



UNTERSUCHUNGEN ZUM MITOCHONDRIALEN
IMPORT DES HAUPTAUßENMEMBRANPROTEINS

PorB VON *Neisseria gonorrhoeae*

EVA HAUF

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Quelle Titelbild:

Billker, O., et al., Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *Embo J*, 2002. 21(4): p. 560-571

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene
und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

aus dem Institut für Zelluläre Mikrobiologie
der Universität Hohenheim
Betreuer: Prof. Dr. J. Rassow

**Untersuchungen zum mitochondrialen
Import des Hauptaußenmembranproteins
PorB von *Neisseria gonorrhoeae***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

EVA HAUF

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. J. Rassow

Tag der Disputation: 28. Juni 2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 <i>Das Hauptaußenmembranprotein PorB von Neisseria gonorrhoeae (PorB-Ngo).....</i>	3
2.1.1 Pathogenitätsfaktoren von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3
2.1.2 Vorkommen und Eigenschaften der Porine und des PorB-Ngo	4
2.1.3 Topologie des PorB-Ngo	4
2.2 <i>Proteinfaltung und Chaperone</i>	6
2.2.1 Proteinfaltung von Membranproteinen	6
2.2.2 Molekulare Chaperone	6
2.2.2.1 Chaperonfunktion am Beispiel des Hsp70.....	7
2.2.3 Interaktion von Chaperonen mit Mitochondrien.....	8
2.3 <i>Proteinimportmaschinerie der Mitochondrien</i>	9
2.3.1 Importweg von Proteinen in ihre mitochondrialen Kompartimente.....	12
2.3.2 Die Translokase der Außenmembran.....	14
2.3.3 Import von β -barrel Proteinen in die Außenmembran der Mitochondrien	17
2.4 <i>Mitochondrien im Zentrum von Apoptose</i>	19
2.4.1 Apoptose: morphologische und biochemische Charakteristika.....	19
2.4.2 Regulation der Apoptose	20
2.4.2.1 Die Bcl-2 Familie	21
2.4.2.2 Cytochrom c	21
2.4.2.3 AIF (<i>apoptosis inducing factor</i>)	22
2.4.3 Einfluss von Mikroorganismen auf Apoptose	22
2.4.3.1 Beispiele einiger Mikroorganismen und die Strategien zur Induktion von Apoptose ihrer Wirtszelle	23
2.4.3.2 Einfluss von PorB von <i>Neisseria gonorrhoeae</i> und PorB von <i>Neisseria meningitidis</i> auf Apoptose der Wirtszelle	24
3. Material und Methoden.....	25
3.1 <i>Material</i>	25
3.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial	25
3.1.2 Geräte	29
3.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	31
3.2.1 Transformation von Bakterienzellen	31
3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	32
3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	33

3.2.4	Sequenzierung von DNA	33
3.2.5	Plasmide	34
3.3	<i>Methoden der Hefegenetik</i>	34
3.3.1	Verwendete Hefestämme	34
3.3.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.4	<i>Zellbiologische Methoden</i>	36
3.4.1	Mitochondrienisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.4.2	Mitochondrienisolierung aus Rattenleber	38
3.4.3	Mitochondrienisolierung aus Jurkat-Zellen	38
3.4.4	Saccharose-Stufengradient zur Anreicherung von Mitochondrien.....	39
3.4.5	Bestimmung des Membranpotentials der Mitochondrien	40
3.4.6	Proteinase-K Sensitivitätstest.....	40
3.4.7	Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran.....	41
3.4.8	Trypsinbehandlung der Mitochondrien	42
3.4.9	<i>In vitro</i> Synthese radioaktiv markierter Proteine.....	42
3.4.10	<i>In vitro</i> Import radioaktiv markierter Proteine in Mitochondrien	43
3.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	44
3.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.5.2	Protein-Fällung mit Trichloressigsäure	45
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
3.5.4	Färbung mit Coomassie Blau	47
3.5.5	Trocknen von Polyacrylamidgelen.....	47
3.5.6	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen	47
3.5.7	Autoradiographie von Polyacrylamidgelen und Membranen.....	48
3.5.8	Quervernetzung von Proteinen nach <i>in vitro</i> Import in Mitochondrien	48
3.6	<i>Immunologische Methoden</i>	49
3.6.1	Immunologischer Antigen-Nachweis nach Western-Blot	49
3.6.2	Verstärkte Chemilumineszenzbestimmung	49
3.6.3	Coimmunfällung nach Quervernetzung	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	<i>In vitro</i> Proteinimport von <i>PorB-Ngo</i> und <i>VDAC</i> in Mitochondrien	51
4.1.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation von <i>PorB-Ngo</i> und <i>VDAC</i>	51
4.1.2	<i>In vitro</i> Import von <i>VDAC</i> in Wildtypmitochondrien	52
4.1.3	Proteinase K-Sensitivität des <i>PorB-Ngo</i>	54
4.1.4	Aggregationskontrolle von <i>PorB-Ngo</i> im Importansatz	56
4.1.5	Säureaktivierung von <i>PorB-Ngo</i>	57
4.1.6	Import des <i>PorB-Ngo</i> in Mitochondrien verschiedener Hefestämme	59

