überführt und die gewünschten Heterodimere durch zwei aufeinanderfolgende Chromatographieschritte von den ebenfalls entstehenden Homodimeren abgetrennt.

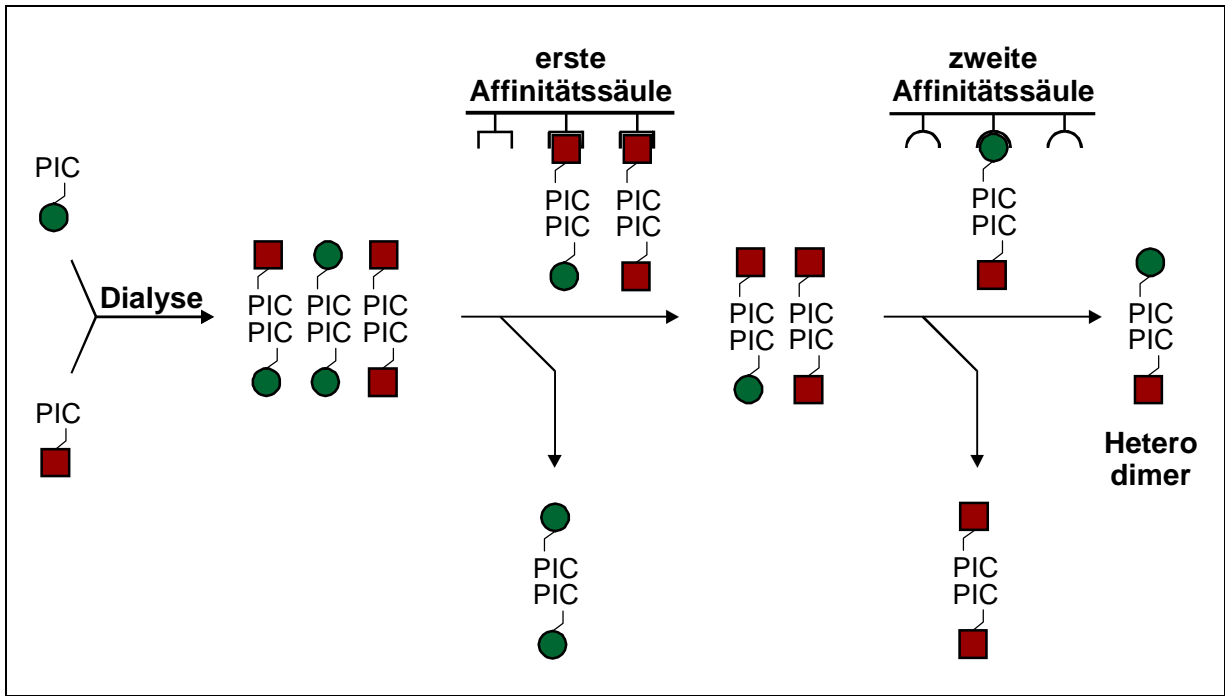


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reinigungsprozedur für Heterodimere des Phosphatcarriers nach Schroers (1998)

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Der mitochondriale Phosphatcarrier ist ein Transportprotein der mitochondrialen Carrierfamilie und ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das 32 kD-Protein ist als Dimer aktiv und für die Phosphataufnahme in Mitochondrien verantwortlich. Bisherige Untersuchungen am Phosphatcarrier wurden mit Mitochondrien, mit isoliertem Protein und mit heterolog exprimiertem Protein im rekonstituierten System durchgeführt.

Die heterologe Expression des Phosphatcarriers aus *S. cerevisiae* in *E. coli* in größeren Mengen wurde vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor erfolgreich etabliert. Ebenfalls wurde das Protein in Proteoliposomen aktiv rekonstituiert (Schroers, 1998). Da die zu Beginn der Arbeit beobachtete Transportaktivität etwa drei Größenordnungen unter der Aktivität des Phosphatcarriers aus Rinderherzen (Stappen und Krämer, 1993) und des andernorts heterolog exprimierten Phosphatcarriers aus *S. cerevisiae* (Wohlrab und Briggs, 1994) lag, mußte das Rekonstitutionssystem so optimiert werden, daß diese höhere Aktivität gemessen werden konnte. Für diese umfangreiche Optimierung wurde ein in puncto Probendurchsatz, Reproduzierbarkeit und Meßfehler deutlich verbessertes Meßsystem entwickelt.

Die zuvor beschriebene Methode zur Generierung von Heterodimeren läßt aufgrund ihrer Eigenschaften einige Experimente nicht oder nur eingeschränkt zu. Dazu gehört die Unterscheidbarkeit zwischen einer AB- und einer BA-Konstruktion, die im Falle einer asymmetrischen Anordnung der beiden Monomere relevant wäre. Ebenso wäre die Möglichkeit der Expression des Heterodimers in *S. cerevisiae* ein wichtiges Instrument. Die Etablierung eines weiteren Ansatzes zur Generierung der Heterodimere war aus diesem Grund interessant. Darüber hinaus war es sinnvoll, den neuen Ansatz so zu gestalten, daß das Verfahren zur Gewinnung von Heterodimeren bezüglich Zeitaufwand und Ausbeute deutlich verbessert wurde. Die Funktionalität des neuen Konstrukts sollte anschließend im rekonstituierten System und *in vivo* kontrolliert und untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Geldokumentation	Image Master® VDS AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG
Extruder	LiposoFast™ - Basic AVESTIN INC., OTTAWA, KANADA
Lyophilie	LYOVAC GT 2 LEYBOLD VACUUM, KÖLN
PCR-Geräte	GeneAmp®PCR System 9700 PE APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT  Mastercycler Gradient EPPENDORF, HAMBURG
Sequenziergerät	ABI PRISM 310 PE APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT
Ultraschallgerät	Branson™ Sonifier 250 BRANSON POWER CO, DANBURY, USA
Szintillationszähler	Multi Purpose-Scintillations Counter LS 6500 BECKMAN COULTER, MÜNCHEN
Western-Blot	Hoefer Semi-Phor AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG
French Press	French® Pressure Cell Press SLM AMINCO, ROCHESTER, USA

#### 2.1.2 Kits

Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN GMBH, HILDEN
Klonierung	SureClone™ Ligation AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG
Ligierung	Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG
Midi-Prep	QIAfilter™ Plasmid Midi Kit QIAGEN GMBH, HILDEN
Mini-Prep	GFX™ Micro Plasmid Prep Kit AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG
Mutagenese	SureClone™ Ligation Kit AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC., FREIBURG

Punktmutationen	QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit STRATAGENE, LA JOLLA, USA
Sequenzierreaktion	ABI PRISM™ Big dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT

## 2.1.3 Medien

### 2.1.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
2YT-Medium	16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
SOB-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,6 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 2,5 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 10 mM MgCl <sub>2</sub>

Die LB- und 2YT-Medien wurden in den zur Anzucht der Zellen zu verwendenden Gefäßen autoklaviert. Eventuell verwendetes Antibiotikum wurde direkt vor Anzucht der Zellen dem Medium zugesetzt. Für Festmedien wurde zum Medium vor dem Autoklavieren Agar (16 g/l) zugegeben. Unmittelbar vor dem Gießen der Platten wurde das Medium mit dem gewünschten Antibiotikum versetzt.

SOB-Medium wurde zur Anzucht von kompetenten Zellen (siehe 2.2.2) verwendet. Magnesiumchlorid wurde nach dem Autoklavieren steril aus einer Stammlösung (1 M) zugesetzt.

### 2.1.3.2 Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Trypton; 20 g/l Glucose
YPG-Medium	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Trypton; 3 % (v/v) Glycerin
YNB+AA-Medium	6,7 g/l Hefestickstoff (Basis) ohne Aminosäuren; 20 g/l Glucose; 20 mg/ml Adeninsulfat; 20 mg/l Histidin; 30 mg/l Leucin; 20 mg/ml Tryptophan

Die Medien wurden in Flaschen autoklaviert und die für die Anzucht verwendeten Gefäße separat durch Erhitzen (3 h, 180 °C) sterilisiert. Bei Bedarf wurde Geneticyn zugegeben. Die Glucose des YPD-Mediums wurde separat als Stammlösung (200 g/l) autoklaviert und vor Verwendung zugesetzt. Für Festmedien wurde zum Medium vor dem Autoklavieren Agar (16 g/l) zugegeben.

## 2.1.4 Verwendete Stämme

<i>E. coli</i> –Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$ mcr	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21(DE3)	<i>recA1 endA1 λ<sup>-</sup> gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lac</i> <i>UV5-T7 gene 1)</i>	Studier und Moffatt, 1986
<i>S. cerevisiae</i> –Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1n	<i>a, ade2; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1;</i> <i>ura3-1; can1-100</i>	Lawson und Douglas, 1988

## 2.1.5 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle oder Referenz
pUC18	Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZα</i> , $\Delta rop$ , ColE1; 2,7 kb	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pET-3a	Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , <i>pT7</i> , ColE1; 4,64 kb	Rosenberg <i>et al.</i> 1987
pNYHM131	<i>MIR1</i> -Gen und ca. 100 weitere Basen zwischen den <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> -Schnittstellen in pET-3a	Murakami <i>et al.</i> , 1993
pUC-PIC(-VVV)	Fragment aus pNYHM131 zwischen den <i>NdeI</i> - und <i>BamHI</i> -Schnittstellen in pUC18 (auch als VVV-Mutante vorhanden)	Meinhardt, persönliche Mitteilungen
pNYHM131-VVV	wie pNYHM131, abweichend VVV-Mutante des <i>MIR1</i> -Gens	Meinhardt, persönliche Mitteilungen
pUC-PIC- <i>SacII</i> (-VVV)	wie pUC-PIC, zusätzlich <i>SacII</i> -Schnittstelle im Bereich der Basen 11-16 des <i>MIR1</i> -Gens, (auch als VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
pUC-PIC- <i>MunI</i> -FakX-HIS6 (-VVV)	wie pUC-PIC- <i>SacII</i> , zusätzlich <i>MunI</i> -Schnittstelle statt des Start-Codons, Basen für Faktor Xa-Schnittstelle hinter <i>MunI</i> -Schnittstelle und sechs Histidine vor dem Stop-Codon, das zur <i>BamHI</i> -Schnittstelle erweitert wurde, enthält die etwa 100 zusätzlichen Basen aus pNYHM131 nicht mehr (auch als VVV-	diese Arbeit

pUC-PIC-Stop(-VVV)	Mutante vorhanden) wie pUC-PIC- <i>Sac</i> II, zusätzlich <i>Mun</i> I-Schnittstelle statt des Stop-Codons, (auch als VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
pUC-PIC-Dimer(-VVV)	wie pUC-PIC-Stop, Fragment zwischen <i>Mun</i> I- und <i>Bam</i> HI-Schnittstelle durch entsprechendes Fragment aus pUC-PIC- <i>Mun</i> I-FakX-HIS6 ersetzt, (auch als doppelte VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
pET-PIC-Dimer(-VVV)	Fragment aus pUC-PIC-Dimer zwischen den <i>Nde</i> I- und <i>Bam</i> HI-Schnittstellen in pET-3a, (auch als doppelte VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
pUC-PIC- <i>Xba</i> I	wie pUC-PIC, zusätzlich <i>Xba</i> I-Schnittstelle 3 Basen vor dem Start-Codon, zusätzlich sechs Histidine vor dem Stop-Codon, das zur <i>Bam</i> HI-Schnittstelle erweitert wurde, enthält die etwa 100 zusätzlichen Basen aus pNYHM131 nicht mehr.	diese Arbeit
pUC-PIC-Dimer- <i>Xba</i> I	wie pUC-PIC-Dimer, zusätzlich <i>Xba</i> I-Schnittstelle 3 Basen vor dem Start-Codon (auch als doppelte VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
YEp-352-ADH	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , <i>ColE1</i> , <i>lacZ'</i> , <i>URA3</i> , <i>2u</i> , <i>pADH</i> ; 5,5 kb	Lisowsky, persönliche Mitteilungen
YEp-352-ADH-PIC	Fragment aus pUC-PIC- <i>Xba</i> I zwischen den <i>Xba</i> I- und <i>Bam</i> HI-Schnittstellen in YEp-352-ADH (auch als VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit
YEp-352-ADH-PIC-Dimer	Fragment aus pUC-PIC-Dimer- <i>Xba</i> I zwischen den <i>Xba</i> I- und <i>Bam</i> HI-Schnittstellen in YEp-352-ADH (auch als doppelte VVV-Mutante vorhanden)	diese Arbeit

## 2.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	damit generiertes Plasmid
SacII-s	GTC TGT GTC <u>CGC GGC</u> TCC TGC	pUC-PIC- <i>SacII</i> (-VVV)
SacII-as	GCA GGA <u>GCC GCG GAC</u> ACA GAC	pUC-PIC- <i>SacII</i> (-VVV)
Mun-FakX-s	GCA <u>TCA ATT GAT CGA AGG TCG TTC</u> TGT GTC CGC GGC	pUC-PIC- <i>MunI</i> -FakX-HIS6(-VVV)
HIS6-BamHI-as	GAG GGA TCC CTA <u>ATG ATG ATG ATG</u> <u>ATG ATG ACC ACC ACC ACC</u>	pUC-PIC- <i>MunI</i> -FakX-HIS6(-VVV) pUC-PIC- <i>XbaI</i>
Mun-Stop-s	GTG GTG GTC <u>AAT TGA</u> AAT GGT CTT G	pUC-PIC-Stop(-VVV)
Mun-Stop-as	CAA GAC CAT <u>TTC AAT TGA</u> CCA CCA C	pUC-PIC-Stop(-VVV)
XbaI-s	CCC <u>TCT AGA</u> CAT ATG TCT GTG TCT GC	pUC-PIC-Dimer- <i>XbaI</i>

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

*E. coli*- und *S. cerevisiae*-Kulturen wurden auf Schüttlern (110-120 UPM) bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert. Bei Bedarf wurde dem Medium zur Selektion Antibiotikum (50 mg/ml Carbenicillin) oder Geneticin zugesetzt. Die Zelldichte von Zellkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Die Kultivierung auf Festmedien erfolgte bei *E. coli* für 16 h bei 37 °C, bei *S. cerevisiae* für 48 – 72 h bei RT.

### 2.2.2 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen wurden in größeren Mengen präpariert und bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer	10 mM PIPES (pH 6,7); 15 mM CaCl <sub>2</sub> ; 250 mM KCl; 55 mM MnCl <sub>2</sub>
-----------	--

SOB-Medium (250 ml) wurde mit einer DH5 $\alpha$ -Kolonie angeimpft und unter starkem Schütteln (220 UPM) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen (24 bis 30 h, RT). Die Zellsuspension wurde auf 4 °C abgekühlt und zentrifugiert (2.500-g, 10 min, 4 °C). Das Sediment wurde in TB-Puffer (20 ml) resuspendiert und unter Schwenken mit

DMSO (7 % Endkonzentration) versetzt. Nach Inkubation (10 min, 4 °C) wurden die kompetenten Zellen aliquotiert, eingefroren (fl. Stickstoff) und gelagert (-80 °C).

BL21(DE3)-Zellen wurden unmittelbar vor der Transformation kompetent gemacht, da sie in kompetentem Zustand nicht lange lagerbar sind.

TSS-Puffer	10 % PEG (M=8000); 10 % DMSO; 20 mM MgSO <sub>4</sub> in LB-Medium
------------	--

BL21(DE3)-Zellen (1 ml pro Transformationsansatz) wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen und dann sedimentiert (1.000-g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in TSS-Puffer (100 µl pro Transformationsansatz) resuspendiert und zur Transformation (siehe 2.2.3) eingesetzt.

### 2.2.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Ligierte oder isolierte Plasmid-DNA (5 bis 10 ng) wurde mit kompetenten Zellen (100 µl, vgl. 2.2.2) inkubiert (30 min, 4 °C). Anschließend wurde der Transformationsansatz kurzzeitig erhitzt (45 s, 42 °C), wieder abgekühlt, mit LB-Medium versetzt (900 µl) und unter Schütteln inkubiert (1 h, 37 °C). Der Transformationsansatz wurde auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert (100 µl und 900 µl) und inkubiert (16 h, 37 °C).

### 2.2.4 Dauerkulturen von Bakterien und Hefen

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme werden kurzfristig auf Festmedien bei 4 °C und langfristig in Dauerkulturen in 50 % Glycerin bei -80 °C gelagert.

Die *S. cerevisiae*-Stämme werden alle sechs bis acht Wochen auf Festmedien mit entsprechender Selektion neu kultiviert und bei 4 °C und ebenfalls langfristig in Dauerkulturen in 15 % Glycerin bei -80 °C gelagert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde aus Flüssigkulturen unter Verwendung eines Mini- oder Midi-Prep-Kits nach Herstellerangabe isoliert.

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA-Lösung wurde je nach Bedarf mittels UV-Spektroskopie oder Gelelektrophorese bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie wurde die Extinktion einer geeigneten wässrigen Verdünnung der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Daraus läßt sich die DNA-Konzentration berechnen. Eine Extinktion von 0,1 entspricht 5 µg/ml doppelsträngige DNA. Zur Kontrolle wurde ebenfalls die Extinktion bei 280 nm gemessen. Ein Verhältnis von  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  außerhalb des Bereiches von 1,5 bis 2 deutet auf Verunreinigung durch Protein bzw. RNA hin. In solchen Fällen mußte die DNA-Konzentration anderweitig bestimmt werden.

Die DNA-Konzentration einer Lösung konnte ebenfalls mittels Gelelektrophorese bestimmt werden. Dazu wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) mit einem DNA-Größenmarker, dessen Konzentration bekannt ist, durchgeführt und die DNA-Menge durch Vergleich der Bandenintensitäten im UV-Transilluminator abgeschätzt.

### 2.3.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris-HAc (pH 8,0); 1 mM EDTA; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
Probenpuffer	25 % Glycerin, 0,125 % Bromphenolblau

Die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Plasmid-DNA-Fragmenten wurde je nach Fragmentgröße in 0,5 bis 2 %-igen Agarosegelen (30 ml TAE-Puffer, 0,15 bis 0,6 g Agarose) in TAE-Puffer durchgeführt. Es wurden mindestens 50 ng DNA mit ¼ VÄ Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für ca. 90 Minuten bei 80 bis 100 V durchgeführt, die einzelnen DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

### 2.3.4 Spaltung von Plasmid-DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde in den vom Hersteller gelieferten und empfohlenen Spaltungspuffern durchgeführt. Der Ansatz wurde mit einer Enzymmenge inkubiert (1 h, 37 °C), die einem fünffachen *overdigest* entspricht. Vollständige Spaltung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.3) kontrolliert, die Restriktionsfragmente auf gleiche Weise aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.3.5).

### 2.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
----------------	-------------------------

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit einem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangabe. Die gereinigte DNA wurde mit Elutionspuffer eluiert.

### 2.3.6 Ligierung von Plasmid-DNA

Ligierung von Plasmid-DNA wurde mit einem Ready-To-Go Kit unter Verwendung von T4 DNA Ligase nach Herstellerangabe durchgeführt. Es wurden 100 ng Vektor und ein dreifacher Mengenüberschuß an *insert* eingesetzt. Der Vektor wird vor der Ligierung mit CIP oder SAP nach Herstellerangabe dephosphoryliert.

### 2.3.7 Generierung von gezielten Punktmutationen

Gezielte Punktmutagenese wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Sie erfolgte nach Herstellerangabe. Abweichend wurden zur Transformation nicht Epicurian Coli XL2-Blue Ultrakompetenten Zellen, sondern kompetente DH5 $\alpha$ mcr-Zellen (siehe 2.2.3) eingesetzt.

### 2.3.8 PCR zur Einführung von zusätzlichen Basenpaarabschnitten

Zusätzliche Basenpaarabschnitte flankierend an bestehende wurden mittels PCR amplifiziert und mit dem SureClone™ Ligation Kit aufgearbeitet. Für den zusätzlichen Basenpaarabschnitt wurde ein entsprechender Primer hergestellt. Durch die Verwendung zweier entsprechender Primer konnten bei Bedarf sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende zusätzliche Basenpaarabschnitte eingeführt werden.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte durch PCR. Pro Ansatz (50  $\mu$ l) wurden die beiden Primer (je 15 pmol), die *template* DNA ( $\sim$  50 ng), die vier Nukleotide (je 0,2 mM) und *Pfu*-Polymerase (2 U) in Puffer nach Herstellerangabe zusammengegeben. Die DNA im PCR-Ansatz wurde denaturiert (1 min, 95 °C) und in 25 Zyklen –



Denaturierung (30 sek, 95 °C), Religierung (1 min, Temperatur je nach Primer) und Kettenverlängerung (2 min pro kb, 68 °C) – amplifiziert.

Die Aufarbeitung des PCR-Ansatzes und Klonierung in einen pUC18-Vektor wurde mit dem SureClone™ Ligation Kit nach Herstellerangabe durchgeführt.

### 2.3.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem ABI PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangabe. Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden im Sequenziergerät kapillarelektrophoretisch getrennt, detektiert und analysiert.

## 2.4 Klonierung des genetischen Dimers

Die Klonierungen für das genetische Dimer wurden in pUC-18 Vektoren durchgeführt. Ausgegangen wurde von pNYHM131, der zwischen den *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen ein Exemplar des *MIR1*-Gens und stromabwärts des Stop-Codons weitere ca. 100 Basenpaare enthält. Dieses Fragment wurde zwischen die entsprechenden Schnittstellen eines pUC18-Vektors kloniert (pUC-PIC). Die hier verwendete Basennummerierung bezieht sich auf das *MIR1*-Gen. Im ersten Schritt wurde im Bereich der Basen 11-16 durch zwei stille Mutationen eine *SacII*-Schnittstelle eingeführt (pUC-PIC-*SacII*). Ausgehend vom Vektor pUC-PIC-*SacII* wurden nun zwei weitere Vektoren generiert: pUC-PIC-Stop und pUC-PIC-*MunI*-FakX-HIS6. Im ersten Fall wurde wiederum durch zwei gezielte Mutationen das Stop-Codon des *MIR1*-Gens durch eine *MunI*-Schnittstelle ersetzt. Im zweiten Fall wurde durch die Einführung von zusätzlichen Basenabschnitten das Start-Codon durch eine *MunI*-Schnittstelle, gefolgt von den Basen für die Erkennungssequenz von Faktor Xa (ATC GAA GGT CGT) ersetzt. Zusätzlich wurden unmittelbar vor dem Stop-Codon die Sequenz CAT CAT CAT CAT CAT eingefügt, die zusammen mit dem schon vorhandenen CAT zusammen für einen HIS6-*tag* kodieren, sowie das Stop-Codon zu einer *BamHI*-Schnittstelle ergänzt. Die zuvor generierte neue *SacII*-Schnittstelle erlaubt es in Kombination mit der *KpnI*-Schnittstelle an Position 841 einen Großteil des Gens auszuschneiden und umzuklonieren. Mit diesem Kassettensystem ist es möglich, in einem der beiden Vektoren pUC-PIC-Stop und pUC-PIC-*MunI*-FakX-HIS6 generierte Mutationen im Bereich zwischen den Basen 16 und 838 durch Klonierung in den jeweils anderen Vektoren zu übertragen. Aus den beiden Vektoren pUC-PIC-Stop und pUC-PIC-*MunI*-FakX-HIS6 wurde der Vektor pUC-PIC-Dimer generiert. Dazu wurde das *MunI*-*BamHI*-Fragment aus pUC-PIC-*MunI*-FakX-HIS6 zwischen die entsprechenden Schnittstellen in pUC-PIC-Stop kloniert. Sämtliche Mutations- und

Klonierungsschritte wurden parallel mit Wildtyp und VVV-Mutante durchgeführt. Zur Expression in *E. coli* wurde das genetische Dimer in einen pET-3a-Vektor kloniert.

## 2.5 Homologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Deletion des *MIR1*-Gens in *S. cerevisiae* wurde ebenso wie die Komplementierung – d.h. die Transformation mit dem Komplementierungsvektor und die Tetradenanalyse – von Dr. T. Lisowsky, Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Der Vektor, der zur Komplementierung des deletierten *MIR1*-Gens eingesetzt wurde, basiert auf einem YEp352-ADH-Vektor. Zwischen die *Xba*I- und *Bam*HI-Schnittstellen im YEp-Vektor wurde das Gen für das Monomer und das genetische Dimer des Phosphatcarriers kloniert. Dazu wurde in die Vektoren pUC-PIC und pUC-PIC-Dimer 3 Basenpaare vor dem Start-Codon eine *Xba*I-Schnittstelle eingeführt, unmittelbar vor dem Stop-Codon die Sequenz CAT CAT CAT CAT CAT eingefügt, die zusammen mit dem schon vorhandenen CAT für einen *HIS6-tag* kodieren, sowie das Stop-Codon zu einer *Bam*HI-Schnittstelle ergänzt.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 SDS-PAGE und Western-Blot

Bakterielle Proteine und Zellextrakte wurden mit ¼ VÄ RotiLoad (Roth) versetzt und nach Erhitzen (95 °C, 5 min) in 10 oder 12%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Lämmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau oder Silber gefärbt (Sambrook *et al.*, 1989).

Für einen immunologischen Nachweis des Phosphatcarriers wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese durch einen *semi-dry blots* (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine PVDF-Membran übertragen. Der spezifische Nachweis erfolgte durch eine Farbreaktion, die durch die Bindung zweier Antikörper an das Protein vermittelt wird. Der erste Antikörper ist ein polyklonales Antiserum (Verdünnung 1:1.000) aus Kaninchen gegen den Phosphatcarrier (Schroers, 1998). Der zweite Antikörper (Verdünnung 1:10.000) besteht aus einem Konjugat aus Anti-Kaninchen mit alkalischer Phosphatase. Die kolorimetrische Reaktion erfolgte durch eine Reaktion der alkalischen Phosphatase mit den Substraten BCIP und NBT.

## 2.6.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurde je nach weiteren Bestandteilen der Proteinlösung, die andere Nachweise stören, unterschiedlich durchgeführt.

Die Proteinbestimmung in Mitochondrien erfolgt nach Bradford (1976), der Proteingehalt von solubilisierten *inclusion bodies* des Phosphatcarriers wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Die Quantifizierung von Protein in Proteoliposomen zur Bestimmung der Einbaurate erfolgte entweder nach Kaplan und Pedersen (1985) oder über eine Analyse mittels SDS-PAGE:

| Verdünnungspuffer 30 mM  $KP_i$  (pH 6,8); 50 mM HEPES (pH 6,8) |

Eine entsprechende Menge Liposomen (maximal 5  $\mu$ g eingesetztes Protein, i.A. 100  $\mu$ l) wurden mit Verdünnungspuffer (1 ml) versetzt und sedimentiert (350.000-g, 20 min, 15 °C). Die sedimentierten Liposomen wurden in RotiLoad (10  $\mu$ l) aufgenommen, erhitzt (5 min, 95 °C) und neben einer Standardreihe aus solubilisiertem Phosphatcarrier aufgetragen. Visualisierung der Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE erfolgte mittels Silberfärbung.

## 2.6.3 Spaltung von Protein mit Faktor Xa-Protease

| Proteasepuffer A 20 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 2 mM  $CaCl_2$  |

Die Protease (2  $\mu$ g pro 50  $\mu$ g Protein) wurde zu dem zu spaltenden Protein zugegeben. Die Spaltung erfolgte – soweit möglich – in Proteasepuffer (1  $\mu$ l pro  $\mu$ g Protein). Der Spaltungsansatz wurde inkubiert (mindestens 2 h, RT).

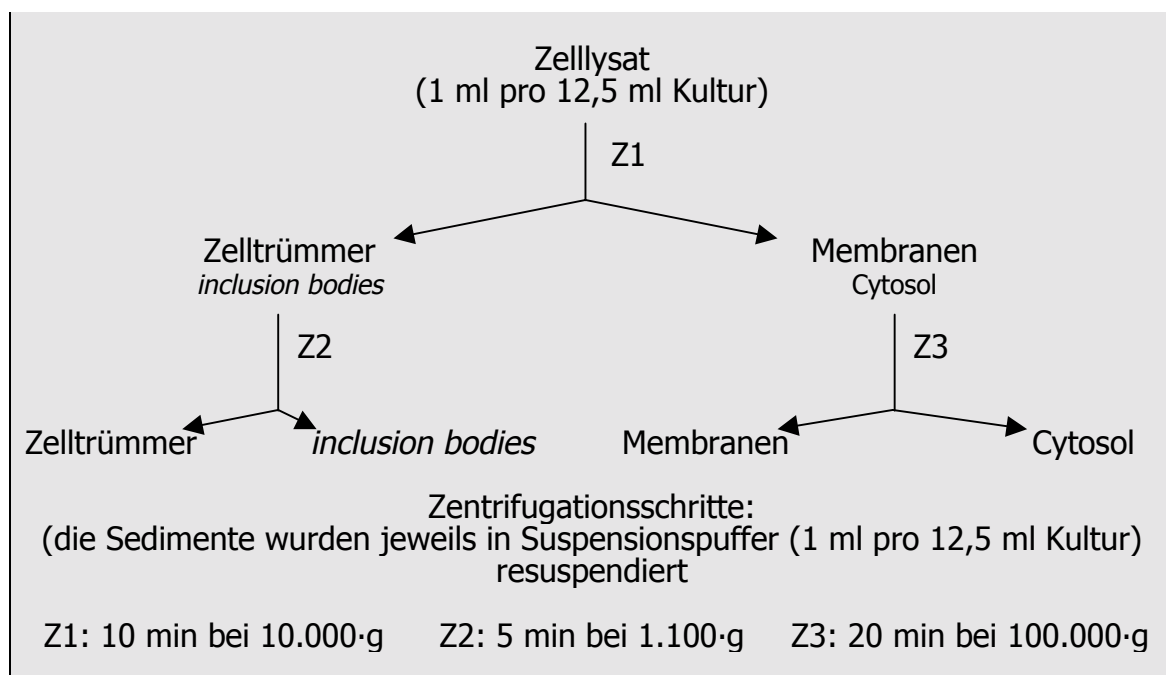
## 2.7 Untersuchung des Phosphatcarriers

### 2.7.1 Expression und Reinigung des Phosphatcarriers aus *E. coli*

Suspensionspuffer	10 mM Tris·HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA; 1 Tablette pro 50 ml COMPLETE Proteaseinhibitor
-------------------	---

Für die Expression des Phosphatcarriers wurde 2YT-Medium mit einer Vorkultur (20 ml pro Liter Medium) des Expressionsstamms angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 inkubiert. Die Expression des Proteins wurde durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert und nach drei Stunden durch Zentrifugation (4.000·g, 15 Minuten, 4°C) abgebrochen. Die sedimentierten Zellen wurden in Suspensionspuffer (1 ml pro 12,5 ml Kultur) resuspendiert und in der *FrenchPress* vollständig lysiert (2 Passagen, 16.000 psi).

Zur Analyse der Expression wurde das Zelllysat durch differentielle Zentrifugation in vier Fraktionen aufgeteilt: Zelltrümmer, *inclusion bodies*, Membranen und Cytosol. Es wurde folgendes Zentrifugationsschema verwendet:



Die einzelnen Zellfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.6.1) untersucht.

Für die Expression des Phosphatcarriers in größeren Mengen wurde ausschließlich die Fraktion der *inclusion bodies* benötigt und gezielt gereinigt:

Das Zellysate wurde zentrifugiert (12.000·g, 10 min, 4 °C), das Sediment erneut in Suspensionspuffer (1 ml pro 12,5 ml Kultur) resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.100·g, 5 min, 4 °C). Der Überstand mit den *inclusion bodies* wurde aliquotiert (nach Bedarf 200 µl bis 500 µl) und die *inclusion bodies* sedimentiert (12.000·g, 3 min, 4 °C). Diese Aliquots enthielten 100 bis 250 µg Protein mit einem Phosphatcarrieranteil von etwa 90 %. Die Ausbeute an Phosphatcarrier lag bei ca. 40 mg/l Kultur. Das Protein wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.7.2 Rekonstitution des Phosphatcarriers in Liposomen

Lipidpuffer	30 mM KPi (pH 6,8), 1,5 % Octylglucopyranosid
Dialysepuffer	30 mM KPi (pH 6,8), 1 mM Mercaptoethanol
Solubilisierungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA; 1,67 % SLS
Bio-Beads-Säulen	600 mg Bio-Beads (Feuchtgewicht) äquibriert in 30 mM KPi und 50 mM HEPES (pH 6,8) in abgedichteten Pasteurpipetten

Der Ansatz für die Rekonstitution des Phosphatcarriers bestand aus vier Komponenten: vorgeformten Liposomen, solubilierten *inclusion bodies*, nichtionischem Detergenz und Pufferlösung.

Die Lipidlösung (*E. coli total lipid extract*) wurde getrocknet (Rotationsverdampfer, 30 bis 35 °C, sowie Lyophilisationsgerät, 10 min), in Lipidpuffer (100 mg/ml) resuspendiert und gegen Dialysepuffer dialysiert (3 mal 12 h in 100 VÄ Puffer). Die Lipide wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert. Um vorgeformte Liposomen zu erhalten, wurden die Lipide mit Hilfe eines Ultraschallgeräts beschallt (10 min, 30 - 40 % *duty cycle*, *Output*-Stufe 4).

Der Phosphatcarrier wurde in möglichst geringer Menge Solubilisierungspuffer (ungefähr 0,2 µl/µg Protein) aus *inclusion bodies* solubiliert. Die Lösung wurde mit 2 VÄ Wasser versetzt und der unlösliche Rest abzentrifugiert (15.000·g, 1 min, RT).

Für einen Rekonstitutionsansatz (700 µl) wurden der Reihe nach Proteinlösung (je nach gewünschtem Lipid-zu-Protein-Verhältnis etwa 20 bis 40 µg Phosphatcarrier), beschallte Lipide (Endkonzentration 16 mg/ml) und nichtionisches Detergenz (i.A. Triton X-114, Endkonzentration 1 %) gemischt, gevortext, mit Puffer versetzt (i.A. 30 mM KPi (pH 6,8) und 50 mM HEPES (pH 6,8) Endkonzentrationen), mit Wasser auf das Zielvolumen (700 µl) aufgefüllt und erneut gevortext. Der Rekonstitutionsansatz sollte trüb und leicht opaleszierend sein.

Nach Inkubation (1 bis 2 h, RT) wurde der Reaktionsansatz 15 mal über eine Bio-Beads-Säule gegeben. Dabei adsorbierten sowohl das SLS als auch das nichtionische Detergenz an die Bio-Beads und die Proteoliposomen formten sich.

### 2.7.3 Transportmessungen mit $^{33}\text{P}$ -Phosphat

Die Optimierung der Methode zur Messung der Transportaktivität war Teil dieser Arbeit. Das Meßsystem wurde hierzu umgestellt. Sowohl das neue (siehe 2.7.3.3) als auch das alte Meßsystem (siehe 2.7.3.2) basierten auf der gleichen Meßtechnik: Zugabe von radioaktivem  $^{33}\text{P}$ -Phosphat zu den Liposomen zum Startzeitpunkt, Inhibition des Transports zum Stopzeitpunkt mittels Pyridoxalphosphat und Abtrennung des nicht aufgenommenen radioaktiven Phosphats über entsprechend präparierte Anionenaustauschsäulen (siehe 2.7.3.1). Die Menge des aufgenommenen radioaktiven Phosphats wurde im Szintillationszähler bestimmt.

#### 2.7.3.1 Präparation der Anionenaustauschsäulen

Austauschsäulen	1 ml Dowex 2×10 oder 2×8 in abgedichteten Pasteurpipetten
Konditionierlösung	2 g/l BSA; 2 g/l Phosphatidylcholin in 100 mM Natriumacetat (pH > 8,0)

Das Anionenaustauschmaterial in den Austauschsäulen mußte vor der Verwendung zur Abtrennung von Phosphat von der Chloridform in die Acetatform gebracht werden. Dazu wurden die Säulen nacheinander mit Natronlauge (4,8 ml, 1 M), Wasser (1,6 ml), Essigsäure (4,8 ml, 1 M), konzentrierter Natriumacetatlösung (3,2 ml, 3 M), verdünnter Natriumacetatlösung (4,8 ml, 100 mM) und Konditionierlösung (400 µl) gespült.

#### 2.7.3.2 Altes Meßsystem zur Bestimmung der Transportaktivität

Startlösung	30 mM $\text{KPi}$ (pH 6,8), 50 mM HEPES (pH 6,8), radioaktives $\text{H}_3^{33}\text{PO}_4$ (ca. 50.000 cpm pro µl)
Stoplösung	20 mM Pyridoxalphosphat, 1 M Imidazol
Elutionslösung	150 mM Sucrose

Zwei Gabeln zur Messung von Transportkinetiken (Dawson *et al.*, 1987) wurden mit Startlösung (10 µl) bzw. Stoplösung (10 µl) beladen. Liposomen (100 µl, siehe 2.7.2) wurden in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) vorgelegt. Durch Eintauchen und Auf- und Abbewegung der Startgabeln in die Liposomenlösung wurden Startlösung und Liposomen gemischt und die Transportreaktion in bis zu zwölf Ansätzen parallel gestartet. Nach Ablauf der Meßzeit wurde die Reaktion auf gleiche Weise mit Stoplösung gestoppt. Für die Nullzeitpunktmessung wurde erst die Stop-, dann die Startlösung zugegeben. Ein definierter Teil des Reaktionsansatzes (100 µl) wurde auf vorbereitete Anionenaustauschsäulen (siehe 2.7.3.1) gegeben und die Liposomen mit

Elutionslösung (1,2 ml) in Szintillationsgefäße eluiert. Die in die Liposomen aufgenommene Menge an radioaktivem Phosphat wurde im Szintillationszähler gemessen (Meßzeit > 5 Minuten).