4.1.7	Mitochondrientitation	60
4.1.8	Einfluss verschiedener Parameter auf die Aggregation des PorB-Ngo	61
4.1.8.1	Bestimmung der Zeitabhängigkeit der <i>in vitro</i> Translation von PorB-Ngo....	62
4.1.8.2	Änderung der Zeitdifferenz zwischen Säureaktivierung und Lysatzugabe zum Importansatz	63
4.1.9	Titration der Lysatmenge mit radioaktiv markiertem PorB-Ngo	64
4.1.10	Titration der Retikulozytenlysatmenge	65
4.1.11	Saccharose-Titration	66
4.1.12	Einfluss von MgCl ₂ , EDTA, DTT und ATP auf die Importeffizienz	67
4.1.13	Importkinetik von PorB-Ngo in Hefemitochondrien	74
4.1.14	Zeitabhängigkeit der Anbindung und Translokation.....	75
4.1.15	<i>In vitro</i> Proteinimport in Säugetiermitochondrien	76
4.1.15.1	<i>In vitro</i> Proteinimport von PorB-Ngo in Rattenlebermitochondrien.....	76
4.1.15.2	<i>In vitro</i> Proteinimport von PorB-Ngo in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen.....	78
4.1.16	<i>In vitro</i> Import von PorB-Nme und PorB-Nmu in Mitochondrien	80
4.1.16.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation von PorB-Nme und PorB-Nmu.....	81
4.1.16.2	HCl-Titration von PorB-Nme	82
4.1.16.3	Proteinase K-Sensitivitätstest von PorB-Nme und PorB-Nmu	83
4.1.16.4	<i>In vitro</i> Import von PorB-Nme und PorB-Nmu in Hefemitochondrien	85
4.1.16.5	<i>In vitro</i> Import von PorB-Nme in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen	87
4.2	<i>Interaktionspartner beim in vitro Import von PorB-Ngo in Mitochondrien</i>	88
4.2.1	Chemische Quervernetzung von PorB-Ngo nach <i>in vitro</i> Import in Hefemitochondrien.....	89
4.2.1.1	Quervernetzung mit MBS.....	90
4.2.1.2	Quervernetzung mit DSS, EGS und Sulfo-MBS	93
4.2.1.3	Versuche zur Immunfällung nach Quervernetzung mit MBS.....	94
4.2.1.4	Chemische Quervernetzung nach <i>in vitro</i> Import von PorB-Ngo in $\Delta tim8$ Mitochondrien	96
4.3	<i>Importweg und Lokalisation des PorB-Ngo in Mitochondrien</i>	98
4.3.1	<i>In vitro</i> Import von PorB-Ngo in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien	98
4.3.1.1	<i>In vitro</i> Import in Trypsin-vorbehandelte Hefemitochondrien.....	98
4.3.1.2	<i>In vitro</i> Import in Trypsin-vorbehandelte Rattenlebermitochondrien.....	101
4.3.1.3	<i>In vitro</i> Import in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien aus Jurkat-Zellen.	102
4.3.2	<i>In vitro</i> Import des PorB-Ngo in Mitochondrien aus Deletions- und temperatursensitiven Hefemutanten.....	104
4.3.2.1	<i>In vitro</i> Import in $\Delta tom22$ -Mitochondrien	104
4.3.2.2	<i>In vitro</i> Import in <i>tom40-4</i> und Wildtypmitochondrien	107
4.3.2.3	<i>In vitro</i> Import in <i>sam50-1</i> Mitochondrien	110
4.3.2.4	<i>In vitro</i> Import in $\Delta mas37$ Mitochondrien	114

4.3.3	Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran nach <i>in vitro</i> Import von PorB-Ngo in Hefemitochondrien.....	117
5.	Diskussion.....	120
6.	Zusammenfassung.....	130
7.	Summary	131
8.	Literaturverzeichnis.....	132

Abkürzungsverzeichnis

AAC	ADP/ATP-Translokator
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i><u>A</u>poptosis <u>i</u>nducing <u>f</u>actor</i>
AK	Antikörper
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serum Albumin
C-	Carboxy-
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Da	Dalton
DIC	Dicarboxylat-Translokator
DiSC ₃	3,3' – Dipropylthiadicarbocyanid-iodid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Disuccinimidyl suberate
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i><u>E</u>nhanced <u>c</u>hemilumineszense <u>d</u>etection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGS	Ethylene glycol <i>bis</i> [succinimidylsuccinate])
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EM	EDTA-MOPS
GIP	Generelle Importpore
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
ICE	<i><u>I</u>nterleukin-1<u>β</u>-<u>c</u>onverting <u>e</u>nzyme</i>
Ig	Immunglobulin
IM	Innenmembran (<i><u>i</u>nn<u>e</u>r <u>m</u>embrane</i>) der Mitochondrien
IMS	Intermembranraum (<i><u>i</u>nt<u>e</u>r<u>m</u>embrane <u>s</u>pace</i>) der Mitochondrien
IpaB	<i><u>I</u>nvasion <u>p</u>lasmid <u>a</u>ntigen <u>B</u></i>

KCN	Kaliumzyanid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L3, L5	Loop3, Loop5
LB	Luria Bertani
M	Molar
MAP	<i>Mitochondria associated protein</i>
Mdm10	<i>Mitochondrial distribution and morphology 10</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MP	Magermilchpulver
MPP	<i>Mitochondrial processing peptidase</i>
mtHsp	mitochondriales Hitzeschockprotein
N-	Amino-
<i>N. gonorrhoeae</i> (Ngo)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i> (Nme)	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. mucosae</i> (Nmu)	<i>Neisseria mucosae</i>
NAC	<i>Nascent polypeptide-associated complex</i>
NADH	Nicotinamiddinukleotid
OD	optische Dichte
OM	Außenmembran (<i>outer membrane</i>) der Mitochondrien
Omp85	<i>Outer membrane protein 85</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>Presequence translocase-associated motor</i>
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pil	Pilus-assoziierte Proteine
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4(4-sulfophylazu)2-7-naphtalin-disulfonsäure
PorB-Ngo	PorB von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PorB-Nme	PorB von <i>Neisseria meningitidis</i>
PorB-Nmu	PorB von <i>Neisseria mucosae</i>
PT	<i>Permeability transition</i>

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	<u>S</u> orting and <u>a</u> ssembly <u>m</u> achinery
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS
SipB	<u>S</u> almonella <u>i</u> nvasion <u>p</u> rotein <u>B</u>
SM	Synthetisches Minimalmedium
Ssb	<u>S</u> ingle <u>s</u> trand <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
Sulfo-/MBS	n-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyldiamin
TIM	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TNF	Tumornekrosefaktor
TOB	<u>T</u> opogenesis of mitochondrial <u>o</u> uter membrane β - <u>b</u> arrel <u>p</u> rotein
TOM	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tom	Protein des TOM-Komplexes
Tris	Tri-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
VDAC	<u>v</u> oltage <u>d</u> ependant <u>a</u> nion <u>c</u> hannel
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
YPD-Medium	<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose-Medium</i>
YPG-Medium	<i>Yeast extract-Peptone-Glycerine-Medium</i>

1. EINLEITUNG

Viele bakterielle Erreger können die Apoptose ihrer Wirtszellen auslösen [1]. Generell spielen in den Zellen bei der Auslösung von Apoptose die Mitochondrien oft eine entscheidende Rolle [2] [3]. So überrascht es nicht, dass in jüngster Zeit für mehrere virale und bakterielle Proteine eine Translokation zu den Mitochondrien der Wirtszellen nachgewiesen wurde [4]. Ein Erreger, der über diesen mitochondrialen Weg die Apoptose seiner Wirtszellen auslösen kann, ist *Neisseria gonorrhoeae*, ein gramnegatives pathogenes Bakterium, das die sexuell übertragbare Krankheit Gonorrhoe verursacht [1] [5]. Während einer Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* transloziert das Hauptaußenmembranprotein PorB (PorB-Ngo) von der Außenmembran der Bakterien in die Plasmamembran der Wirtszelle. Anschließend kann PorB in den Mitochondrien der Wirtszelle lokalisiert werden, wo es zur Auslösung von Apoptose führt [6]. Vermutlich erleichtert die Apoptose dem Erreger die Überwindung der Mukosa der Urethral- und Zervixschleimhaut, wodurch er in tieferes Gewebe vordringen kann [1].