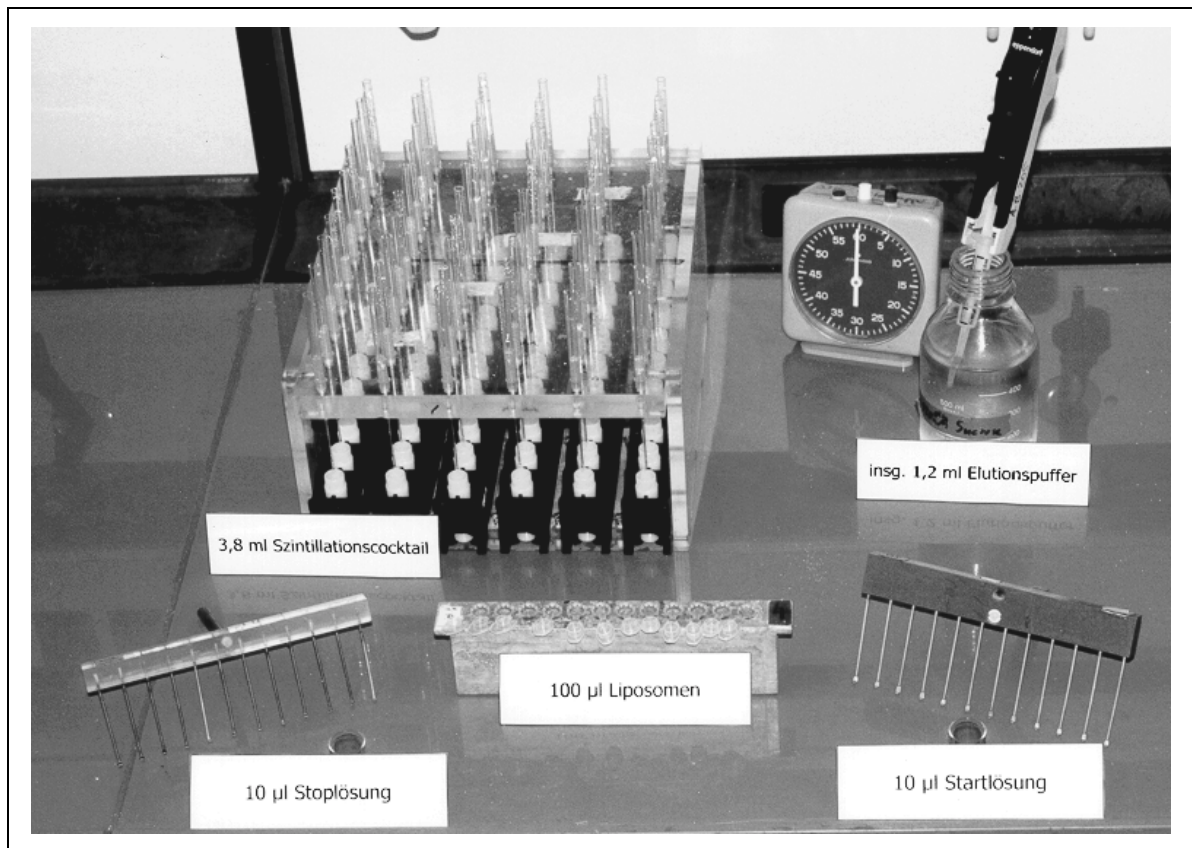


Abbildung 5: Foto der alten Meßapparatur.

### 2.7.3.3 Neues Meßsystem zur Bestimmung der Transportaktivität

Für die Transportmessung mit dem neuen Meßsystem werden drei Mikrotiterplatten verwendet: je eine für Startlösung, Liposomen und Stoplösung (siehe Abbildung 6, 3.1.1). Führt man eine Doppelbestimmung mit je sechs Meßzeitpunkten – in zweimal sechs Spalten der Platten, also insgesamt zwölf Meßzeitpunkten – durch, können insgesamt acht Meßansätze – in jeder Reihe der Platte einer – untersucht werden. Die Reaktion wird für jeden Meßzeitpunkt (d.h. spaltenweise) durch Zugabe von Startlösung zu den Liposomen gestartet, zum entsprechenden Zeitpunkt durch Überführen des Transportansatzes in die Stoplösung gestoppt und dann auf die Anionenaustauschsäulen gegeben. Alle Flüssigkeitstransfers werden mit einer Achkkanal-Pipette durchgeführt.

Liposomen	siehe 2.7.2
Startlösung	30 mM $KP_i$ (pH 6,8), 50 mM HEPES (pH 6,8), radioaktives $H_3^{33}PO_4$ (ca. 50.000 cpm pro $\mu l$ )
Stopplösung	20 mM Pyridoxalphosphat, 1 M Imidazol
Elutionslösung	150 mM Sucrose

Stopplösung (10  $\mu l$  pro Vertiefung) und Liposomen (100  $\mu l$  pro Vertiefung, 110  $\mu l$  pro Vertiefung die Nullzeitpunkte) wurden auf je einer Mikrotiterplatte mit V-Boden vorgelegt. Die zwölf Spalten der Platten wurden für zweimal sechs Meßzeitpunkte (Doppelbestimmung) und jede Reihe für einen Ansatz verwendet. Auf einer dritten Mikrotiterplatte wurde in einer Spalte für jeden Ansatz Startlösung vorgelegt (125  $\mu l$  pro Vertiefung). Die Transportreaktion wurde bis zu acht Ansätzen zeitgleich durch Zugabe von Startlösung (10  $\mu l$  pro Ansatz) zur Liposomenlösung mit einer 8-Kanal-Pipette gestartet. Nach Ablauf der Meßzeit wurde die Reaktion durch Überführen der Transportansätze (100 der 110  $\mu l$ ) in die Stopplösung gestoppt. Für die Nullzeitpunktmessung wurden erst Liposomen (100  $\mu l$ ) und anschließend Startlösung (10  $\mu l$ ) zur Stopplösung gegeben. Ein definierter Teil des Reaktionsansatzes (100  $\mu l$ ) wurde auf vorbereitete Anionenaustauschsäulen (siehe 2.7.3.1) gegeben und die Liposomen mit Elutionslösung (1 ml) in Szintillationsgefäße eluiert. Die in die Liposomen aufgenommene Menge an radioaktivem Phosphat wurde im Szintillationszähler gemessen (Meßzeit > 5 Minuten).

#### 2.7.3.4 Berechnung der Transportaktivität

Die Aufnahme  $y$  von radioaktivem Phosphat im Austauschmodus kann durch eine exponentielle Funktion der Form

$$y = y_0 + AM \cdot e^{\frac{-x}{t_{1/2}}}$$

y:	aufgenommene Menge	in cpm
x:	Zeit	in min
y <sub>0</sub> :	Menge zum Startzeitpunkt	in cpm
t <sub>1/2</sub> :	Halbwertszeit der Aufnahmerate	in min
AM:	Amplitude der Aufnahme	in cpm

beschrieben werden. Die Anfangsaufnahmerate  $AR_0$  (erste Ableitung der Funktion  $y(x)$  zum Zeitpunkt  $x = 0$ ) ergibt sich aus dem Quotienten von  $AM$  und  $t_{1/2}$ .



Die spezifische Radioaktivität  $r_{\text{spez.}}$  des Phosphates ergibt sich zu:

$$A_{\text{spez.}} = \frac{A}{n}$$

mit  $A = A_{\text{SL}} \cdot V_{\text{SL}}$

und  $n = c_{\text{Pi}} \cdot V$ .

$A_{\text{spez.}}$ :	spezifische Radioaktivität	in
$A$ :	Radioaktivität im Meßansatz	cpm/mol
$n$ :	Phosphatmenge im Meßansatz	in cpm in mol
$A_{\text{SL}}$ :	Radioaktivität der Startlösung	in cpm/ $\mu$ l
$V_{\text{SL}}$ :	Volumen der Startlösung	in $\mu$ l
$c_{\text{Pi}}$ :	Phosphatkonzentration	in mol/l
$V$ :	Volumen des Meßansatzes	in l

Die Größen  $A$ ,  $n$ ,  $c_{\text{Pi}}$  und  $V$  beziehen sich auf den Meßansatz bestehend aus Liposomen und Startlösung.  $A_{\text{SL}}$  beträgt in der Regel etwa 50.000 cpm/ $\mu$ l,  $V_{\text{SL}}$  10  $\mu$ l,  $c_{\text{Pi}}$  30 mM und  $V$  110  $\mu$ l.

Die spezifische Transportaktivität des Phosphatcarriers in den Liposomen  $A$  wird aus der Anfangsaufnahmerate  $m_0$ , der spezifischen Radioaktivität des Phosphates im Meßansatz  $r_{\text{spez.}}$  und der Proteinmenge  $m_{\text{Prot.}}$  berechnet:

$$EA = \frac{AR_0 \cdot x}{A_{\text{spez.}} \cdot m_{\text{Prot.}}}$$

$EA$ :	spezifische Transportaktivität	in mU/mg in cpm/mol
$AR_0$ :	Anfangsaufnahmerate	
$x$ :	Korrekturfaktor	
$A_{\text{spez.}}$ :	spezifische Radioaktivität	in mol
$m_{\text{Prot.}}$ :	Proteinmenge	in g

Der Korrekturfaktor  $x$  muß eingeführt werden, da die Anfangsaufnahmerate  $AR_0$  sich nur auf den Teil des Meßansatzes bezieht, der tatsächlich im Szintillationszähler vermessen wird, während sich die Proteinmenge  $m_{\text{Prot.}}$  auf den ganzen Meßansatz bezieht. Er beträgt im alten Meßsystem 1,2 und im neuen Meßsystem 1,21.

## 2.8 Isolierung von Lipiden aus Truthahneiern

Die Puteneier wurden von der Putenbrüterei Hilkmann, Wachtendonk, geliefert. Die Eier stammen aus England und sind einige Tage alt. Während der Präparation wurden Plastikgefäße grundsätzlich vermieden. Die Präparation wurde grundsätzlich zügig an einem Tag durchgeführt. Sämtliche Lösungsmittel wurden in z.A.-Qualität eingesetzt.

### 2.8.1 Isolierung der Lipide

Zehn Eier wurden aufgeschlagen und das Eigelb vom Eiweiß abgetrennt. Das Eigelb wurde erst ohne Zusatz und dann mit Methanol (550 ml) gerührt (30 min, 4 °C) bis der Niederschlag fein verteilt war. Die Mischung wurde mit Chloroform (1,1 l) versetzt und weitergerührt (4 °C, 30 min, N<sub>2</sub>-Atmosphäre). Die Suspension wurde mit einer Nutsche mit Glasfritte getrennt und die flüssige Phase auf etwa 50 - 80 ml eingengt (Rotationsverdampfer, 30 bis 35 °C).

Die eingengte Lipidlösung wurde in ein großes Becherglas überführt und Aceton zugetropft (650 ml, 4 °C). Entscheidend war hier eine langsame Zugabe des Acetons über etwa 10 min. Der Überstand wurde abdekantiert und der Niederschlag zweimal mit Aceton (30 ml, 4 °C) gewaschen und getrocknet (Rotationsverdampfer, 30 - 35 °C). Die Ausbeute beträgt etwa 15 - 20 Gramm Lipid.

Die Lipide wurden in Methanol (40 ml, 4 °C) suspendiert und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 2.000·g, 4 °C). Das Pellet wurde erneut mit Methanol (15 ml) gewaschen und abzentrifugiert. Die klaren Methanolüberstände wurden getrocknet (Rotationsverdampfer, 30 - 35 °C). Die Ausbeute schwankte und sollte etwa 8 - 10 g betragen. Die Lipide wurden in Methanol (100 mg Lipid/ml) gelöst bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.8.2 Analyse der Lipide

Die Lipide wurden mittels DC analysiert. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Chloroform (30 Teile), Aceton (10 Teile), Methanol (5 Teile), Essigsäure (5 Teile) und Wasser (2 Teile) verwendet. Als Trennmaterial diente eine Kieselgelplatte (0,25 mm, POLYGRAM SIL G, Macherey-Nagel). Die Lipide wurden entsprechend ihrer Polarität aufgetrennt und in einer Joddampfkammer sichtbar gemacht. Als Standard dienten reine Phospholipide (Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin).

### 2.8.3 Vorbereitung der Lipide zur Rekonstitution

Vor der Verwendung der Lipide zur Rekonstitution wurden sie getrocknet (Rotationsverdampfer, 30 - 35 °C sowie Lyophilisationsgerät, 10 min) und in gewünschter Konzentration (100 mg/ml) in Puffer (HEPES, 50 mM, pH 7,5) suspendiert und beschallt (6 min, *output* 40 % bei Stufe 3-4). Zur Aufbewahrung der Lipide wurden sie wässriger Lösung eingefroren (-20 °C).

## 2.9 Weitere Optimierungsansätze

### 2.9.1 Variation des zur Rekonstitution verwendeten Detergenz

Standardmäßig wurde zur Rekonstitution des Phosphatcarriers als nichtionisches Detergenz Triton X-114 in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt (siehe 2.7.2). Um den Einfluß des Detergenzes auf die Transportaktivität zu untersuchen, wurden weitere Detergentien in unterschiedlichen Konzentrationen zur Rekonstitution verwendet. Triton X-100, C<sub>5</sub>E<sub>8</sub>, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> und C<sub>13</sub>E<sub>10</sub> wurden jeweils in Endkonzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 % zugesetzt.

### 2.9.2 Verwendung unterschiedlicher Verhältnisse von Lipid zu Protein

Neben der normalerweise eingesetzten Lipidkonzentration von 16 mg/ml im Rekonstitutionsansatz wurden Rekonstitutionsansätze mit nur 3,2 mg/ml Lipid eingesetzt. Die Proteinmenge – standardmäßig 45 - 50 µg – wurde zwischen 5 und 100 µg ebenfalls variiert. Damit wurde ein Spektrum des Verhältnisses von Lipid zu Protein von 32 zu 1 bis 3200 zu 1 abgedeckt.

### 2.9.3 Lipidzusammensetzung nach Wohlrab

Es wurden reine Lipide von Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA, eingesetzt.

Phosphatidat	10 % Natriumphosphatidat aus Ei in Chloroform
PC	10 % Phosphatidylcholin aus Ei in Chloroform
PE	10 % Phosphatidylethanolamin aus Ei in Chloroform
Lipidpuffer	50 mM HEPES (pH 6,8)

In einem Spitzkolben wurden Phosphatidat (17,8 µl), PC (435 µl) und PE (547 µl) gemischt und das Chloroform durch Begasen mit Stickstoff oder Argon entfernt. Der zurückgebliebene Lipidfilm wurde in Lipidpuffer (1 ml) aufgenommen und durch Vortexen und Ultraschallbehandlung suspendiert.

### 2.9.4 Alternative Abreicherung von Detergentien nach Jezek

Die Abreicherung der beiden Detergentien im Rekonstitutionsansatz konnte neben der normalen Säulenmethode (siehe 2.7.2) auch über portionsweise Zugabe der Bio-Beads (siehe 2.9.5) oder in Kombination der beiden Verfahren durchgeführt werden. Dieser Ansatz wurde von Jezek *et al.* (1990) verfolgt. Der Rekonstitutionsansatz wurde mit Bio-Beads (40 mg/mg Detergenz) inkubiert (2 h rühren, RT) und über zwei Bio-Beads-Säulen (40 mg/mg Detergenz) zentrifugiert (2 min, 500-g, RT).

## 2.9.5 Abreicherung der Detergentien durch portionsweise Zugabe der Bio-Beads

Die portionsweise Zugabe von Bio-Beads zum Rekonstitutionsansatz erfolgte in drei Schritten. Jeweils nach der Zugabe der Bio-Beads wurde der gesamte Ansatz längere Zeit langsam gerührt. Nach der dritten Inkubation wurden die Proteoliposomen mit einer Pipette abgenommen. Nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, Hercules, USA) haben Bio-Beads eine Adsorptionskapazität von 1 mg nichtionisches Detergenz pro 14 mg Bio-Beads. Ein Rekonstitutionsansatz (700 µl) enthielt in der Regel (siehe 2.7.2) 7 mg Triton X-114 und weniger als 0,5 mg Lauroylsarcosinat. Bei jeder Zugabe wurden 50 bis 150 mg Bio-Beads pro Rekonstitutionsansatz zugegeben. Die anschließende Inkubationszeit betrug jeweils zwischen 60 und 120 Minuten, die Inkubation erfolgt bei 4 °C oder RT.

## 2.9.6 Extrudieren von Proteoliposomen

Um Liposomen einheitlicher Größe zu erhalten, wurden die vorgeformten Liposomen vor oder die Proteoliposomen nach der Rekonstitution extrudiert. Hierzu wurde die Lipidsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 4 °C wieder aufgetaut. Anschließend wurden sie mit dem LiposoFast-System 15 mal durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 100, 200 oder 400 nm extrudiert.

## 2.10 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die hier verwendete Vorschrift stammt aus der Arbeitsgruppe Pfanner, Freiburg. Die Hefezellen wurden protoplastiert und aufgebrochen und anschließend die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation isoliert.

Tris-Puffer	100 mM Tris·H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 9,4), 15 mM DTT (frisch aus Stammlösung)
Sorbitlösung	1,2 M Sorbit
Zymolyasepuffer	1,2 M Sorbit, 20 mM KP <sub>i</sub> (pH 7,4)
Homogenisierungspuffer	0,6 M Sorbit, 10 mM Tris·HCl (pH 7,4), 0,5 % BSA (fettsäurefrei), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (aus frischer Stammlösung in Ethanol)
SEM	250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS·KOH (pH 7,2)

Die Hefezellen wurden in YPG-Medium (1,5 l, siehe 2.1.3.2) angezogen (bis OD<sub>600</sub> von 1,5 ± 0,2) und geerntet (3.100·g, 4 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in Wasser (20 ml) resuspendiert, erneut sedimentiert (3.100·g, 6 min, RT) und das Feuchtgewicht FG bestimmt. In drei Schritten wurden die Hefezellen mit Tris-Puffer

(2 VÄ) inkubiert (10 min, 30 °C, schwenken bei 70 UPM), mit Sorbitlösung (> 10 VÄ) gewaschen und in Zymolyasepuffer (6,5 VÄ) mit Zymolyase (2 mg pro g FG, frisch suspendiert in Zymolyasepuffer) protoplastiert (45 bis 60 min, 30 °C, Schwenken bei 100 UPM). Zwischen diese Schritten wurden die Zellen jeweils sedimentiert (2.000·g, 4 min, RT). Die Protoplastierung wurde mittels Verdünnung (1:40) in Wasser bzw. Zymolyasepuffer kontrolliert.

Die weitere Isolation der Mitochondrien wurde bei 0 bis 4 °C durchgeführt, sämtliche eingesetzten Lösungen und Puffer waren vorgekühlt. Die Protoplasten wurden sedimentiert (1.100·g, 4 min, 2 °C), mit Sorbitlösung gewaschen (> 10 ml pro g FG), erneut sedimentiert (1.100·g, 4 min, 2 °C) und in Homogenisierungspuffer (6,5 ml pro g FG) homogenisiert (13 Passagen im Teflon-in-Glas-Homogenisator). Die aufgebrochenen Protoplasten wurden mit Homogenisierungspuffer (1 VÄ) verdünnt und größere Zellbruchstücke sedimentiert (2.000·g, 4 min, 2 °C). Die Mitochondrien im Überstand wurden sedimentiert (25.000·g, 10 min, 2 °C), in SEM (20 ml) resuspendiert, von größeren Bestandteilen getrennt (1.600·g, 4 min, 2 °C) und erneut sedimentiert (25.000·g, 10 min, 2 °C). Der Proteingehalt der Mitochondrien wurde bestimmt und die Mitochondrien in SEM (200 µl) resuspendiert gelagert (-20 °C).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transportmessungen mit dem Phosphatcarrier

Für aus Rinderherzen isolierten Phosphatcarrier wurden für den Phosphataustausch  $v_{\max}$ -Werte im Bereich von 120 U/mg Protein gemessen (Stappen und Krämer, 1994). Ähnliche Werte ergaben sich für den Carrier aus *S. cerevisiae* – sowohl für aus Hefe isoliertes (Guerin *et al.*, 1990) als auch für heterolog exprimiertes Protein (Wohlrab und Briggs, 1994).

Rekonstitutionsversuche und anschließende Transportmessungen von heterolog exprimiertem Protein aus *S. cerevisiae* im Meßsystem, das zuvor zur Untersuchung des aus Rinderherzen isolierten Proteins verwendet wurde (Schroers, 1998), zeigten – wenn überhaupt – nur geringe Austauschaktivität mit  $v_{\max}$  kleiner als 0,1 U/mg Protein, also mindestens drei Größenordnungen weniger als die Literaturwerte. Eine glaubwürdige Interpretation der Ergebnisse in diesem Meßsystem war nicht möglich, da sich die Kinetiken nicht deutlich von Hintergrundschwankungen abhoben.

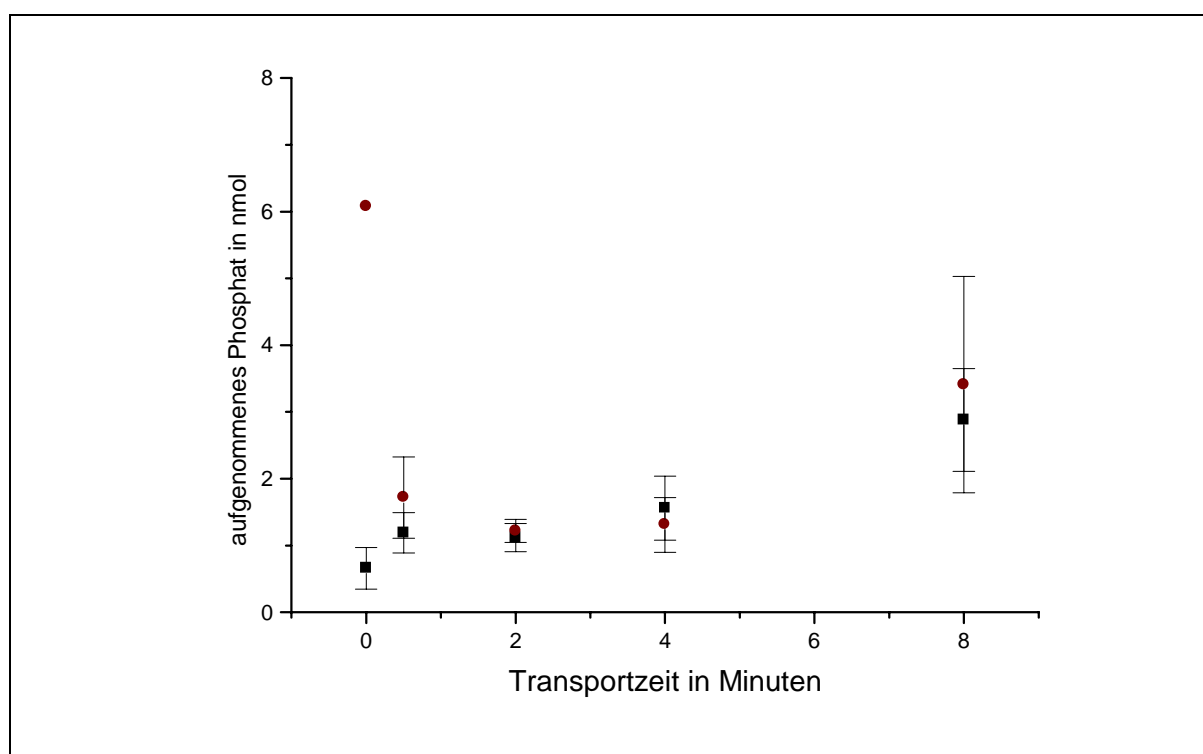


Abbildung 6: Exemplarische Transportmessungen vor der Optimierung des Meßsystems. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen für Liposomen mit (■) und ohne (●) Phosphatcarrier. Die Ansätze (100  $\mu$ l) enthalten 16 mg/ml Lipide, 45 bzw. 0  $\mu$ g/ml Phosphatcarrier, 30 mM  $KP_i$  und 50 mM HEPES (pH 6,8).

Das heterolog exprimierte Protein wurde ebenfalls mit einer Lipidmischung nach Wohlrab (Wohlrab und Briggs, 1994) rekonstituiert und vermessen. Abweichend wurde kein Calcium-Phosphatidat eingesetzt. Auch hier konnte keine signifikante Transportaktivität im Austauschmodus bestimmt werden<sup>1</sup> (Schauen und Meinhardt, persönliche Mitteilungen).

Ausgehend von diesen beiden Vorschriften wurde das Rekonstitutionssystem optimiert (siehe 3.1.2). Da dieser Optimierungsprozeß mit einer Vielzahl von Transportmessungen verbunden war, wurde zuvor das Meßsystem der Gabelmethode (Dawson *et al.*, 1987) durch ein zuverlässigeres, fehlerreduziertes und durchsatzstärkeres Meßsystem ersetzt (siehe 3.1.1). Im Anschluß an die Optimierung wurde der Phosphatcarrier in dem neuen Rekonstitutions- und Meßsystem charakterisiert (siehe 3.1.3).

### 3.1.1 Einführung eines neuen Meßsystem

Das zu Beginn dieser Arbeit verwendete Meßsystem hat einige Nachteile in Bezug auf Handhabung, Fehleranfälligkeit und Reproduzierbarkeit:

- Etwa jeder vierte bis fünfte Meßpunkt wich deutlich (z.T. um einen Faktor von drei bis fünf) nach oben ab.
- Bei einer Doppelbestimmung mit zwei identischen Proteoliposomenproben wichen die einzelnen Meßpunkte um bis zu 25 % voneinander ab. Auch aus den Kinetiken berechnete Aktivitäten unterschieden sich deutlich.
- Die Meßapparatur erlaubte die Messung von sechzig Einzelproben. Dies entspricht fünf Doppelbestimmungen zu je 6 Meßzeitpunkten. Da meist ein bis zwei Kontrollmessungen gemacht werden mußten, reduziert sich die effektive Zahl auf 3 Doppelbestimmungen.
- Unter Verwendung der Gabeln befanden sich radioaktive Lösungen offen auf den Gabelspitzen. Diese Handhabung entspricht nicht modernen Sicherheitsvorstellungen im Umgang mit radioaktiven Substanzen.

Um diese Probleme zu lösen, wurde das alte Meßsystem durch ein neues ersetzt. Die Gabeln, die zur Zugabe von Start- und Stopplösung verwendet wurden, wurden durch zwei 8-Kanal-Pipetten ersetzt. Der Meßansatz wurde nicht mehr in Reaktionsgefäßen in Metallblöcken angesetzt, statt dessen wurden Mikrotiterplatten mit V-Boden

---

<sup>1</sup> Eine Vielzahl der hier beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Andrea Meinhardt durchgeführt. Ein weiterer Teil wurde von Andrea Meinhardt alleine durchgeführt. Diese Experimente sind entsprechend gekennzeichnet.





exprimierte Phosphatcarrier nicht in aktiver Form rekonstituiert werden. Eine erfolgreiche Rekonstitution gelang jedoch mit selbst isolierten Lipiden aus frischem Truthahneigelb, die mit Cardiolipin komplementiert wurden (siehe 3.1.2.1) und mit *E. coli total lipid extract*, der von der Firma Avanti Lipids bezogen wurde (siehe 3.1.3).

Das bei der Solubilisierung aus *inclusion bodies* verwendete Lauroylsarcosinat und das zur Rekonstitution eingesetzte nichtionische Detergenz müssen aus dem Rekonstitutionsansatz entfernt werden. Dies geschieht durch Zugabe von Bio-Beads, die in der Lage sind, die Detergentien zu adsorbieren. Die Abreicherung durch Bio-Beads kann unterschiedlich erfolgen. Im alten System wurde ein Säulenverfahren verwendet: der Rekonstitutionsansatz wird 15 mal über eine Säule aus Bio-Beads gegeben. Andere mögliche Ansätze sind die einmalige längere Inkubation in Bio-Beads und anschließende Passage über zwei große Bio-Beads-Säulen (Jezek *et al.*, 1990) und die portionsweise mehrfache Zugabe von Bio-Beads zum Rekonstitutionsansatz mit anschließender Inkubation (Rigaud *et al.*, 1995). Beide Ansätze wurden mit unterschiedlichen Bio-Beads-Mengen durchgeführt; sie führten nicht zu einer Erhöhung der Transportaktivität des Phosphatcarriers (Daten nicht gezeigt).

Die Lipide, die zur Rekonstitution des Phosphatcarriers eingesetzt werden, werden zuvor zu Liposomen vorgeformt. Dazu werden sie fünf bis zehn Minuten mit Ultraschall beschallt. Eine andere Möglichkeit, Liposomen zu erzeugen, besteht darin, eine Lipidsuspension mehrfach einem Einfrier-Auftau-Zyklus zu unterwerfen und anschließend durch Polycarbonatfilter mit Porengrößen zwischen 100 nm und 400 nm zu extrudieren. Diese Methode führt zu Liposomen mit recht einheitlicher Größe (MacDonald *et al.*, 1991). Dennoch führte der Einsatz von solchen Liposomen nicht zu einer Steigerung der Transportaktivität der erzeugten Proteoliposomen. Dieselbe Prozedur kann mit Proteoliposomen nach der Rekonstitution durchgeführt werden. Auch hier zeigt dieser Ansatz nicht den gewünschten Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Die Reihenfolge, in der bei der Rekonstitution die Bestandteile des Ansatzes zugegeben werden müssen, ist ebenfalls wichtig (Krämer und Heberger 1986): Protein, Lipide, Detergenz und anschließend Puffersubstanzen und Wasser. Bei dieser Reihenfolge und den im Standardansatz verwendeten Mengen beträgt die Detergenzkonzentration nach dessen Zugabe etwa fünf Prozent (abhängig von der genauen Proteinmenge). Diese Menge reicht aus, um theoretisch die vorgeformten Liposomen vollständig aufzulösen. In der Praxis macht sich dies durch ein deutliches Aufklaren des Gemisches bemerkbar. Rigaud *et al.* (1995) verfolgten hier bei der Rekonstitution einen anderen Ansatz. Dort wird das Detergenz als letztes zugegeben, es wird zudem nicht mehr Detergenz zugesetzt, als zur 25 %-igen Solubilisierung der Liposomen nötig ist. Für C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> beträgt diese Konzentration – bei der hier

verwendeten Lipidkonzentration von 16 mg/ml – etwa 0,5 %, für Triton X-100 1 %. Da die zur Solubilisierung nötige Detergenzkonzentration mittels Extinktion bei 600 nm (d.h. Aufheben der Trübung der Liposomenlösung) bestimmt wird und Triton X-114 in Konzentrationen um 1 % selbst trüb ist, kann die zur partiellen Liposomensolubilisierung benötigte Konzentration an Triton X-114 nicht experimentell bestimmt werden. Sie wird entsprechend der für Triton X-100 benötigten Konzentration auf 1 % geschätzt. Mit dieser Detergenzkonzentration wurde der Ansatz nach Rigaud auch für den Phosphatcarrier durchgeführt. Er hatte keinen steigernden Einfluß auf die Transportaktivität des Phosphatcarriers (Meinhardt, 1999).

### 3.1.2.1 Rekonstitution mit Lipiden aus Truthahneigelb

Zur Rekonstitution des Phosphatcarriers wurden selbst isolierte Lipide aus frischem Truthahneigelb eingesetzt. Dieses Vorgehen führte in der Arbeitsgruppe Klingenberg zu höheren und reproduzierbareren Transportaktivitäten beim mitochondrialen Nukleotidcarrier (Klingenberg, 1999). Die Truthahneier wurden drei bis fünf Tage nach dem Legedatum zur Isolation der Lipide verwendet. Die Ausbeute betrug 0,8 bis 1 g Lipid pro Ei. Hauptbestandteile der Lipide sind nach einer DC-Analyse Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin.

Die selbst isolierten Lipide aus Truthahneigelb führen – alleine eingesetzt – nicht zu einer Erhöhung der Aktivität des Phosphatcarriers, erst Zugabe von 2 mg/ml Cardiolipin ergab Transportaktivitäten um 9 U/mg Protein (Meinhardt, 1999):

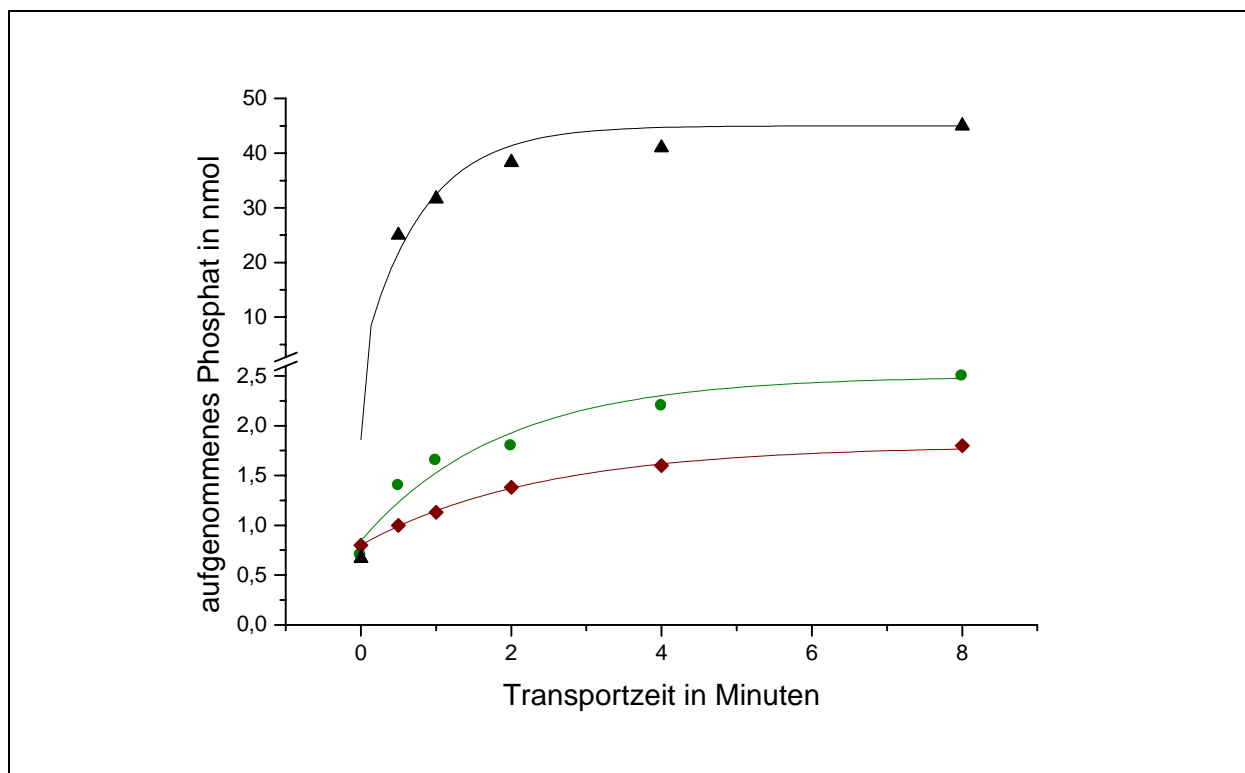


Abbildung 8: Phosphataufnahme in Proteoliposomen (100  $\mu$ l); verwendete Lipide (16 mg/ml): käufliches Phosphatidylcholin aus Truthahneigelb (●) bzw. selbst isolierte Lipide aus Truthahneigelb ohne (◆) und mit (▲) 2 mg/ml Cardiolipin; Phosphatcarrier (45  $\mu$ g/ml) und Puffer (30 mM  $KP_i$  und 50 mM HEPES)

### 3.1.3 Charakterisierung des Phosphatcarriers im neuen Rekonstitutions- und Meßsystem

Neben selbst extrahierten Lipiden aus Truthahneigelb führte auch die Verwendung von *E. coli total lipid extract* zu einer Transportaktivität von 10 U/mg Protein (siehe Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). *E. coli total lipid extract* wurde für die weiteren Experimente als Lipidkomponente eingesetzt. Zur Validierung des neuen Systems wurde der Phosphatcarrier u.a. in Bezug auf seine kinetischen Daten und seine Inhibierbarkeit charakterisiert.

#### 3.1.3.1 Kinetische Daten des Phosphatcarriers

Der Phosphatcarrier weist in *E. coli total lipid extract* rekonstituiert eine maximale Transportaktivität von  $v_{\max} = 10$  U/mg Protein auf. Der  $K_M$ -Wert für Phosphat beträgt 5 mM (Meinhardt, 2000).

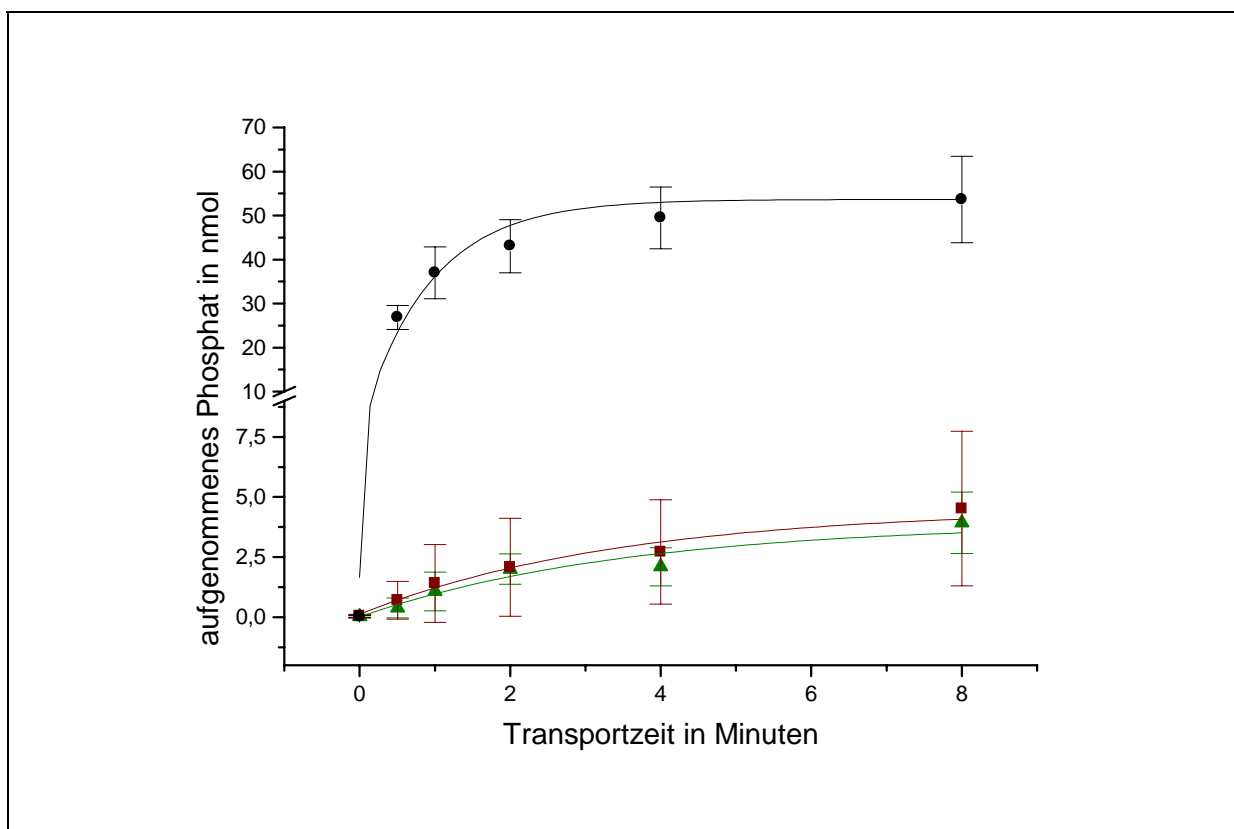


Abbildung 9: Phosphataufnahme in Proteoliposomen; dargestellt sind Messungen mit Wildtyp-PIC (●), mit inhibiertem Wildtyp-PIC (■) und ohne Protein (▲). Die Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Doppelbestimmungen und deren Standardabweichung. Die Ansätze (100  $\mu$ l) enthielten 16 mg/ml *E. coli total lipid extract*; Phosphatcarrier (0 bzw. 50  $\mu$ g/ml) und Puffer (30 mM  $KP_i$  und 50 mM HEPES); inhibiert wurde mit Mersalylsäure (3 mM)

### 3.1.3.2 Transportaktivität einer cysteinfreien Mutante

Als cysteinfreie Mutante wurde eine Mutante gewählt, in der alle drei Cysteine des Wildtyps (C28, C134, C300) durch Valin ersetzt wurden (Meinhardt, 2000). Eine solche Mutante zeigte im alten Meßsystem eine Aktivität von 40 bis 75 % der Wildtyp-Aktivität (Schroers 1998). Im neuen Meßsystem zeigt sie eine Aktivität von 0,4 U/mg. Dies entspricht 3 % der Wildtyp-Aktivität, liegt also deutlich unter der im alten System. Mittels SDS-PAGE wurde die Einbaurrate des Proteins in die Proteoliposomen analysiert (siehe 2.6.2). Zur Quantifizierung dienten unterschiedliche, definierte Mengen an solubilisiertem Monomer und Dimer. Visualisierung der Proteine erfolgte über Silberfärbung der Gele. Die Einbaurrate der Mutante entspricht der des Wildtyp-Proteins von 15-20 %. Anzumerken ist, daß im Vergleich zu den Aktivitätswerten im alten System (WT  $\sim$  0,2 U/mg, VVV  $\sim$  0,16 U/mg) die Aktivität des Wildtyps deutlich, die der Mutante nur unwesentlich gesteigert werden konnte.