Über den Weg des PorB von der Plasmamembran zu den Mitochondrien, den genauen Importweg in die Mitochondrien und den Mechanismus der PorB-induzierten Apoptose ist noch nichts Genaueres bekannt. Da aber immer häufiger Resistenzen des Erregers gegenüber Antibiotika auftreten [7], könnten durch das Verständnis der Pathogenese eventuell neue Angriffspunkte für die Therapie der Erkrankung gefunden werden. Im Kontext eines Projekts zur Charakterisierung der molekularen Mechanismen der PorB-induzierten Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit die Translokation des PorB in die Mitochondrien untersucht.

Erste Beobachtungen zum Import des PorB in Mitochondrien wurden bereits in einer Studie von Müller et al. gezeigt [1]. Allerdings wurde dabei nicht das natürliche Protein verwendet, sondern mit verschiedenen Derivaten des PorB gearbeitet. Von Dipl. Biol. A. Lang konnte das authentische Protein *in vitro* in Mitochondrien importiert werden, allerdings war die Importeffizienz sehr gering, sie lag in fast allen Experimenten unter 2 % [8].

Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Studie zunächst ein geeignetes *in vitro*-System für den Import des authentischen PorB-Ngo in

Mitochondrien etabliert werden, um das Protein möglichst effizient in Mitochondrien importieren zu können.

Im Jahr 2003 wurde ein neuer Komplex der mitochondrialen Importmaschinerie entdeckt, der SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*). Durch die Entdeckung dieses Komplexes konnte der Importweg des endogenen mitochondrialen β -barrel Proteins VDAC (*voltage dependant anion channel*) über den TOM- (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) und SAM-Komplex in die mitochondriale Außenmembran aufgeklärt werden [9] [10]. Das PorB von *N. gonorrhoeae*, das auch in β -barrel Struktur vorliegt, weist große Ähnlichkeit zum VDAC auf. Dies führt zu der Frage, ob auch PorB-Ngo diesen Importweg in die Mitochondrien wählt. In seiner Diplomarbeit konnte A. Lang bereits erste Hinweise auf eine Abhängigkeit des mitochondrialen PorB-Ngo-Imports von der Komponente Tom40 des TOM-Komplexes zeigen [8]. Aufgrund der geringen Importeffizienz konnten diese ersten Befunde jedoch nicht weiter verfolgt werden. Auch eine Untersuchung der möglichen Beteiligung des SAM-Komplexes war nicht möglich.

Für die vorliegenden Untersuchungen war nun geplant, im Anschluss an die Etablierung eines geeigneten Systems zum effizienten *in vitro* Import des PorB-Ngo sowohl den Importweg des Proteins, als auch die am Import beteiligten mitochondrialen Strukturen näher zu charakterisieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das Hauptaußenmembranprotein PorB von *Neisseria gonorrhoeae* (PorB-Ngo)

2.1.1 Pathogenitätsfaktoren von *Neisseria gonorrhoeae*

Während der Infektion dringt der humanspezifische Erreger *Neisseria gonorrhoeae* in die Urethral- und Zervixschleimhaut ein und verursacht eine massive Entzündungsreaktion. Bei der Infektion spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, in besonderem Maße sind dies die Typ IV Pili [11], die Opa-Proteine [12] und das Porin PorB.

PilE, die Hauptuntereinheit, und PilC, das kleinere Protein der Pilus-assoziierten Proteine, vermitteln das erste Anhaften von *Neisseria gonorrhoeae* an die Wirtszelle und ermöglichen die enge Assoziation des Pathogens mit den Zielzellen [11].

Opa-Proteine bilden eine Familie von variablen Außenmembranproteinen, die in allen pathogenen Neisserien vorkommen. Sie binden an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche und vermitteln bei einer Infektion die Adhäsion und Invasion der Wirtszelle [12], [13].

Die Porine der Neisserien wirken als Adjuvans bei der Immunreaktion des Wirts. Sie aktivieren B-Zellen und andere Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Ihr Effekt auf die Immunantwort wird durch eine gesteigerte Expression von CD68 an der Oberfläche von APCs vermittelt, außerdem interagiert PorB mit Komponenten des Komplementsystems [14].

PorB hat zudem die Möglichkeit, von der Außenmembran der Bakterien in die Plasmamembran der Wirtszelle zu translozieren. Die Insertion in die Membranen führt zur Bildung eines Kanals, dessen Leitfähigkeit von der eukaryotischen Wirtszelle reguliert wird [15] [16]. PorB-Ngo kann anschließend in die Mitochondrien der Zelle translozieren, wobei der Weg, wie das Porin von der Plasmamembran zu den Mitochondrien gelangt, noch nicht geklärt ist. In infizierten Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass PorB-Ngo über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien den programmierten Zelltod der Wirtszelle verursacht [1] [6].

2.1.2 Vorkommen und Eigenschaften der Porine und des PorB-Ngo

Die Außenmembranen der Mitochondrien und Chloroplasten zeichnen sich durch die Anwesenheit von β -barrel Membranproteinen aus [17] [18]. In Mitochondrien erfüllen diese Proteine eine Reihe von Aufgaben, wie den Transport von kleinen Molekülen (VDAC=*voltage dependant anion channel*) [19], die Translokation von Proteinen (Tom40) [20] und die Regulation der mitochondrialen Morphologie (Mdm10) [21]. Auch die Außenmembranen der gramnegativen Bakterien beherbergen β -barrel Proteine [22]. Diese porenbildenden Proteine (Porine) ermöglichen die Aufnahme von Ionen und Nährstoffen, die für das Wachstum und die Funktion der Bakterienzelle wichtig sind. Sie vermitteln eine unspezifische, auf Diffusion basierende Passage von kleinen (bis 600 Da), polaren Molekülen [23].

Neisseria gonorrhoeae und *Neisseria meningitidis* sind gramnegative pathogene Bakterien, die die sexuell übertragbare Krankheit Gonorrhoe bzw. eine bakterielle Meningitis und Septikämie verursachen. Porine sind die häufigsten Proteine der Außenmembran pathogener Neisserien. Sie haben die Aufgabe, als Poren den Austausch von Ionen zu gewährleisten und sind durch ihre trimere β -barrel Struktur charakterisiert [14]. Die Porine in der Außenmembran der Neisserien zeigen auffällige Ähnlichkeiten zu den Porinen der mitochondrialen Außenmembran. Beide Porin-Klassen interagieren mit Purinnukleosid-Triphosphaten, welche die Porengröße regulieren und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit und Ionenselektivität verursachen [16]. Nach Infektion kann PorB von *Neisseria gonorrhoeae* (PorB-Ngo) in der Plasmamembran der Wirtszelle lokalisiert werden [15]. *In vivo* und *in vitro* wurde gezeigt, dass PorB-Ngo anschließend in die Mitochondrien der Wirtszelle gelangt und zur Apoptose der Zelle führt [6]. PorB von *Neisseria meningitidis* (PorB-Nme) weist zu 78 % identische Aminosäuren zu PorB-Ngo auf. Nach Infektion der Wirtszelle lokalisiert PorB-Nme in den Mitochondrien, im Gegensatz zu PorB-Ngo kann PorB-Nme Apoptose der Zelle verhindern [24].