### 3.1.3.3 Inhibitionsmessungen

Es wurden Rekonstitutionsexperimente und Aktivitätsmessungen mit *E. coli*-Lipiden (*total lipid*, Avanti) mit und ohne Mersalylsäure durchgeführt. Der Phosphatcarrier zeigt nach Inhibition mit Mersalylsäure eine Restaktivität von unter 5% (vgl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Versuche von Andrea Meinhardt (Meinhardt 2000) zeigen, daß ein ähnliches Inhibitionsverhalten auch bei deutlich geringeren Mersalylkonzentrationen (0,3 mM) auftritt. Die Inhibition kann mit einem deutlichen Überschuß an DTT (>50 mM) wieder weitestgehend aufgehoben werden.

## 3.2 Konstruktion und Untersuchung eines genetischen Dimers

### 3.2.1 Idee des genetischen Dimers

Der mitochondriale Phosphatcarrier ist – wie vermutlich alle Mitglieder der MCF – in einer homodimeren Einheit aktiv (vgl. 1.4). Man nimmt an, daß die Dimerisierung in der inneren Membran stattfindet, da der Proteintransport über die äußere Membran in entfalteter – und somit monomerer – Form stattfindet (Voos *et al.*, 1999). Im rekonstituierten System wird der Phosphatcarrier ebenfalls in monomerer Form aus *inclusion bodies* solubilisiert eingesetzt und dimerisiert im Prozeß der Rekonstitution (Schroers, 1998).

Die Dimerisierung während der Rekonstitution verläuft unspezifisch ab, d.h. wenn zwei unterschiedliche Monomere (z.B. Wildtyp W und eine beliebige Mutante M) eingesetzt werden, erhält man ein Gemisch aus den vier denkbaren Kombinationen WT-WT, M-M, WT-M und M-WT, wobei unklar ist, ob und inwiefern sich WT-M und M-WT voneinander unterscheiden (d.h. das Dimer keine zweizählige Rotationsachse aufweist).

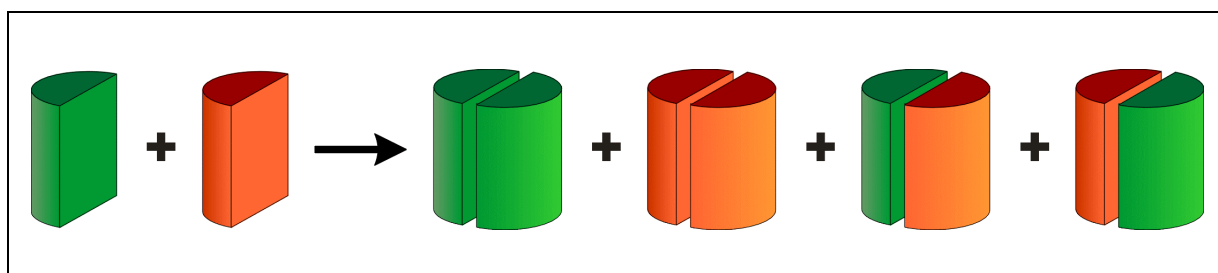


Abbildung 7: Bildung der denkbaren unterschiedlichen Kombinationen von zwei unterschiedlichen Monomeren bei der Rekonstitution eines Gemisches aus den beiden.

Es ist ungewiß, inwiefern die Separierung der Heterodimere WT-M bzw. M-WT von den beiden Homodimeren WT-WT und M-M und anschließende aktive Rekonstitution (vgl. 1.7) in dem neuen Rekonstitutionssystem (vgl. 3.1) erfolgreich durchgeführt werden können.

Unabhängig davon hat dieser Ansatz trotz seiner Eleganz praktische Nachteile:

- Das Protein wird in monomerer Form exprimiert. Für eine Transportmessung muß das Heterodimer jeweils aus den beiden Monomeren durch mehrfache Dialyse dimerisiert und in zwei Schritten chromatographisch gereinigt werden. Diese Schritte sind zeitaufwendig und mit Verlusten bezüglich Ausbeute und Aktivität verbunden.

- Das Heterodimer ist in dieser Form nicht lagerbar, es muß für jede Transportmessung neu präpariert werden.
- Sollte sich erweisen, daß die beiden Formen WT-M und M-WT nicht identisch sind, ist der Ansatz dennoch nicht geeignet, nur eine der beiden Formen zu erhalten.
- Eine homologe Expression eines Heterodimers in *S. cerevisiae* ist nicht möglich.

Ein genetisches Dimer würde die Handhabung erleichtern und Probleme des Ansatzes nach Schroers lösen. Unter einem genetischen Dimer wird ein Protein verstanden, das von einer Verdopplung des Gens des Monomers kodiert wird. Die beiden Gene der Monomere sind im Gen des Dimers nicht durch ein Stop-Codon getrennt und werden in einem abgelesen. Das Genprodukt – das genetische Dimer – hat somit die doppelte Größe des Monomers.



Abbildung 8: Schematische Darstellung des genetischen Dimers: Gen und Protein

Die Problematik, daß das nicht-kovalente Dimer nur sehr eingeschränkt lagerbar ist, sollte bei einem genetischen Dimer, daß in vergleichbarer Form wie das Monomer exprimiert wird, nicht auftreten, da der Phosphatcarrier in *inclusion bodies* bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine lange Haltbarkeit aufweist. Das genetische Dimer kann dann nach Bedarf solubilisiert und rekonstituiert werden. In den entsprechenden Vektor kloniert, kann das genetische Dimer auch homolog in *S. cerevisiae* exprimiert werden.

### 3.2.2 Konstruktion des Expressionsvektors

Zur Expression wurde ein pET-3a-Vektor verwendet, in den zwischen die *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstelle folgendes Konstrukt kloniert wurde:

- Das *MIR1*-Gendes PIC aus Hefe ohne abschließendes Stop-Codon
- eine *MunI/MfeI*-Schnittstelle
- ein weiteres *MIR1*-Gen des PIC aus Hefe mit abschließendem Stop-Codon

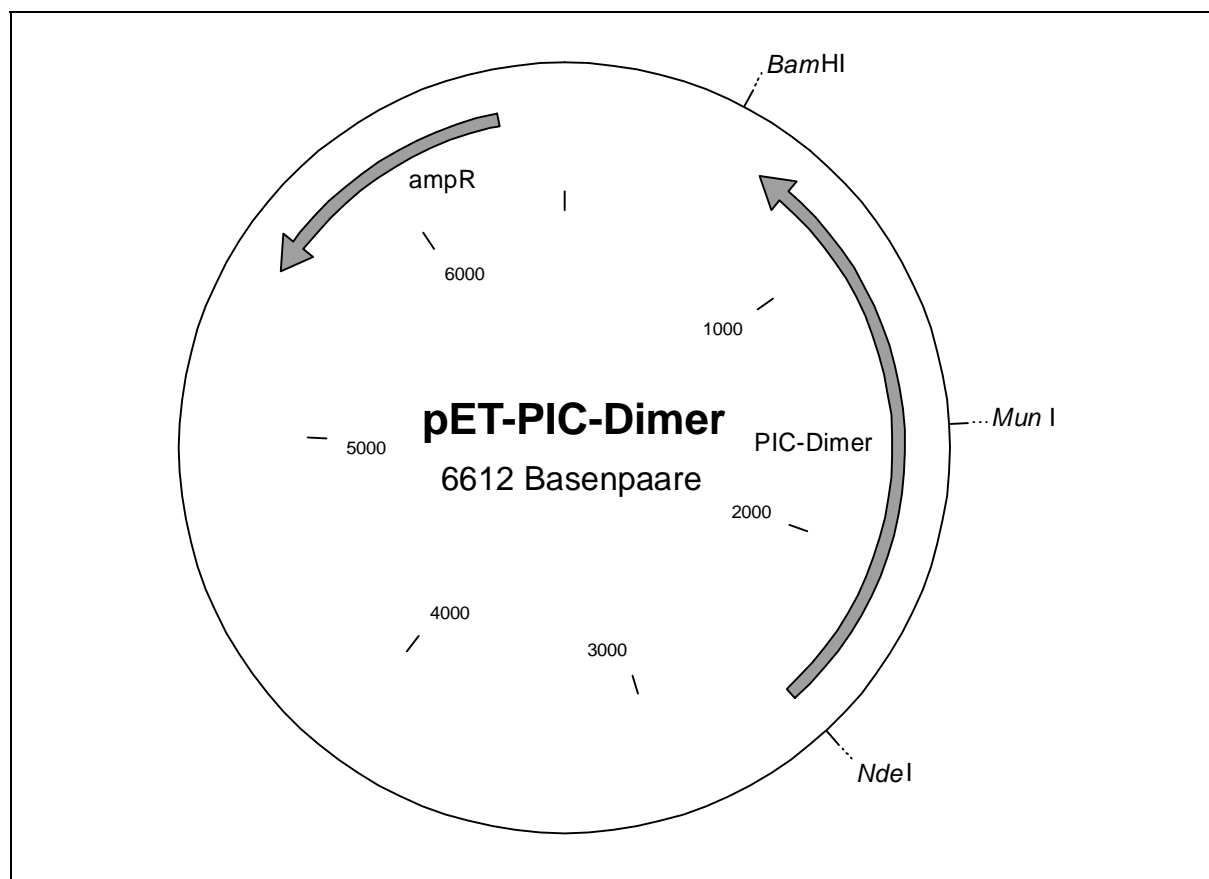


Abbildung 9: Vektor zur Expression des genetischen Dimers basierend auf einem pET-3a-Vektor

Das genetische Dimer wurde sowohl als Dimer zweier Wildtyp-Monomere als auch als Dimer zweier cysteinfreien Mutanten (C28V C134V C300V) generiert. Darüber hinaus wurden drei weitere Veränderungen vorgenommen, die den Umgang mit dem genetischen Dimer erleichtern, das Spektrum der denkbaren Experimente mit dem genetischen Dimer erweitern und die Generierung von unterschiedlichen Mutanten und Kombination von Mutationen erleichtern: Erstens wurde das Konstrukt C-terminal mit einem HIS6-Tag versehen, so daß eine gezielte Reinigung des Proteins möglich ist. Der HIS6-Tag bietet zusätzlich die Möglichkeit der gezielten Identifizierung des Proteins mit einem spezifischen Antikörper. Zweitens wurde zwischen die beiden Monomere eine Faktor Xa-Protease-Schnittstelle eingefügt, die eine gezielte Spaltung des genetischen Dimers zwischen den beiden Monomeren gestattet. Die Schnittstelle besteht aus der Aminosäureabfolge Ile-Glu-Gly-Arg, die eingefügte Basensequenz (vgl. 2.4) wurde unter Berücksichtigung der von *E. coli* bevorzugten *codon-usage* (Hénaut und Danchin, 1996) ausgewählt. Drittens wurden die beiden Monomere in einem Kassettensystem angeordnet, das gestattet, Mutationen zwischen den Basen 12 und 256 des Monomers nur einmal generieren zu müssen und anschließend gezielt in die erste oder zweite Dimerhälfte zu klonieren. Der dabei als Kasette verwendete Bereich wird durch eine SacII-Schnittstelle, die



durch zwei stille Mutationen generiert wurde, und eine natürlich auftretende KpnI-Schnittstelle flankiert:

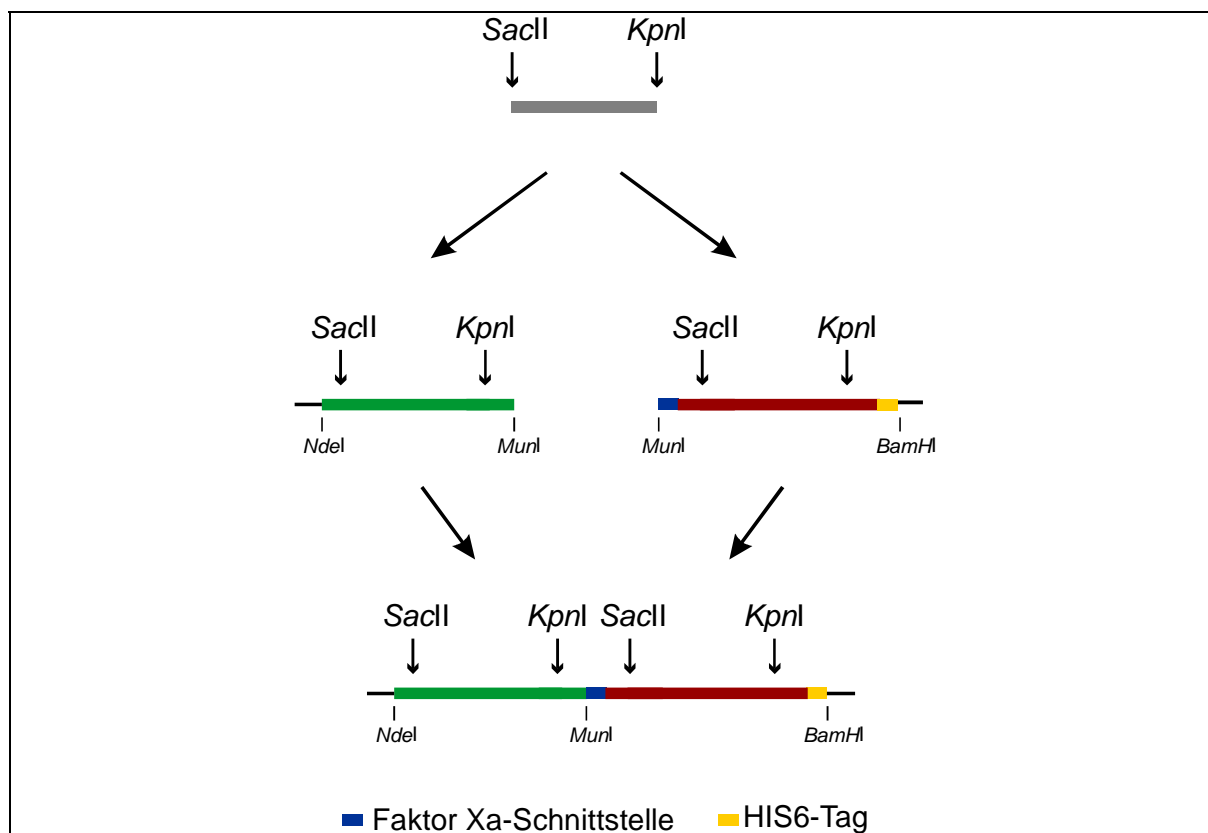


Abbildung 10: Kassettsystem zur vereinfachten gezielten Einföhrung von Mutationen in eine der beiden Hälften des genetischen Dimers

### 3.2.3 Expression des Dimers

Die Expressionsvektoren der beiden Dimere (vgl. 3.2.2) wurden in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Expression erfolgte nach bekannter Vorschrift mittels Induktion durch IPTG. Die Zellen wurden nach drei Stunden geerntet und das Protein in den *inclusion bodies* der Vorschrift entsprechend aufgearbeitet. Die Expression des Proteins wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe Abbildung 11).

Die Expression des genetischen Dimers liefert etwas weniger Protein (~ 15-20 mg/l Kultur) als die des Monomers (20-40 mg/ml Kultur). Die Reinheit des Proteins ist ähnlich der des Monomers. Das Wildtyp-Dimer und das cysteinfreie Dimer zeigen identische Expressionsverhalten und -muster.

Zur Überprüfung und Spezifizierung der Ergebnisse der SDS-PAGE wurde ein Western-Blot mit dem polyklonalen Antikörper gegen das PIC-Monomer durchgeführt. Neben den erwarteten Banden zeigten sich eine Reihe von unspezifischen Banden.

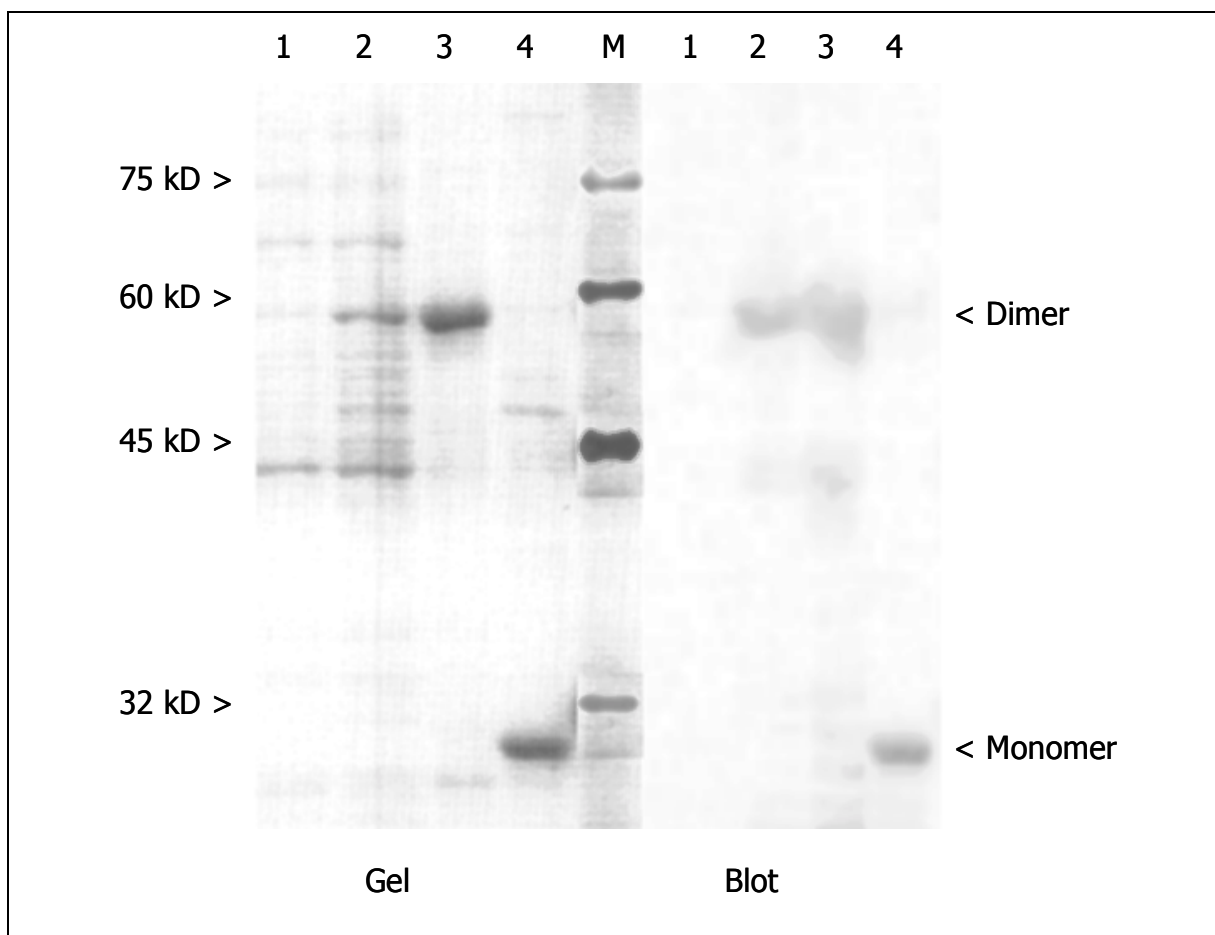


Abbildung 11: SDS-PAGE und Western-Blot zur Analyse der Expression des Dimers in inclusion bodies (aufgetragen wurden Proben, die aus 150  $\mu$ l Zellkultur stammen).