2.1.3 Topologie des PorB-Ngo

Porine bestehen aus 9 Transmembranregionen, die durch 8 oberflächen-exponierte Loops miteinander verbunden sind. Die Loops sind sowohl in ihrer

Aminosäuresequenz, als auch in ihrer Länge variabel. Die Länge der membranspannenden Segmente ist unter den Porinen hingegen konserviert. Die membranspannenden Segmente bilden amphipatische β -Faltblattstrukturen, ordnen sich in einer Fass-Struktur an (β -barrel) und lagern sich zu funktionellen Trimeren zusammen [25] [26]. Nur wenig ist über den Mechanismus bekannt, wie die hochstrukturierten β -barrel Proteine zusammengefügt und richtig in die Membran eingebaut werden. Das PorB weist keine offensichtlichen Zielerkennungssignale in seiner Sequenz auf, die für einen Transport zu den Mitochondrien oder die Assemblierung in den mitochondrialen Membranen verantwortlich sein könnten [1] [6] [27].

Die Hauptstrukturunterschiede zwischen PorB von *Neisseria gonorrhoeae* (PorB-Ngo) und PorB von *Neisseria meningitidis* (PorB-Nme) liegen in den Loops zwischen den membranständigen β -Faltblattdomänen, vor allem in den Loops 3 und 5 (L3 und L5). L3 ragt in den wassergefüllten Kanal des PorB hinein, reguliert die Porengröße und bestimmt somit die Durchlässigkeit für bestimmte Proteine. In PorB-Ngo ist L3 vier Aminosäuren länger als in PorB-Nme, was zu einer unterschiedlichen Verteilung der geladenen Reste führt. Außerdem fehlt dem L3 von PorB-Ngo ein Prolinrest, der in anderen Porinen für die Windung des Loops verantwortlich ist. L5, der an der zytosolischen Seite lokalisiert ist, ist im PorB-Ngo 12 Aminosäuren länger als in PorB-Nme [28].

Der *porB* Locus im Genom von *Neisseria gonorrhoeae* kodiert für das Hauptaußenmembranprotein (*major outer membrane protein*) PorB. Allele dieses Locus werden, basierend auf der ähnlichen Sequenz und immunologischen Beziehungen, zwei homologen Gruppen zugeordnet, die als PIA und PIB bezeichnet werden. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht, ihrer Empfindlichkeit gegenüber Proteolyse und der antigenetischen Reaktivität. Die Allele einer Gruppe sind sich untereinander ähnlicher als sie es zu Allelen der anderen Gruppe sind. In natürlichen Isolaten individueller Stämme von *Neisseria gonorrhoeae* wird entweder PIA oder PIB exprimiert, die Rekombination von Hybridproteinen kann nur experimentell gezeigt werden [29] [30]. PIAs, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Accession Number: Z69259), sind tendenziell kleiner als PIBs, sie haben ein Molekulargewicht von 34 bis 36,5 kDa, wohingegen das Molekulargewicht der

PIBs von 36 bis 38 kDa reicht [26]. Die Variabilität der antigenen Determinanten liefert die Grundlage für die Einteilung von *Neisseria gonorrhoeae* in Serovare [25].

2.2 Proteinfaltung und Chaperone

Die meisten endogenen mitochondrialen Proteine werden im Zytosol an freien Ribosomen synthetisiert, ins Zytosol entlassen und anschließend in die Mitochondrien transportiert. Die Faltung und Entfaltung dieser neu synthetisierten Proteine ist für ihren Transport und ihre Translokation über die mitochondriale Membran entscheidend [31]. Da sowohl Proteine, als auch Pathogenitätsfaktoren in der Zelle zum Ort ihrer Wirkung transportiert werden müssen, ist es denkbar, dass sich auch Pathogenitätsfaktoren, wie das PorB-Ngo, die Funktion von Chaperonen zu Nutze machen.

2.2.1 Proteinfaltung von Membranproteinen

Herauszufinden wie eine Proteinsequenz zu ihrer dreidimensionalen Struktur kommt war in Bezug auf Membranproteine lange Zeit sehr schwierig, da man kaum etwas über deren dreidimensionale Struktur wusste. In einer Lipiddoppelschicht nehmen porenbildende Proteine entweder eine β -barrel Struktur oder die Struktur eines Bündels von α -Helices an. Die Membranproteinfaltung kann generell in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird das Protein in die Doppelschicht inseriert, was von einem Translokations-Komplex gelenkt und katalysiert wird. Auf diese Weise werden bereits einige der membraninserierten Anteile des Proteins in ihrer endgültigen räumlichen Struktur eingebaut [32] [33]. Im zweiten Schritt der Membranproteinfaltung wird schließlich die Tertiär- und Quartärstruktur ausgebildet. Dabei werden die im ersten Schritt eingebauten Transmembran-Helices endgültig angeordnet und weitere Untereinheiten des Proteins oligomerisiert [34].

2.2.2 Molekulare Chaperone

Für die Notwendigkeit von Chaperonen, beim Import des PorB-Ngo in Mitochondrien, spricht die hohe Aggregationsneigung des Proteins in

Importexperimenten *in vitro* [8].

Molekulare Chaperone schützen andere Proteine vor Aggregation. Sie unterstützen die Faltung von Vorstufenproteinen und falten beschädigte, falsch gefaltete Proteine zurück. Außerdem können Chaperone mit Proteasen kooperieren und dabei helfen, beschädigte Proteine abzubauen [35]. Die Faltung und Entfaltung von Proteinen mit Hilfe der Chaperone ist für deren Translokation in Mitochondrien entscheidend. Sie halten die Proteine in einer translokationskompetenten Konformation und können mit Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie wechselwirken [31].