Gel: 12 %-ig, Coomassie-Blau-Färbung, 1: Gesamtprotein vor Induktion; 2: Gesamtprotein nach Induktion; 3: Dimer-IB; 4: WT-IB; M: Proteinmarker, apparente Molekulargewichte links

Western-Blot: polyklonaler Antikörper gegen mitochondrialen Phosphatcarrier, gleiche Auftragung wie im Gel

### 3.2.4 Lokalisation des Dimers

Das Dimer fällt, wie erwartet, in *inclusion bodies* an. Zur vollständigen Untersuchung der Expression wurde der Zellextrakt fraktioniert. Dabei wurde in mehreren Zentrifugationsschritten nach dem Zellaufschluß erst Membranfraktion und Cytosol von Zelltrümmern und *inclusion bodies* und anschließend Cytosol von Membranfraktion sowie *inclusion bodies* von Zelltrümmern getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

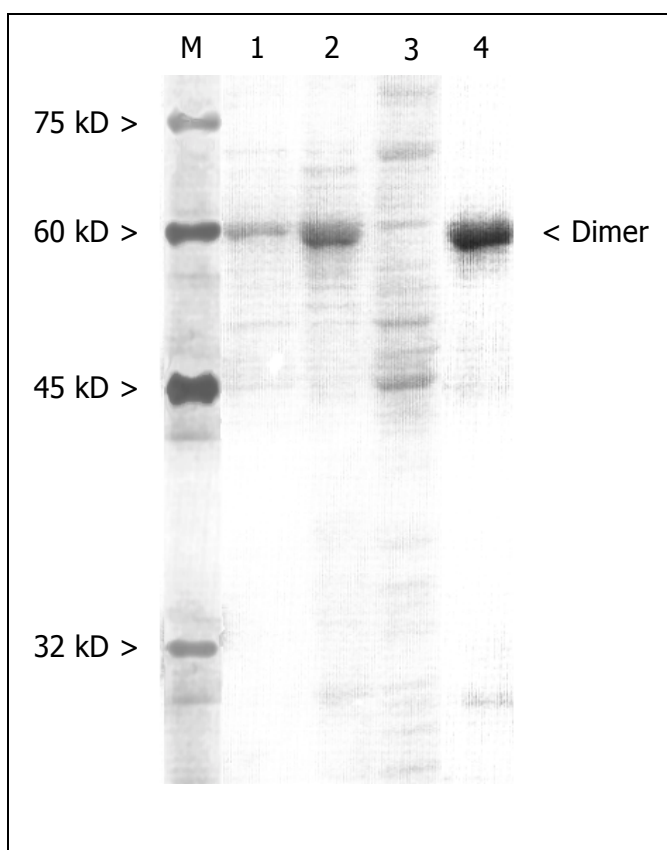


Abbildung 12:

SDS-PAGE-Analyse der Lokalisation des genetischen Dimers. 12 %-iges Gel, Coomassie-Blau-Färbung. M: Proteinmarker, apparente Molekulargewichte links; 1: Zelltrümmer; 2: Membranfraktion; 3: Cytosol; 4: *inclusion bodies* (jeweils aus 150  $\mu$ l Zellkultur)

Augenscheinlich befindet sich das Dimer nicht nur in *inclusion bodies*, sondern auch in ähnlichen Mengen in der Membranfraktion. Diese Membranfraktion verhält sich allerdings nicht so, wie Membranfraktionen aus anderen *E. coli*-Zellen. Das Pellet nach Zentrifugation (20 min, 350.000 g, 4 °C) ist wie erwartet bräunlich-orange gefärbt, allerdings ist es nicht vollständig klar, sondern leicht getrübt. Wird das Pellet resuspendiert (10 mM Tris, 1 mM EDTA) und homogenisiert, so ist diese Suspension ebenfalls trüber als erwartet. Aus dieser Suspension läßt sich durch einfache Zentrifugation (1 min, 21.000 g, 4 °C) ein weißlicher Niederschlag sedimentieren. Die Kontrolle mittels SDS-PAGE zeigt, daß sämtliches Dimer, was sich zuvor in der vermeintlichen Membranfraktion befand, sich in diesem Niederschlag wiederfindet. Der Überstand ist frei von Dimer. Aus dem bräunlich-orangen Überstand lassen sich bei stärkerer Zentrifugation (20 min, 350.000 g, 4 °C) Membranen sedimentieren, die sich in allen überprüften Belangen wie Membranfraktionen aus anderen *E. coli*-Zellen verhalten. Dies deutet darauf hin, daß die Fraktion, die normalerweise nur Membranen enthält, hier deutlich mit weiteren Bestandteilen – zumindest Dimer des Phosphatcarrier – verunreinigt ist.

Zur weiteren Charakterisierung wurde überprüft, ob sich das Dimer aus der verunreinigten Membranfraktion lösen läßt. Dazu wurde eine Suspension der verunreinigten Membranfraktion (300 mM NaCl, 30 mM  $KP_i$ ) mit unterschiedlichen Mengen nichtionischem Detergenz versetzt. Als Detergentien wurden  $C_{13}E_{10}$ ,  $C_{12}E_8$ ,

C<sub>8</sub>E<sub>n</sub>, Triton X-100 und Triton X-114 verwendet. In allen Fällen waren je nach Detergenzkonzentration und -art zwischen 15 % und maximal 28 % des Proteins in der verunreinigten Membranfraktion löslich.

### 3.2.5 Rekonstitution des genetischen Dimers

Das genetische Dimer wurde entsprechend der Vorschrift für das Monomer im neuen Meßsystem rekonstituiert und die Transportaktivität für Phosphat im Austauschmodus bestimmt. Das Dimer zeigt sowohl in der Wildtyp als auch in der cysteinfreien Form eine Aktivität von 0,6 bis 1 U/mg eingesetztem Protein. Dies entspricht 6 bis 10 % der Aktivität des Monomers. Diese verminderte Aktivität läßt sich beim Wildtyp-Dimer durch Inhibition mit Mersalylsäure oder NEM auf etwa einen Viertel (0,2 U/mg) reduzieren. Die cysteinfreie Form kann erwartungsgemäß nicht inhibiert werden.

Tabelle 2: Transportaktivitäten im Austauschmodus von Monomer, Wildtyp-Dimer und cysteinfreiem Dimer. Die Ansätze enthielten 16 mg/ml Lipid, ~ 45 mg Protein, 30 mM KPi und 50 mM HEPES. Inhibition erfolgte mit 3 mM Mersalylsäure im Transportansatz.

Protein	Transportaktivität (U/mg eingesetztem Protein)	Transportaktivität (inhibiert) (U/mg eingesetztem Protein)
Monomer	10 ± 2	0,3 ± 0,1
Wildtyp-Dimer	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,05
Cysteinfreies Dimer	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2

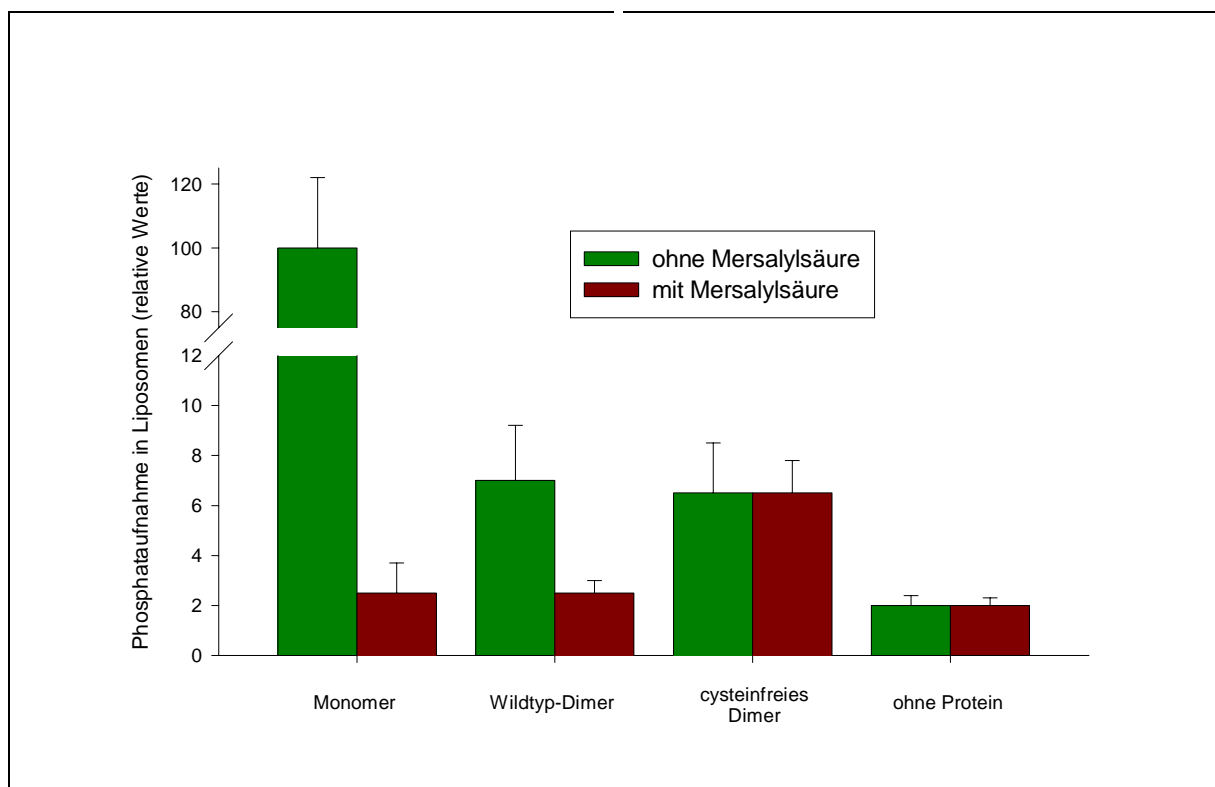


Abbildung 13: Übersicht über die Transportaktivität (angegeben in prozentualer Phosphataufnahme im Vergleich zum Monomer) im Austauschmodus von Monomer, Dimer in beiden Formen und proteinfreien Liposomen. Die Meßansätze enthielten 16 mg/ml *E. coli total lipid extract*, ~ 45 bzw. 0 mg Protein, 30 mM  $KP_i$  (pH 6,8) und 50 mM HEPES (pH 6,8). Inhibition erfolgt mit 3 mM Mersalylsäure.

In seiner monomeren Form konnte der Phosphatcarrier mit Einbauraten zwischen 15 und 20 % rekonstituiert werden. Das Dimer ließ sich mit Einbauraten von größer 80 % rekonstituieren.

### 3.2.6 Spaltung des genetischen Dimers mit Faktor Xa Protease

Das genetische Dimer enthält zwischen den beiden Monomeren die Erkennungssequenz für die Faktor Xa-Protease Ile-Glu-Gly-Arg. Das Dimer läßt sich sowohl in solubilisierter Form als auch in rekonstituierter Form zu etwa 40 bis 60 % schneiden. An einem Maltosebindeprotein-Fusionsprotein konnte gezeigt werden, daß Faktor Xa SLS-Konzentrationen bis 1 % toleriert.

Wird das Dimer in solubilisierter Form geschnitten, der gesamte Schneideansatz anschließend rekonstituiert und die Transportaktivität im Austauschmodus bestimmt, zeigt sich keine signifikante Veränderung der Transportaktivität im Vergleich zu ungeschnittenem Dimer. Werden Monomer, ungeschnittenes Dimer und Schneideansatz vor und nach Rekonstitution mittels SDS-PAGE untersucht, zeigt sich, daß das Dimer zwar partiell zu Monomer geschnitten wird, die Proteoliposomen nach Rekonstitution aber nur Dimer enthalten.

Ebenfalls partiell geschnitten werden kann das Dimer in rekonstituierter Form in den Proteoliposomen. Auch hier führt das Schneiden zu keiner Veränderung der Transportaktivität.

### 3.3 Homologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Die hier beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. T. Lisowsky, Universität Düsseldorf, durchgeführt.

#### 3.3.1 Herstellung einer Phosphatcarrier-Deletionsmutante

Im diploiden Hefestamm W303-2n wurde eine Kopie des *MIR1*-Gens, das für den Phosphatcarrier codiert, nach der KanMX-Methode deletiert (Wach *et al.*, 1994). Hierbei wird das zu deletierende Gen durch eine Kanamycinresistenzkassette ersetzt. Diese verleiht der Deletionsmutante eine Resistenz gegen Geneticin. Im gleichen Schritt verlieren die Hefen ihre Wachstumsfähigkeit auf Nährmedien, die als Kohlenstoffquelle ausschließlich nichtfermentierbare enthalten (z.B. Glycerin in YPG-Medium). Die diploide Hefe, die die Deletion trägt, wurde sporuliert und die vier Sporen einer Tetrade mechanisch getrennt. Die Sporen mit deletiertem *MIR1*-Gen konnten anhand ihrer Geneticin-Resistenz und Wachstumsunfähigkeit auf nichtfermentierbaren Medien identifiziert werden:



Abbildung 14: Identifizierung der *MIR1*-Deletionsmutanten einer Tetrade des W303-1n-Stamms von *S. cerevisiae*. Linke Platte: positive Selektion auf YPD-Medium und Geneticin, rechte Platte: negative Selektion auf YPG-Medium. Deletionsmutanten sind der linke und der rechte Klon (Genticinresistenz und Wachstumsunfähigkeit auf YPG-Medium). Der obere und der untere Klon enthalten die Deletion nicht.

#### 3.3.2 Komplementation der Deletion mit Phosphatcarrier

Das deletierte *MIR1*-Gen wurde mit monomerem und dimerem Phosphatcarrier komplementiert. Die Gene hierfür befand sich auf einem auf den YEp352-ADH-Pasmid basierenden Plasmid und standen unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven

ADH-Promoters. Das zur Komplementation eingesetzte Plasmid enthielt ein *URA3*-Gen, so daß die komplementierten Hefen im Gegensatz zum Wildtyp und der Deletionsmutante nicht mehr uracil-auxotroph waren. Die Komplementation führte jeweils zu einer vollständigen Regenerierung des Wildtyp-Phänotypen, so daß die beiden komplementierten Hefen die Fähigkeit wiedererlangten, auf Nährmedien zu wachsen, die als Kohlenstoffquelle ausschließlich nicht-fermentierbare enthielten.



Abbildung 15: Wachstum von Wildtyp, Deletionsmutante und komplementierten Deletionsmutanten. Linke Platte: positive Selektion auf YPG-Medium, rechte Platte: positive Selektion auf Minimalmedium ohne Uracil. Der Wildtyp (links) wächst nur auf YPG-Medium, die Deletionsmutante (oben) weder auf YPG- noch auf Minimalmedium ohne Uracil und die Komplementationen mit Monomer (rechts) und Dimer (unten) auf beiden Medien.

Abbildung 16). In beiden Fällen zeigte sich, daß auch in den mit dem Gen des Dimers komplementierten Zellen ausschließlich monomerer Phosphatcarrier zu finden ist.

Zur weiteren Kontrolle wurde eine Western-Blot-Analyse des Zellextraktes und der Mitochondrien durchgeführt (siehe

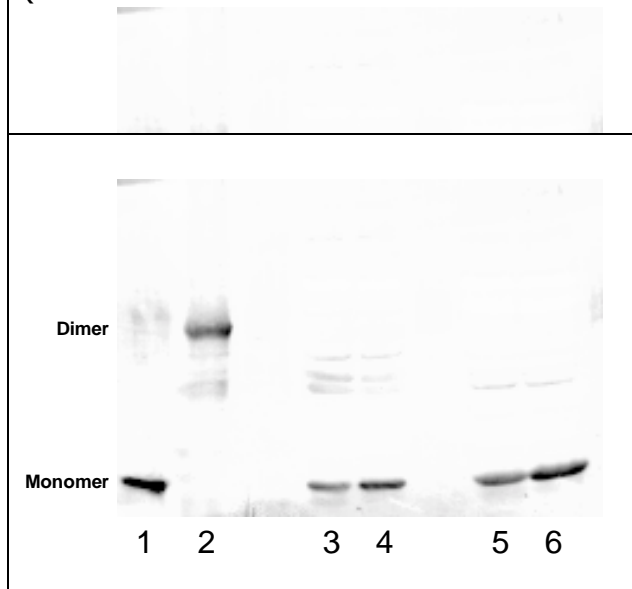


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse der Expression von Phosphatcarrier in komplementierten Hefezellen. Nachweis durch polyklonalen Antikörper gegen mitochondrialen Phosphatcarrier.

1: *inclusion bodies* des Monomers, 2: *inclusion bodies* des Dimers, 3 und 4: unterschiedliche Mengen Mitochondrien aus mit Monomer komplementierten Hefen, 5 und



6: unterschiedliche Mengen Mitochondrien aus  
mit Dimer komplementierten Hefen

Mittels Amplifizierung des Gens mit PCR konnte aber nachgewiesen werden, daß das Expressionsplasmid im Falle des genetischen Dimers auch stabil das Gen für das Dimer enthielt (siehe

Abbildung 17).