Zellstress führt zur vermehrten Expression von Chaperonen. Stress kann jede schnelle Veränderung der Umgebung der Zelle sein, auf die die Zelle nicht vorbereitet reagieren kann, wie z.B. der Hitzeschock. Aufgrund dieses generellen Phänomens werden die Chaperone auch Hitzeschockproteine (Hsp) oder Stressproteine genannt. Nach Stresssituationen besteht ein erhöhter Bedarf der Chaperon-Funktion der Hsps, was ihre Induktion veranlasst. Dieser Bedarf wird verursacht durch eine steigende Menge an beschädigten Proteinen [35]. Die verschiedenen Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht eingeteilt [36]. Neu synthetisierte Proteine können aufgrund ihrer Neigung zu hydrophoben Interaktionen mit sich selbst oder anderen Proteinen aggregieren. Diese Interaktionen werden durch die hohe Konzentration an Proteinen im Zytosol zusätzlich begünstigt. Molekulare Chaperone, wie das konservierte Hsp70, sind daher notwendig, um die Aggregation fehlgefalteter Proteine zu verhindern und kinetisch ungünstige Intermediate zurück zu falten [37]. Chaperone haben eine zentrale Vertiefung, an der sie noch nicht gefaltete Proteine binden. Die korrekte Faltung des Proteins wird durch ATP-abhängige Zyklen vorangetrieben, in denen das Protein an das Chaperon gebunden und wieder entlassen wird. Durch die Bindung an hydrophobe Gruppen der Oberfläche der Polypeptide wird die fehlerhafte Faltung und Aggregation des Proteins verhindert [38].

2.2.2.1 Chaperonfunktion am Beispiel des Hsp70

Hsp70 ist ein ubiquitäres essentielles Chaperon-Protein, das an der Proteinfaltung, dem Proteintransport über Membranen und der Dynamik der Assemblierung von Makromolekülen beteiligt ist [39]. Hsp70 schützt Zellen bei

Zellstress, indem es Proteinaggregation verhindert und bei der Rückfaltung denaturierter Proteine hilft [40]. Die diversen Funktionen des Hsp70 sind von der ATP-abhängigen Bindung und Freisetzung von Proteinen abhängig. Hsp70 enthält eine hochkonservierte amino-terminale ATPase-Domäne, eine angrenzende Substrat-Binde-Domäne, die aus einer hydrophoben Tasche und einer Art Deckel besteht, und eine variabelere C-terminale Domäne. Im ATP-gebundenen Zustand ist die Substrat-Binde-Tasche geöffnet und es erfolgt ein schneller Austausch von Substraten. ATP-Hydrolyse führt zur Schließung des Deckels, was die Substrat-Bindung stabilisiert. Bei Wiedererlangen des ATP-gebundenen Zustands wird die geöffnete Konformation der Tasche wieder hergestellt, was zur Freisetzung des Substrats führt. Die intrinsische ATPase von Hsp70 ist nicht sehr aktiv, weshalb die ATP-Hydrolyse den limitierenden Schritt des Reaktionszykluses darstellt [41]. Die Feinabstimmung dieses Zykluses wird von Co-Chaperonen reguliert. Sie stimulieren die ATP-Hydrolyse und koordinieren die Substratbindung [42]. Zudem sorgen die Co-Chaperone dafür, dass die Chaperone an Subkompartimente der Zelle oder zu Proteinkomplexen gelangen, an denen sie benötigt werden [43]. Eukaryoten weisen sowohl konstitutiv exprimierte, als auch Stress-induzierbare Isoformen des Hsp70 auf. Somit ist gewährleistet, dass bei Stresssituationen der Zelle mehr Hsp70 zur Verfügung steht. Eine Rückkopplungsreaktion des stress-induzierten Hsp70 gewährleistet, dass immer eine dem Bedarf angepasste Menge an Chaperonen verfügbar ist [44]. Obwohl die Hauptfunktion von Hsp70 hochkonserviert ist, gibt es auch Isoformen mit speziellen Aufgaben. So assoziiert zum Beispiel die Ssb-Unterfamilie, eine sehr häufig vorkommende Variante des Hsp70 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, mit Ribosomen und unterstützt die Translation [39]. Es gibt Hsp70 Isoformen, die sich ausschließlich im Zytosol befinden, andere kommen nur im endoplasmatischen Retikulum oder in Mitochondrien vor [44].

2.2.3 Interaktion von Chaperonen mit Mitochondrien

Die Rolle von Chaperonen bei der Biogenese von endogenen Proteinen ist anhand der Synthese, des Transports und der Faltung von kernkodierten mitochondrialen Proteinen untersucht worden [45]. Die im Rahmen der endogenen Proteine aufgeklärten Importwege in Mitochondrien lassen ähnliche

Mechanismen beim Import des PorB-Ngo vermuten. Da die Konformation von Proteinen für deren Import in Mitochondrien sehr wichtig ist, liegt es nahe, dass auch exogene Proteine, wie das β -barrel Protein PorB-Ngo, Chaperone benötigen, um über die Membranen der Mitochondrien zu translozieren. Hierbei ist durchaus vorstellbar, dass sich Pathogene die vorhandenen Mechanismen der Chaperonfunktion zu Nutze machen.

Wenn ein Vorstufenprotein an den Ribosomen entsteht, assoziiert es mit einem Chaperon-ähnlichen Protein, dem NAC (*nascent polypeptide-associated complex*) [46]. Zusätzlich bindet an nahezu alle Proteine cotranslational Hsp70, was zunächst die Faltung bzw. die Aggregation des Proteins im Zytosol verhindert. Die Aktivität des Chaperons, die Faltung zu verhindern, ist für mitochondriale Proteine von großer Bedeutung, da Polypeptide, die bereits gefaltet sind, die mitochondrialen Membranen nicht überqueren können [45]. Das neu synthetisierte Protein kommt in einer Import-kompetenten Konformation an den Mitochondrien an. Hier dissoziiert Hsp70 vermutlich durch ATP-Hydrolyse [47]. In Rattenleberzellen bleibt ein gewisser Anteil an zytosolischem Hsp70 fest an der Außenmembran der Mitochondrien gebunden. Die Menge des gebundenen Hsp70 entspricht in etwa der der Proteinimportrezeptoren, was die vermutete Notwendigkeit der Entfaltung von Proteinen vor dem Import in Mitochondrien bestätigt [48]. Die Hitzeschockproteine Hsp90 und Hsp70 können an eine spezielle Domäne des Importrezeptors Tom70 der Importmaschinerie der Mitochondrien an der mitochondrialen Außenmembran andocken. Diese Interaktion dient dazu, Vorstufen von endogenen mitochondrialen Proteinen direkt zum Rezeptor zu bringen. Dort können die Proteine anschließend über die Membran translozieren. Die Bindung des Hsp70 an den Rezeptor von Tom70 ist für die Bildung eines Komplexes von Vorstufenprotein und Tom70, der für den Import des Proteins entscheidend ist, notwendig [49].

2.3 Proteinimportmaschinerie der Mitochondrien

Die Begrenzung der Mitochondrien durch zwei Membranen aus Lipiddoppelschichten gibt Hinweise auf deren prokaryotischen Ursprung. Während der Evolution der mitochondrialen Vorfahren, der α -Proteobakterien, wurden eine ganze Reihe von Genen auf das Wirtsgenom im Zellkern der Zelle

übertragen. Demzufolge ist der größte Anteil der mitochondrialen Proteine kernkodiert, sie müssen nach ihrer Synthese an zytosolischen Ribosomen zu den Mitochondrien transportiert und in diese importiert werden [50] [51] [52]. Die mitochondriale Außen- und Innenmembran dienen als Begrenzung für die beiden flüssigen Kompartimente der Mitochondrien, den mitochondrialen Intermembranraum und die Matrix (siehe Abb. 2.1).

Die Komponenten der Atmungskette sind in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert. Über die Elektronentransportkette wird Energie gewonnen, die zum Pumpen von Protonen aus der Matrix in den mitochondrialen Intermembranraum verwendet wird. Dabei bildet sich ein elektrochemischer Protonengradient, das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi$), quer zur inneren Mitochondrienmembran. Der Rückfluss der Protonen treibt die ATP-Synthase an, wodurch die oxidative Phosphorylierung beendet wird [53]. An der mitochondrialen Außenmembran hingegen wird wegen der porenbildenden Proteine, die die Membran für viele Moleküle durchlässig machen, kein Membranpotential aufgebaut.

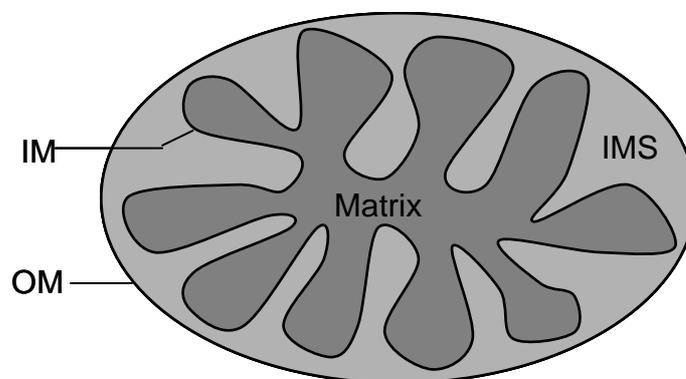


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums

OM=Außenmembran (*outer membrane*),
IMS=Intermembranraum (*intermembrane space*),
IM=Innenmembran (*inner membrane*)

Die korrekte Zuführung und Zuordnung der kernkodierten mitochondrialen Vorstufenproteine zu jedem der vier mitochondrialen Kompartimente ist entscheidend für die Aufrechterhaltung einer normalen Funktion und Struktur der Mitochondrien. Zusätzlich zur Zuordnung der Proteine zum korrekten Subkompartiment der Mitochondrien müssen einige Proteine zusätzlich noch korrekt in homo- und heterooligomeren Strukturen angeordnet werden, um ihre

Funktion erfüllen zu können. Die Translokationsmaschinerien in der Außen- und Innenmembran und Mediatoren in den flüssigen Kompartimenten der Mitochondrien übernehmen diese Aufgaben [54] [55]. Nach der Endosymbiontenhypothese sind Mitochondrien aus „Ur-Bakterien“ durch Endozytose entstanden. Für diese Hypothese sprechen auch Homologien des Proteinimports in Mitochondrien und Bakterien. Zum Beispiel werden in Mitochondrien Proteine aus der Matrix über Oxa1 in die Innenmembran eingebaut. Ein entsprechendes Homolog, das die gleiche Aufgabe in Bakterien erfüllt, ist das YidC in *Escherichia coli* [56]. Im Lauf der Evolution sind allerdings viele neue Importwege in Mitochondrien entstanden, die keine bakteriellen Homologe aufweisen.

In der Pathogenese bakterieller Infektionen ist seit dem Jahr 2000 bekannt, dass Mitochondrien ein häufiges Ziel der von Bakterien abgegebenen Toxine darstellen. Diese Proteine können sich die für endogene mitochondriale Proteine etablierte Proteinimportmaschinerie zu Nutze machen, um selbst in die verschiedenen Kompartimente der Mitochondrien zu gelangen [6]. Beispiele für Toxine, deren Ziel die Mitochondrien darstellen, sind PorB von *Neisseria gonorrhoeae* [57], VacA von *Helicobacter pylori* [57] und MAP (*mitochondria associated protein*) der enteropathogenen *Escherichia colis* [58].

Als Modellsystem für Untersuchungen des Importverhaltens von Proteinen in Mitochondrien wird häufig die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, sie wurde als Modellorganismus für Untersuchungen an Mitochondrien von Gottfried Schatz bereits 1963 etabliert [59]. Die Vorteile der Untersuchungen an Hefe bestehen darin, dass sich Hefen durch ihre kurze Generationszeit sehr einfach, schnell und effizient anzüchten lassen. Die Mitochondrien lassen sich im Vergleich zu Mitochondrien aus anderen Organismen über eine unkomplizierte Prozedur und in sehr großer Zahl aus den Hefen isolieren und anschließend über lange Zeiträume lagern. Da sich die Hefe als Modellsystem der mitochondrialen Importmaschinerie etabliert hat, sind Deletions- und temperatursensitive Mutanten erhältlich, die weitergehende Untersuchungen des Importverhaltens von Proteinen in Mitochondrien erheblich erleichtern.

2.3.1 Importweg von Proteinen in ihre mitochondrialen Kompartimente

Mitochondriale Proteine können in sechs Hauptklassen nach ihrer Lokalisation in den Mitochondrien unterteilt werden: einfache Außenmembranproteine, β -barrel Außenmembranproteine, Proteine des Intermembranraums, Translokator-Proteine der Innenmembran und Innenmembran- oder Matrix-Proteine mit N-terminaler Präsequenz. Bis auf die Außenmembranproteine, bei denen es noch nicht abschließend geklärt ist [60], ist allen Proteinen der Transport zur zentralen Eintrittspforte der Mitochondrien, der Translokase der Außenmembran, dem so genannten TOM-Komplex (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) gemein [61]. Nach dem TOM-Komplex nehmen die Proteine unterschiedliche Importwege, je nach individuellen oder allgemein gültigen Zielerkennungssignalen (Abb.2.2).