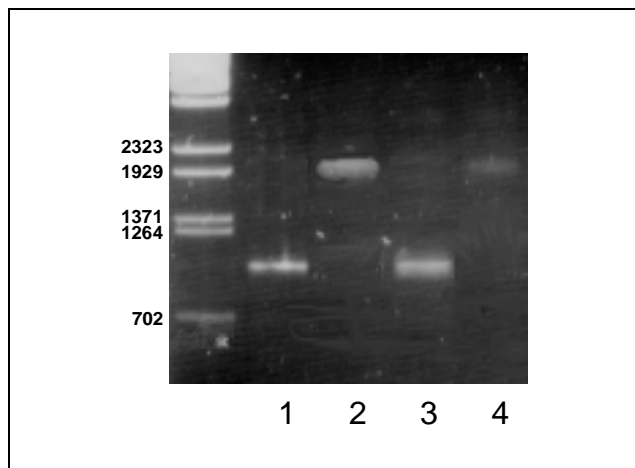


Abbildung 17: PCR-Amplifikation zur Kontrolle des plasmidkodierten Gens für den Phosphatcarrier in den komplementierten Hefen

1: Kontrolle, *NdeI-BamHI*-Fragment aus pUC-PIC, 2: Kontrolle, *NdeI-BamHI*-Fragment aus pUC-PIC-Dimer, 3: PCR-Amplifikation in mit Monomer komplementierten Hefen, 4: PCR-Amplifikation in mit Dimer komplementierten Hefen

## 4 Diskussion

### 4.1 Transportmessungen mit heterolog exprimiertem Phosphat-carrier

Geringe, schlecht reproduzierbare Transportaktivitäten des heterolog in *E. coli* exprimierten mitochondrialen Phosphatcarriers aus *S. cerevisiae* im Rekonstitutions- und Meßsystem, das zuvor zur Untersuchung des Phosphatcarriers aus Rinderherzen verwendet wurde, machten eine Überarbeitung des Rekonstitutions- und Meßsystems notwendig.

#### 4.1.1 Einführung eines neuen Meßsystems

Primäres Ziel der Einführung des neuen Meßsystems war die Schaffung eines Systems, daß bei hohem Durchsatz eine geringe Fehleranfälligkeit und hohe Reproduzierbarkeit aufweist. Darüber hinaus war eine vereinfachte Handhabung und ein geringeres Gefährdungspotential im Umgang mit dem radioaktiven Phosphat erwünscht.

Die Umstellung auf das Mikrotiterplattenformat von 96 Proben (zuvor 60 Proben) gestattet nun bei sechs Meßzeitpunkten sowie Doppelbestimmungen und zwei Kontrollmessungen sechs statt zuvor drei Meßreihen pro Ansatz. Diese Erhöhung war Voraussetzung für die umfangreiche Optimierung der Rekonstitutionsmethode. Die Verwendung von präzisen Mehrkanalpipetten in Kombination mit den Mikrotiterplatten führten zu der gewünschten geringen Fehleranfälligkeit und hohen Reproduzierbarkeit. Im alten Meßsystem wichen bis zu einem Viertel der Meßpunkte deutlich ab, im neuen sind es in der Regel nur zwei bis drei Prozent. Während die beiden Messungen einer Doppelbestimmung im alten System mitunter nur geringe Ähnlichkeit miteinander aufwiesen, sind sie im neuen Meßsystem im Rahmen der Erwartung ( $\pm 5\%$ ) deckungsgleich. Diese Tatsachen machen die mit dem neuen Meßsystem bestimmten experimentellen Daten wesentlich glaubhafter. Unter dem Gesichtspunkt, daß an die Meßreihen eine exponentielle Funktion mit drei variablen Koeffizienten angepaßt wird und somit für eine relevante Aussagekraft auf jeden Fall sechs Meßpunkte zu Verfügung stehen sollten, wird die Bedeutung der geringeren Fehleranfälligkeit deutlich.

Ein willkommener Nebeneffekt der Umstellung des Meßsystems ist ganz im Sinne der Strahlenschutzverordnung. Durch die vereinfachte Handhabung mit den Mehrkanalpipetten und die neue Anordnung der Anionenaustauschsäulen ist die Aufenthaltszeit bei erhöhter Probenzahl im Radioaktivlabor fast halbiert worden. Die direkte Exposition mit radioaktiver Strahlung, wie dies bei der Gabelmethode der Fall war, wird ebenfalls reduziert.

#### 4.1.2 Optimierung der Rekonstitutionsmethode und Charakterisierung des Phosphattransports

Der heterolog exprimierte Phosphatcarrier zeigt weder mit dem Rekonstitutionssystem, daß zuvor für den homolog exprimierten Carrier aus Hefe und Rinderherzen verwendet wurde, noch mit der Lipidmischung nach Wohlrab signifikante Transportaktivität im erwarteten Bereich von 50 bis 120 U/mg Protein.

Die Tatsache, daß sich die geringe Restaktivität nicht mit Mersalylsäure inhibieren läßt und die Phosphataufnahme in den Proteoliposomen sich nur unwesentlich von der Aufnahme in proteinfreien Liposomen unterscheidet, deutet daraufhin, daß die beobachtete Restaktivität unspezifisch und nicht carriervermittelt ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß – mit Ausnahme der Verwendung anderer Lipide – keiner der durchgeführten Optimierungsschritte zu irgendeiner Erhöhung der Restaktivität führte.

Um verwertbare Ergebnisse zu erzielen, muß die Rekonstitutionsmethode derart modifiziert werden, daß die beobachtete Transportaktivität um den Faktor 100 bis 1.000 auf über 10 U/mg Protein erhöht wird. Sowohl die Verwendung von selbst extrahierten Lipiden aus Truthahneigelb in Kombination mit Cardiolipin als auch der Einsatz von gekauftem *E. coli total lipid extract* ergaben Aktivitäten in der Größenordnung von 10 U/mg Protein. Die Notwendigkeit der Komplementierung der Lipide aus Truthahneigelb mit Cardiolipin – *E. coli*-Lipide enthalten von sich aus schon Cardiolipin – unterstreicht die Wichtigkeit von Cardiolipin für die Transportaktivität von mitochondrialen Carriern, die auch schon in anderen Fällen beobachtet wurde (Übersicht in Krämer und Palmieri, 1989). Da in beiden Lipidsorten gleiche Aktivität erreicht wird, kann angenommen werden, daß die Diskrepanz eines Faktors von acht bis zwölf zu publizierten Aktivitäten von homolog exprimiertem Carrier auf systematische Unterschiede der Experimente (Einbaurrate des Proteins, Auswertmethode) zurückzuführen ist. Da *E. coli total lipid extract* käuflich zu erwerben ist, bietet es sich an, diese Lipide denen aus Truthahneigelb vorzuziehen.

Die Charakterisierung des Phosphatcarriers unter Verwendung der neuen Lipide und dem neuen Meßsystem zeigte, daß der heterolog exprimierte Phosphatcarrier sich in Bezug auf seine kinetischen Daten ( $K_M$ -Wert, Transportaktivität) und sein Inhibitionsverhalten so verhält, wie dies zuvor aus Hefe oder Rinderherzen isolierter Phosphatcarrier im alten Rekonstitutions- und Meßsystem getan hat. Es wurde aber ebenfalls deutlich, daß Daten, die mit dem heterolog exprimierten Phosphatcarrier in diesem alten System erzielt wurden, nur zum Teil im neuen System reproduziert werden können und kritisch betrachtet werden müssen.

Mit dem neuen Meßsystem steht eine experimentelle Anordnung zu Verfügung, die einen hohen Durchsatz an fehlerarmen und reproduzierbaren Transportmessungen mit dem mitochondrialen Phosphatcarrier unter vereinfachten Arbeitsbedingungen gestattet. In *E. coli total lipid extract* kann der heterolog exprimierte Carrier mit guter Aktivität rekonstituiert werden. Die neuen Systeme bieten eine gute Grundlage für eine weitergehende Charakterisierung des Phosphatcarriers, seiner Struktur und Funktion und der Korrelation der beiden.

## 4.2 Konstruktion und Untersuchung eines genetischen Dimers

### 4.2.1 Das genetische Dimer als Untersuchungsobjekt

Über den genauen Aufbau und die mikroskopische Funktionsweise von sekundären Transportern ist bisher relativ wenig bekannt, weil es bis heute nicht gelungen ist, die dreidimensionale Struktur eines sekundären Transportproteins aufzuklären. Die mit Hilfe einer Vielzahl experimenteller Methoden an der Lactose Permease aus *E. coli* weit fortgeschrittene indirekte Strukturaufklärung und die daraus abgeleiteten Modelle (Kaback, 1997) erreichen nicht die durch Röntgenstrukturanalyse oder Kernspinresonanzuntersuchungen mögliche Auflösungen. Die Untersuchungen an der Lactose Permease hatten jedoch nicht nur einen strukturellen Hintergrund. Es waren ebenso mechanistische Aspekte, die durch die gewählten experimentellen Ansätze aufgeklärt werden sollten und konnten. Primär strukturelle Ziele dagegen hatten Elektronenmikroskopieuntersuchungen von Transportern, die insbesondere bei NhaA, einem Natrium-Protonen-Antiporter aus *E. coli* (Williams *et al.*, 1999) erfolgreich waren. Inwiefern diese Resultate auf die in dieser Arbeit untersuchten mitochondrialen Carrier übertragbar sind, ist unklar.

Ein Problem bei Untersuchungen am Phosphatcarrier ist die Tatsache, daß jede Modifikation des Proteins – sei es biologisch schon auf der Ebene des Gens oder durch eine chemische Reaktion des Proteins – automatisch durch die dimere Struktur doppelt auftritt. Die Möglichkeit, gezielt Dimere herzustellen, in denen dies nicht der Fall ist, ist ein interessantes Instrument, um Struktur und Funktion des Phosphatcarriers weiter zu charakterisieren. Der Ansatz, das Dimer schon auf genetischer Ebene zu generieren, verspricht, ein in der Praxis gut handhabbares System.

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit ist es zwei Forschergruppen gelungen, den Ansatz eines genetischen Dimers des mit dem Phosphatcarrier verwandten Nukleotidcarrier im Experiment umzusetzen (siehe 4.2.3).

## 4.2.2 Das genetische Dimer des Phosphatcarriers

Die Konstruktion und anschließende Expression des genetischen Dimers lieferte ein stabiles Protein mit der doppelten Masse des Monomers. Es fiel – analog dem Monomer – ausschließlich in *inclusion bodies* an. Der Anteil des Dimers, der bei der durchgeführten Fraktionierung in der Membranfraktion zu finden war, war nicht in die Membran integriert; er ließ sich durch weitere Zentrifugationsschritte von den Membranen trennen. Inwiefern dieser Anteil anders aggregiert war als das Dimer, daß in *inclusion bodies* anfiel, kann nicht beurteilt werden, würde aber das unterschiedliche Segregationsverhalten erklären. Das Dimer läßt sich nahezu vollständig mit Lauroylsarcosinat aus den *inclusion bodies* lösen. Anschließende Rekonstitution und Bestimmung von Einbau- und Transportraten ergaben zwei interessante Ergebnisse: das Dimer zeigt nur sechs bis acht Prozent der Transportaktivität des Monomers, und die Einbaurrate, die beim Monomer bei 15 bis 20 Prozent liegt, erreicht beim Dimer zwischen 80 und 100 Prozent.

Ein fast vollständiger Einbau des Dimers in richtiger Konformation läßt sich nicht erklären. Es wäre überraschend, wenn das Dimer – trotz der doppelten Größe – sich wesentlich besser falten würde, als das Monomer. Daher ist anzunehmen, daß ein Großteil des eingebauten Dimers nicht in der richtigen Konformation und vollständig in die Proteoliposomen integriert ist. Somit ist ebenfalls schwer abzuschätzen, welcher Anteil des Dimers überhaupt richtig eingebaut ist. Die Tatsache, daß Dimer richtig rekonstituiert wurde, wurde durch die – wenn auch geringere – Transportaktivität und deren spezifische Inhibierbarkeit gezeigt. Es gibt keine Methode, quantitativ abzuschätzen, welcher Anteil des Proteins in den Liposomen in richtiger Konformation vorliegt. Insofern wäre eine deutlich geringere tatsächliche Einbaurrate von korrekt gefaltetem Protein (im Bereich um zwei Prozent) eine Erklärung für die reduzierte Transportaktivität des rekonstituierten Dimers. Nicht einordnen läßt sich damit aber die Beobachtung, daß die cysteinfreie Form und der Wildtyp des Dimers die gleiche Transportaktivität aufweisen, während bei den Monomeren die cysteinfreie Mutante nur einen Zehntel der Aktivität des Wildtyps aufweist.

Eine weitere Erklärung für die geringe Transportaktivität des Dimers wäre die Annahme, daß durch die Verbindung der beiden Monomere zwar nicht der Einbau, dafür aber die Transportfähigkeit des Proteins eingeschränkt ist. Dem widersprechen die Ergebnisse der Protease-Schnittversuche mit Faktor Xa. Hier hatte sich gezeigt, daß das Schneiden des rekonstituierten Dimers zu zwei Monomeren nicht zu einer Erhöhung der Transportaktivität führt. Die Verbindung zwischen den beiden Monomeren besteht laut Vorhersage der Lage der Helices 1 und 6 aus Hydrophathieplots aus insgesamt etwa 40 bis 60 Aminosäuren (je nach Interpretation der Hydrophathieplots). Dies sollte auf jeden Fall ausreichen, um die Beweglichkeit

des Proteins nicht wesentlich einzuschränken. In diesem Zusammenhang nicht zu deuten ist die Beobachtung, daß sich in solubiliertem Zustand vor der Rekonstitution das Dimer zwar partiell zu Monomer schneiden läßt, bei der Rekonstitution des geschnittenen Ansatzes aber ausschließlich Dimer in die Proteoliposomen inkorporiert wird.

Das genetische Dimer des mitochondrialen Phosphatcarriers kann erfolgreich in *E. coli* heterolog exprimiert und aus *inclusion bodies* solubiliert werden. Das solubilierte Dimer läßt sich rekonstituieren und zeigt eine inhibierbare Transportaktivität von  $0,8 \pm 0,2$  U/mg eingesetztem Protein. Eine schlüssige Erklärung für die gegenüber dem Monomer auf acht Prozent reduzierte Aktivität in Einklang mit den durchgeführten Untersuchungen kann nicht gefunden werden. Das genetische Dimer ist somit als experimentelles Instrument zur weiteren Untersuchung des Phosphatcarriers nur sehr eingeschränkt geeignet.

### 4.2.3 Vergleich mit dem Dimer des Nukleotidcarriers

Die Konstruktion und Expression eines genetischen Dimers des Nukleotidcarriers gelang in der Zwischenzeit zwei Forschergruppen (Hatanaka *et al.*, 1999 und Trézéguet *et al.*, 2000). Beide Gruppen verwenden ebenfalls zwei unmittelbar hintereinander klonierte Gene des Carriers zur Expression.

Tabelle 3: Vergleich des genetischen Dimers des Phosphatcarriers mit den beiden genetischen Dimeren des Nukleotidcarriers

Quelle	diese Arbeit	Hatanaka <i>et al.</i> , 1999	Trézéguet <i>et al.</i> , 2000
Protein	Phosphatcarrier	Nukleotidcarrier	Nukleotidcarrier
Gen	<i>MIR1</i>	<i>AAC2</i>	<i>AAC2</i>
<i>linker</i>	4 Aminosäuren, die eine Faktor Xa-Schnittstelle bilden	Austausch des ersten Start-Methionins des zweiten Monomers gegen Alanin	zwei zusätzliche Aminosäuren: Glycin und Serin
heterologe Expression	in <i>E. coli</i>	-	-
homologe Expression	plasmidcodiert	plasmidcodiert	genomisch codiert
Regenerierung der Wachstumsfähigkeit auf nicht-fermentierbaren Nährmedien	ja	ja	ja
Masse des Genprodukts	32 kD	62 kD	62 kD
Transportmessungen	heterolog exprimiertes Protein in Liposomen	in isolierten Mitochondrien	-
Inhibierbarkeit	ja, in Liposomen mit Mersalylsäure	ja, mit Carboxyatractylosid	Bindung von Carboxyatractylosid nachgewiesen

In allen drei Fällen werden zwei Exemplare des monomeren Gens ohne zusätzlichen *linker* hintereinander kloniert. Im Gegensatz zu den Experimenten in dieser Arbeit wurde der Nukleotidcarrier jeweils ausschließlich homolog in *S. cerevisiae* exprimiert und in ganzen Zellen oder isolierten Mitochondrien untersucht. Beiden Gruppen gelang durch die Komplementierung die Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Um das Dimer des Phosphatcarriers darüber hinaus mit dem des Nukleotidcarriers vergleichen zu können, wurde es homolog in *S. cerevisiae* exprimiert.

### 4.3 Homologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Ein interessanter Teilaspekt eines genetischen Dimers des mitochondrialen Phosphatcarriers ist eine homologe Expression in *S. cerevisiae*. Im Falle der genetischen Dimere des Nukleotidcarriers führte die Expression in einer *S. cerevisiae*-Mutante, in der zwei bzw. alle drei für Nukleotidcarrier kodierenden *anc*-Gene deletiert waren, zu einer Wiedererlangung der durch die Deletion verlorenen Fähigkeit, auf nicht-fermentierbaren Nährmedien zu wachsen (Hatanaka *et al.*, 1999 und Trézéguet *et al.*, 2000).

Einen vergleichbaren Phänotyp zeigt *S. cerevisiae*, wenn das für den Phosphatcarrier kodierende Gen *MIR1* deletiert wird (Murakami *et al.*, 1990): solche Zellen sind nicht in der Lage, auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle zu wachsen, die Defizienz kann aber durch Komplementierung mit plasmidcodiertem Phosphatcarrier aufgehoben werden. Diese veröffentlichten Beobachtungen konnten hier bestätigt werden. Die Komplementation des deletierten *MIR1*-Gens mit einem plasmidkodierten genetischen Dimers gelang nicht. Das genetische Dimer konnte zwar plasmidcodiert in eine Deletionsmutante transformiert werden und war dort auch stabil, auf Proteinebene konnte aber nur Monomer immunologisch nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde auch beim Nukleotidcarrier gefunden (Klingenberg, 1999). Ob der Verlust der zweiten Hälfte des Dimers bei der Transkription, bei der Translation oder posttranslational stattfindet, kann nicht beurteilt werden. Hatanaka *et al.* führen die Stabilität ihres Proteins auf einen Austausch des intrinsischen Methionins zu Beginn des zweiten Monomers gegen ein Alanin zurück (Hatanaka *et al.*, 1999). Die vorhandene Faktor Xa-Schnittstelle kann nicht für die Instabilität des Proteins verantwortlich sein, da in anderen Arbeiten in *S. cerevisiae* Proteine Faktor Xa-Schnittstelle nicht instabil waren (Wilkinson *et al.*, 1996 und Bandell *et al.*, 1996).



## 5 Zusammenfassung

Der mitochondriale Phosphatcarrier ist für die Phosphataufnahme in Mitochondrien verantwortlich und somit essentiell für die dortige ATP-Synthese. Er wird aufgrund seiner funktioneller und struktureller Eigenschaften der mitochondrialen Carrierfamilie zugeordnet, die in Hefe 35 Vertreter besitzt. Das Protein besteht aus etwa 300 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von ca. 32 kD und bildet sechs transmembrane Helices in der inneren mitochondrialen Membran. Das Enzym katalysiert zwei verschiedene physiologische Transportreaktion: die Aufnahme von Phosphat im Antiport mit Hydroxylionen und den homologen Austausch von Phosphat. Es wird angenommen, daß der Phosphatcarrier in homodimerer Form aktiv ist.