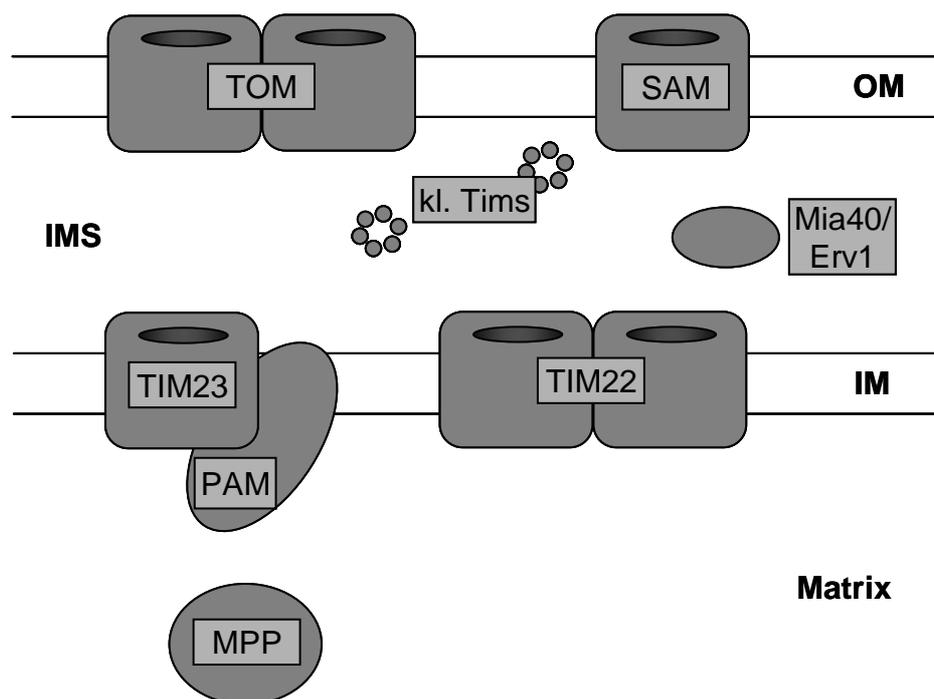


Abb. 2.2: Proteinimportmaschinerie der Mitochondrien

OM=Außenmembran (*outer membrane*), IMS=Intermembranraum (*intermembrane space*), IM=Innenmembran (*inner membrane*)

Außenmembranproteine, die durch einfache α -helikale Transmembrandomänen charakterisiert sind, können mit Hilfe des TOM-Komplexes direkt in die Außenmembran der Mitochondrien eingebaut werden. Außenmembranproteine mit einer komplexeren Topologie, wie die β -barrel Proteine, werden durch den

TOM-Komplex über die Außenmembran in den Intermembranraum transportiert. Von kleinen Tim-Proteinen im Intermembranraum der Mitochondrien werden die β -barrel Proteine zum SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*), der auch als TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel protein*) bezeichnet wird, gebracht, wo sie vom Intermembranraum aus in die Außenmembran eingebaut werden [9] [62]. Kleine Cystein-haltige Proteine des Intermembranraums werden über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transportiert [63]. Ihr Import wird durch die Intermembranraum-spezifischen Importkomponenten Mia40 und Erv1 gefördert [64] [65]. Hydrophobe Innenmembranproteine, die keine abspaltbaren Zielerkennungssequenzen tragen, wie die Translokator-Proteine werden über eine eigene Translokase, den TIM22-Komplex, in die Innenmembran eingebaut [66]. Die Proteine werden von den kleinen Tim-Proteinen vom TOM-Komplex aus durch den wässrigen Intermembranraum zum TIM22-Komplex begleitet und membranpotentialabhängig in die Innenmembran eingebaut [67] [68]. Proteine mit einer N-terminalen Präsequenz werden über die TIM23-Translokase in die Innenmembran eingebaut oder in die Matrix transportiert [69]. Nachdem die Proteine über den TOM-Komplex die Außenmembran passiert haben, werden sie über eine Intermembranraumdomäne von Tim50 zum Importkanal des TIM23-Komplexes geleitet [70]. Vorstufenproteine der Innenmembran werden durch ein internes Signal im TIM23-Komplex angehalten und nach Abspaltung der Präsequenz durch die MPP (*mitochondrial processing peptidase*) membranpotentialabhängig in die Innenmembran eingebaut [71]. Die Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix wird durch den ATP-abhängigen PAM-Komplex (*presequence translocase-associated motor*) angetrieben, der mit dem TIM23-Komplex assoziiert ist und unter anderem auch mtHsp70 (mitochondriales Hsp70) enthält [72] [73]. Nach dem Eintritt in die Matrix wird die Präsequenz, wie bei den Präsequenz tragenden Innenmembranproteinen, durch MPP abgespalten, woraufhin sich die Proteine funktionell falten können [74].

Die Aufklärung der mitochondrialen Importmaschinerie erfolgte anhand einer Reihe ausgewählter Proteine. Für viele mitochondriale Proteine, unter anderem auch für sehr wichtige Proteine, wie zum Beispiel die Caspasen, ist bis heute nichts über deren Importweg in Mitochondrien bekannt.

Je mehr Proteine untersucht wurden, desto mehr Wege für deren Import in Mitochondrien wurden beschrieben. Sogar Proteine mit Lokalisation in den gleichen mitochondrialen Kompartimenten zeigen zum Teil unterschiedliche Zielerkennungen und Importwege.

Anhand der β -barrel Proteine Tom40 und VDAC wurde 2003 der neue SAM- oder TOB-Komplex der mitochondrialen Importmaschinerie entdeckt [9]. Da der Komplex allerdings durch den Import von lediglich zwei Proteinen untersucht wurde, ist nicht auszuschließen, dass bei der Untersuchung weiterer β -barrel Proteine völlig neue Importwege in die Mitochondrien entdeckt werden.

2.3.2 Die Translokase der Außenmembran

Der TOM-Komplex ist die Erkennungsstelle und zentrale Eintrittspforte für den Import aller essentiellen kernkodierten mitochondrialen Proteine. Der TOM-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten: der kanalbildenden Untereinheit Tom40, den Rezeptorkomponenten Tom22, Tom20 und Tom70 und den kleinen Tom-Proteinen Tom5, Tom6 und Tom7 [61] [75] [76].

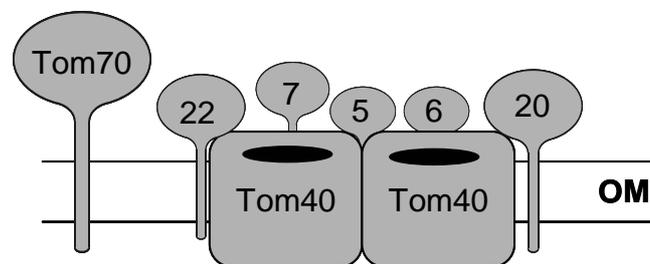


Abb.2.3: Aufbau des TOM-Komplexes

(*translocase of the outer mitochondrial membrane*) der Außenmembran von Mitochondrien