Zur genauen Charakterisierung von Transportproteinen ist die funktionelle Rekonstitution in Liposomen ein wichtiger Ansatz. In dieser Arbeit wurde für den Phosphatcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae*, der in größeren Mengen in *Escherichia coli* exprimiert wurde, das bis dahin verwendete Rekonstitutions- und Meßsystem überprüft und modifiziert. Hier führte zum einen die Umstellung der Apparatur für die Transportmessungen auf ein Säulensystem im Mikrotiterplattenformat in Kombination mit der Verwendung von Mikrotiterplatten und Mehrkanalpipetten zu einem Meßsystem mit höherem Durchsatz, geringerer Fehleranfälligkeit und besserer Reproduzierbarkeit. Zum anderen konnte durch Verwendung von Gesamtlipidextrakt aus *E. coli* oder selbst isolierten Lipiden aus Truthahneigeln komplementiert mit Cardiolipin die Transportaktivität des Phosphatcarriers um zwei bis drei Größenordnungen im Vergleich zum alten Meß- und Rekonstitutionssystem erhöht werden.

Die gezielte Erzeugung von Dimeren des Phosphatcarriers ist Voraussetzung für die Untersuchung von *single-site-mutants* und ein wertvolles Instrument zur Charakterisierung der Kopplung der Iontentransporte auf molekularer Ebene. Hierzu wurde ein Dimer des Carriers durch kovalente Fusion der beiden Monomeren auf genetischer Ebene konstruiert. Mit dem verwendeten Kassettensystem lassen sich leicht gezielte Mutationen in beide Hälften unabhängig einführen, ein C-terminaler HIS6-tag und eine Schnittstelle der Faktor Xa-Protease gestatten weitere Untersuchungen. Homologe Expression in *S. cerevisiae* zeigte, daß der durch Deletion des für den Phosphatcarrier kodierenden *MIR1*-Gens erzeugte atmungsdefiziente Phänotyp durch Expression sowohl von Monomer als auch genetischem Dimer komplementiert wurde. Im Gegensatz zu einem genetischen Dimer des mitochondrialen Nukleotidcarriers, das von zwei anderen Forschergruppen während dieser Arbeit stabil und funktionell exprimiert wurde, wurde das Dimer des

Phosphatcarriers nicht als solches synthetisiert. Eine Western-Blot-Analyse von isolierten Mitochondrien ergab, daß das Dimer ausschließlich in monomerer und nicht in dimerer Form in die Mitochondrienmembran inkorporiert wurde.

Im Gegensatz dazu ließ sich das genetische Dimer in *E. coli* erfolgreich heterolog exprimieren. Es hat ein apparentes Molekulargewicht von 60 kD und zeigt ein dem Monomer vergleichbares Expressionsverhalten. Die Rekonstitution von solubilisiertem Dimer lieferte Proteoliposomen, die in der Lage waren, Phosphat aufzunehmen. Dieser Transport konnte spezifisch mit Mersalylsäure inhibiert werden. Die Transportaktivität lag bei etwa zehn Prozent der Aktivität von rekonstituiertem monomeren Phosphatcarrier. Die Ursachen für dieses Verhalten werden diskutiert.

## 6 Literatur

**Aquila H., Misra D., Eulitz M. und Klingenberg M. (1982)**

Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from bovine heart mitochondria.  
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie 363: 345-349

**Aquila H., Link T.A. und Klingenberg M. (1987)**

Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family.  
FEBS Letters 212: 1-9

**Bandell M., Hall M.J., Wang G., Seto-Young D. und Perlin D.S. (1996)**

Probing the cytoplasmic LOOP1 domain of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by targeted factor Xa proteolysis.  
Biochimica et Biophysica Acta 1280: 81-90

**Bell G.I., Burant C.F., Takeda J. und Gould G.W. (1993)**

Structure and Function of Mammalian Facilitative Sugar Transporters.  
Journal of Biological Chemistry 268: 19161-19164

**Benz R. (1985)**

Porin from bacteria and mitochondrial outer membranes.  
CRC Critical Reviews in Biochememistry 19: 145-190

**Bradford M.M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Analytical Biochemistry 72: 248-254

**Bolli R., Nalecz K.A. und Azzi A. (1989)**

Monocarboxylate and alpha-ketoglutarate carriers from bovine heart mitochondria. Purification by affinity chromatography on immobilized 2-cyano-4-hydroxycinnamate.  
Journal of Biological Chemistry 264:18024-18030

**Capobianco L., Brandolin G. und Palmieri F. (1991)**

Transmembrane topography of the mitochondrial phosphate carrier explored by peptide-specific antibodies and enzymatic digestion.  
Biochemistry 30: 4963-4969

Dawson A., Klingenberg M. und Krämer R. (1987)

Transport across membranes.

in „Mitochondria: A practical approach“ (Darley-Ussmar V.M. *et al.*, eds.) 35-79, IRL Press, Oxford

Dierks T., Salentin A., Heberger C. und Krämer R. (1990)

The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents.

Biochimica et Biophysica Acta 1028: 268-280

Dolce V., Fiermonte G. und Palmieri F. (1996)

Tissue-Specific Expression Of the Two Isoforms Of the Mitochondrial Phosphate Carrier In Bovine Tissues.

FEBS Letters 399: 95-98

Fiermonte G., Walker J.E. und Palmieri F. (1993)

Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria.

Biochemical Journal 294: 293-299

Grant S.N.G., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D. (1990)

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

Proceedings of the National Academy of Science USA 87: 4645-4649

Guerin B., Bukusoglu C., Rakotomanana F. und Wohlrab H. (1990)

Mitochondrial phosphate transport - N-ethylmaleimide insensitivity correlates with absence of beef heart-like Cys-42 from the *Saccharomyces-cerevisiae* phosphate transport protein.

Journal of Biological Chemistry 265: 19736-19741

Hackenberg H. und Klingenberg M. (1980)

Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate, adenosine-5'triphosphate carrier in Triton X-100.

Biochemistry 19: 548-555

Hatanaka T., Hashimoto M., Majima E., Shinohara Y. und Terada H. (1999)

Functional expression of the tandem-repeated homodimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochemical & Biophysical Research Communications 262: 726-730

Hénaut A. und Danchin A. (1996)

Analysis and Predictions from *Escherichia coli* Sequences, or *E. coli* in Silico.  
in „*Escherichia coli* and *Salmonella*“ (Neidhardt F.C. *et al.*, eds.) 2047-2066, ASM Press,  
Washington D.C.

Henderson P.J. (1990)

The homologous glucose transport proteins of prokaryotes and eukaryotes.  
Research in Microbiology 141: 316-328

Hebert D.N. und Carruthers A. (1991)

Cholate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and  
homotetramers.  
Biochemistry 30: 4654-4658

Indiveri C., Tonazzi A., Dierks T., Krämer R. und Palmieri F. (1992a)

The mitochondrial carnitine carrier: characterization of SH-groups relevant for its  
transport function.  
Biochimica et Biophysica Acta 1140: 53-58

Indiveri C., Tonazzi A. und Palmieri F. (1992b)

Identification and purification of the ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria.  
European Journal of Biochemistry 207: 449-454

Indiveri C., Iacobazzi V., Giangregorio N. und Palmieri F. (1997a)

The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and  
comparison with other mitochondrial transport proteins.  
Biochemical Journal 321: 713-719

Indiveri C., Tonazzi A., Stipani I. und Palmieri F. (1997b)

The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria:  
electrical nature and coupling of the exchange reaction with H<sup>+</sup> translocation.  
Biochemical Journal 327: 349-355

Indiveri C., Abruzzo G., Stipani I. und Palmieri F. (1998)

Identification and purification of the reconstitutively active glutamine carrier from rat  
kidney mitochondria.  
Biochemical Journal 333: 285-290

Jezek P., Orosz D.E., Modriansky M. und Garlid K.D. (1994)

Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its  
regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses.  
Journal of Biological Chemistry 269: 26184-26190

Kaback H.R. (1997).

A Molecular Mechanism For Energy Coupling In a Membrane Transport Protein, the Lactose Permease Of *Escherichia Coli*.

Proceedings of the National Acadademy of Science USA 94: 5539-5543

Kaplan R.S. und Pedersen P.L. (1985)

Isolation and reconstitution of the *n*-butylmalonate-sensitive dicarboxylate transporter from rat liver mitochondria.

Journal of Biological Chemistry 260: 10293-10298

Kaplan R.S., Mayor J.A. und Wood D.O. (1993)

The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins.

Journal of Biological Chemistry 268: 13682-13690

Klingenberg M. (1981)

Membrane protein oligomeric structure and transport function.

Nature 290: 449-454

Klingenberg M. (1989)

Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier.

Archives of Biochemistry and Biophysics 270: 1-14

Klingenberg M. (1990)

Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue.

Trends in Biochemical Science 15: 108-112

Klingenberg M. und Appel M. (1989)

The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile C-terminal SH groups.

European Journal of Biochemistry 180: 123-131

Krämer R. und Palmieri F. (1989)

Molecular aspects of isolated and reconstituted carriers from animal mitochondria.

Biochimica et Biophysica Acta 974: 1-23

Krämer R. und Palmieri F. (1992)

Metabolite carriers in mitochondria.

in „Molecular Mechanisms in Bioenergetics“ (Ernster L., ed.) 359-384, Elsevier, Amsterdam

Krämer R. und Heberger C. (1986)

Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column.

Biochimica et Biophysica Acta. 863: 289-296

Krämer R. und Palmieri F. (1989)

Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria.

Biochimica et Biophysica Acta 974: 1-23

Kuan J. und Saier M.H. (1993)

The Mitochondrial Carrier Family of Transport Proteins - Structural, Functional, and Evolutionary Relationships.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 28: 209-233

Kyhse-Andersen J. (1984)

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

Journal of Biochemical and Biophysical Methods 10: 203-209

Lämmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227: 680-685

LaNoue K.F. und Schoolwerth A.C. (1979)

Metabolite Transport in Mitochondria.

Annual Reviews in Biochemistry 48: 871-922

LaNoue K.F. und Schoolwerth A.C. (1984)

Metabolite transport in mammalian mitochondria.

in „Bioenergetics“ (Ernster L., ed.) 221-268, Elsevier, Amsterdam

Lawson J.E. und Douglas M.G. (1988)

Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Biological Chemistry 263: 14812-14818

Lin C.S., Hackenberg H. und Klingenberg M. (1980)

The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study.

FEBS Letters 113: 304-306

Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

Journal of Biological Chemistry 193: 265-275

MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P., Takeshita K., Subbarao N.K. und Hu L.R. (1991)

Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles.

Biochimica et Biophysica Acta 1061: 297-303

Majima E., Ikawa K., Takeda M., Hashimoto M., Shinohara Y. und Terada H. (1995)

Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP-ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline.

Journal of Biological Chemistry 270: 29548-29554

Maloney P.C. (1990)

A consensus structure for membrane transport.

Research in Microbiology 141: 374-383

Mannella C.A. (1996)

Mitochondrial channels revisited.

Journal of Bioenergetics & Biomembranes 28: 89-91

Mannella C.A., Forte M. und Colombini M. (1992)

Toward the Molecular Structure of the Mitochondrial Channel, VDAC.

Journal of Bioenergetics & Biomembranes 24: 7-19

Marger M.D. und Saier M.H. (1993)

A Major Superfamily of Transmembrane Facilitators That Catalyse Uniport, Symport and Antiport.

Trends in Biochemical Science 18: 13-20

Mitchell P. (1966)

Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.

Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 41: 445-502

Mitchell P. (1976)

Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity.

Biochemical Society Transactions 4: 399-430



Murakami H., Blobel G. und Pain D. (1990)

Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor.  
Nature 347: 488-491

Murakami H., Blobel G. und Pain D. (1993)

Signal sequence region of the mitochondrial precursor proteins binds to mitochondrial import receptor.  
Proceedings of the National Acadademy of Science USA 90: 3358-3362

Palmieri F., Indiveri C., Bisaccia F. und Krämer R. (1993)

Functional Properties of Purified and Reconstituted Mitochondrial Metabolite Carriers.  
Journal of Bioenergetics & Biomembranes 25: 525-535

Palmieri L., Lasorsa F.M., De Palma A., Palmieri F., Runswick M.J. und Walker J.E. (2000)

Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate.  
FEBS Letters 417: 114-118

Palmieri L., Vozza A., Agrimi G., De Marco V., Runswick M.J., Palmieri F. und Walker J.E. (1999)

Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate.  
Journal of Biological Chemistry 274: 22184-22190

Palmieri L., Agrimi G., Runswick M.J., Fearnley I.M., Palmieri F. und Walker J.E. (2000)

Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate.  
Journal of Biological Chemistry *in press*

Paulsen I.T., Sliwinski M.K., Nelissen B., Goffeau A. und Saier M.H. Jr. (1998)

Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*.  
FEBS Letters 430: 116-125

Phelps A., Schobert C.T. und Wohlrab H. (1991)

Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
Biochemistry 30: 248-252

Riccio P., Aquila H. und Klingenberg M. (1975)

Purification of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria.  
FEBS Letters 56: 133-138

Rigaud J.L., Pitard B. und Levy D. (1995)

Reconstitution of membrane proteins into liposomes: Application to energy-transducing membrane proteins.

Biochimica et Biophysica Acta 1231: 223-246

Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D-S., Lin S-W., Dunn J.J. und Studier F.W. (1987)

Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase.

Gene 56: 125-135

Runswick M.J., Powell S.J., Nyren P. und Walker J.E. (1987)

Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein.

EMBO Journal 6: 1367-1373

Runswick M.J., Walker J.E., Bisaccia F., Iacobazzi V. und Palmieri F. (1990)

Sequence of the bovine 2-oxoglutarate/malate carrier protein: structural relationship to other mitochondrial transport proteins.

Biochemistry 29: 11033-11040

Sahin-Toth M., Lawrence M.C. und Kaback H.R. (1994)

Properties of permease dimer, a fusion protein containing two lactose permease molecules from *Escherichia coli*.

Proceedings of the National Academy of Science USA 91: 5421-5425

Sambrook, J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989)

Molecular cloning, a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory

Saraste M. und Walker J.E. (1982)

Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase.

FEBS Letters 144: 250-254

Schroers A. (1998)

Funktionelle und strukturelle Eigenschaften des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Promotion Universität Düsseldorf, Bericht des FZ Jülich

Sorgato M.C. und Moran O. (1993)

Channels in Mitochondrial Membranes - Knowns, Unknowns, and Prospects for the Future.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 28: 127-171

Stappen R. und Krämer R. (1993)

Functional Properties of the Reconstituted Phosphate Carrier from Bovine Heart Mitochondria - Evidence for Asymmetric Orientation and Characterization of 3 Different Transport Modes.

Biochimica et Biophysica Acta 1149: 40-48

Stappen R. (1994)

Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Anionencarrier der inneren Mitochondrienmembran: Untersuchungen am Aspartat/Glutamat-Carrier und Phosphatcarrier im rekonstituierten System.

Promotion Universität Düsseldorf, Bericht des FZ Jülich 2930

Stappen R. und Krämer R. (1994)

Kinetic Mechanism of Phosphate Phosphate and Phosphate/OH<sup>-</sup> Antiports Catalyzed by Reconstituted Phosphate Carrier from Beef Heart Mitochondria.

Journal of Biological Chemistry 269: 11240-11246

Studier F.W. und Moffat B.A. (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

Journal of Molecular Biology 189: 113-130

Tahiliani AG., Keene T. und Kaplan RS. (1992)

Characterization of the inhibitor sensitivity of the coenzyme A transport system in isolated rat heart mitochondria.

Journal of Bioenergetics & Biomembranes. 24: 635-640

Trezeguet V., Le Saux A., David C., Gourdet C., Fiore C., Dianoux A., Brandolin G. und Lauquin G.J. (2000)

A covalent tandem dimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier is functional in vivo.

Biochimica et Biophysica Acta 1457: 81-93

Voos W., Martin H., Krimmer T. und Pfanner N. (1999)

Mechanisms of protein translocation into mitochondria.

Biochimica et Biophysica Acta 1422: 235-254

Wach A., Brachat A., Pohlmann R. und Philippsen P. (1994)

New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast 10: 1793-1808

Walker J.E. (1992)

The mitochondrial transporter family.  
Current Opinion in Structural Biology 2: 519-526

Wilkinson B.M., Critchley A.J. und Stirling C.J. (1996)

Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex.  
Journal of Biological Chemistry 271: 25590-25597

Williams K.A., Geldmacher-Kaufer U., Padan E., Schuldiner S. und Kühlbrandt W. (1999)

Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution.  
EMBO Journal. 18: 3558-3563

Wohlrab H. und Briggs C. (1994)

Yeast mitochondrial phosphate transport protein expressed in *Escherichia coli*. Site directed mutations at threonine-43 and at a similar location in the second tandem repeat (isoleucine-141).  
Biochemistry 33: 9371-9375

Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985)

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.  
Gene 33: 103-119

Zottola R.J., Cloherty E.K., Coderre P.E., Hansen A., Hebert D.N. und Carruthers A. (1995)

Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization.  
Biochemistry 34: 9734-9747.

## Lebenslauf

3. 1. 1972 Geboren in Zürich, Schweiz
- 1978 – 1981 Grundschule Babenhausen, Bielefeld
- 1981 – 1987 Max-Planck-Gymnasium, Bielefeld
- 1987 University High School, Los Angeles, CA, USA
- 1988 Beavercreek High School, Beavercreek, OH, USA  
Abschluß mit dem amerikanischen High School Diplom
- 1988 – 1991 Max-Planck-Gymnasium, Bielefeld  
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife
- 1991 – 1997 Studium der Chemie an der Universität Dortmund  
Abschluß als Diplom Chemiker
- 1996 – 1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare  
Physiologie, Dortmund, in der Abteilung Biophysikalische  
Chemie bei Prof. R.S. Goody
- 1994 – 1997 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1997 – 2000 Promotion am Forschungszentrum Jülich in der Abteilung  
IBT 1 und an der Universität zu Köln am Institut für  
Biochemie bei Prof. R. Krämer im Rahmen des SFB 189  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 1997 – 1998 Kekulé-Stipendiat des Fonds der chemischen Industrie
- 1998 – 1999 Promotionsstipendiat der Studienstiftung des deutschen  
Volkes

## Danksagung

... an Reinhard Krämer für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das interessante Projekt, das auch über die eigentlich Arbeit hinaus lehrreich war. Viele ausgiebige und unterhaltsame Diskussionen, auch über das Forschen und die Wissenschaft, brachten mir viel Einsicht.

... an Sabine Waffenschmidt für die Begutachtung meiner Arbeit und eine Menge aufmunternder Worte.

... an Andrea und Michael, die mir zusammen beistanden und mit mir Stürme und Flauten im Labor meisterten.

... Matthias und Birgit, die aus dem Trio ein dynamisches und spaßiges Quintett machten.

... Ute und Eva, die einsprangen, wenn zwei Hände nicht genug waren.

... Axel, Zarif, Petr, Marketa, Petr, Sebastian und Thomas, die phasenweise Blut und Schweiß für mich und mit mir schwitzten.

... dem aktuellen und schon verabschiedeten Rest der vier Welten für das Teamwork.

... an Almuth, Tilmann, Simone, Ansgar, Jola, Werner und Maik für viel nach Arbeitsschluß.

... an den SFB 189, den Fonds der chemischen Industrie und die Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Unterstützung meiner Promotion.

... an Werner, Erika und Birgit für ein drittes und viertes Zuhause.

... an Odette, die mir noch viel mehr persönliche Werte zeigte.

... an meine Eltern für sehr viel Unterstützung, elterlichen Ehrgeiz und ohne die ich nicht da wäre.

... an Antje, ohne die alles nichts wäre.

## Erklärung

Ich versichere,

daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn 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 noch nicht veröffentlicht worden ist;

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 Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.