Elektronenmikroskopische Strukturanalysen des TOM-Komplexes zeigen zwei bis drei Poren, wobei jede Pore einem proteinleitenden Kanal entspricht. Da der Durchmesser der Poren bei 2,5 nm liegt, können nur ungefaltete Polypeptidketten oder höchstens zwei α -Helices von der Pore aufgenommen werden [61] [77] [78]. Die Untereinheiten Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 bilden den TOM-Kernkomplex, der auch als Generelle Importpore (GIP) bezeichnet wird [61]. Tom40 ist ein essentielles Protein, das in β -barrel Struktur vorliegt, es bildet die Hauptkomponente der Protein-leitenden Pore [76]. Tom40

bildet keine passive Pore, sondern interagiert sowohl über ionische als auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Proteinen während ihres Transports. Die antreibende Kraft der Translokation ist nicht genau bekannt [79]. Nach der „*Binding Chain*“-Hypothese binden die Proteine zunächst an die *cis*-Bindungsstelle, die dem Zytosol zugewandt ist und wahrscheinlich aus den zytosolischen Domänen der Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes besteht. Von dort werden die Proteine mit steigender Affinität an die *trans*-Bindungsstelle, die dem Intermembranraum zugewandt ist, weitergegeben, die von Tom40 gebildet wird [80] [81]. Die Energie für die Translokation steht durch das mitochondriale Membranpotential, ATP in der Mitochondrienmatrix und durch die frei werdende Energie bei der Bindung an andere Proteine zur Verfügung [82]. Zwei Hypothesen des Antriebs der Translokation sind beschrieben [83]. Bei einer Hypothese geht man davon aus, dass Proteine durch die Bindung an den mtHsp70-Tim44-Komplex von diesem aktiv in die Mitochondrien gezogen werden. Gefaltete Proteine werden durch die mechanische Zugkraft an der Außenseite der Mitochondrien entfaltet [84] [85]. Bei der Untersuchung der stark gefalteten Häm-Bindedomäne von Cytochrom b_2 , deren Import temperaturunabhängig abläuft, wurde eine weitere Hypothese aufgestellt. Nach dieser sind Proteine ständig in Brown'scher Molekularbewegung und werden immer wieder ge- und entfaltet. Die Rückfaltung konkurriert dabei mit der Translokation und das Protein kann sich einige Male falten und entfalten, bis es schließlich über die Membran transloziert. Durch die ATP-abhängige Bindung an mtHsp70 und Tim44 wird dabei lediglich die Bewegung in die „richtige“ Richtung vermittelt, da durch eine Sperrklinke („*ratchet*“) das Zurückgleiten des Proteins verhindert wird [83]. Eine neuere Untersuchung des Hsp70 scheint die beiden Hypothesen vereinen zu können, was als „entropisches Ziehen“ bezeichnet wird. Durch die Verringerung der Entropie kann Hsp70 nach ATP-Hydrolyse die Entfaltung von Proteinen beschleunigen. Einzelne Hsp70 Moleküle können nicht nur bei der Entfaltung helfen, sondern auch die in Translokation begriffenen Proteine in die Mitochondrien ziehen [86].

Der Weg der Translokation über die Außenmembran ist für Proteine mit N-terminaler Präsequenz, die in die Innenmembran oder Matrix importiert werden und für Translokator-Proteine der Innenmembran aufgeklärt.

Die typische Präsequenz der Vorstufenproteine besteht aus 10 bis 30 Aminosäuren und bildet eine amphipatische α -Helix. Die Hälfte der Helix hat eine hydrophobe Oberfläche, die von der Bindestelle des Tom20-Rezeptors erkannt wird, die andere Hälfte ist positiv geladen und wird vom Tom22-Rezeptor erkannt [87]. Mit Hilfe von Tom5 wird das Protein zur generellen Importpore (GIP) transportiert [88]. Nach der Translokation durch die Tom40-Pore bindet die Präsequenz an die Intermembranraum-Domäne von Tom22 [89]. Die Translokator-Proteine, wie zum Beispiel der AAC (ADP/ATP-Translokator) oder DIC (Dicarboxylat-Translokator) tragen keine Präsequenz, sie besitzen lediglich interne Zielerkennungssignale und werden von einem anderen Rezeptor an der mitochondrialen Oberfläche erkannt, von Tom70 [90] [91] [92]. Anschließend werden die Proteine zur Importpore Tom40 weitergeleitet, wobei sowohl die anderen Rezeptorproteine Tom20 und Tom22, als auch Tom5 beteiligt sind. Obwohl die Rezeptoren Tom20 und Tom22 vor allem Proteine anhand ihrer Präsequenz erkennen, während Tom70 vorwiegend mit hydrophoben Vorstufenproteinen mit internen Zielerkennungssequenzen interagiert, zeigen die Rezeptoren zum Teil Überschneidungen in ihrer Spezifität [93]. Bei der Inaktivierung eines Rezeptors können die anderen Rezeptoren zumindest teilweise deren Funktion übernehmen. Deshalb ist nur die Deletion aller Rezeptoren letal für die Zelle [94]. Tom22 hat noch weitere Aufgaben; es ist ein multifunktionelles Protein, das auch für die Organisation der TOM-Maschinerie von großer Bedeutung ist. In Abwesenheit von Tom22 zerfällt die Translokase in ihre Kernkomplexe, die grundlegenden Importeinheiten bleiben zwar erhalten, aber die Passage von Proteinen durch den Tom-Kanal kann nicht mehr kontrolliert werden. Bei Fehlen von Tom22 ist die Zelle zwar lebensfähig, aber Wachstum und Import von mitochondrialen Proteinen sind stark eingeschränkt [75]. Abgesehen von Tom5 interagieren die kleinen Tom-Proteine, Tom6 und Tom7, nicht mit Vorstufenproteinen. Sie sind, wie Tom22, für die Assemblierung und Stabilität des TOM-Komplexes entscheidend [62].

2.3.3 Import von β -barrel Proteinen in die Außenmembran der Mitochondrien

Die Proteine der mitochondrialen Innenmembran bestehen, wie Proteine in nahezu allen Membranen eukaryotischer Zellen, aus transmembranen α -Helices. Die mitochondriale Außenmembran stellt eine Ausnahme dar, sie enthält Proteine, die durch β -Faltblatt Strukturen in der Membran verankert sind (β -barrel Proteine) [95] [96] [97]. Der TOM-Komplex ist für die Integration dieser β -barrel Proteine in die Außenmembran nicht ausreichend und kann auch das β -barrel Protein Tom40 nicht zu funktionellen Komplexen zusammenlagern. 2003 wurde ein zweiter Außenmembrankomplex, der an der Biogenese von mitochondrialen Proteinen beteiligt ist identifiziert, der SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) oder auch TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins*) [9, 10].

β -barrel Proteine passieren durch die Tom40-Pore des TOM-Komplexes die Außenmembran. Sie werden im Intermembranraum von den kleinen Tim-Proteinen zum SAM-Komplex transportiert und von diesem in die Außenmembran der Mitochondrien eingebaut [62] [98] [99].

In Bakterien erfolgt der Einbau von Proteinen in die Außenmembran durch einen ähnlichen Mechanismus. Die Proteine passieren die Außenmembran, das Homolog zum mitochondrialen TOM-Komplex ist in Bakterien die Sec-Maschinerie. Anschließend werden β -barrel Proteine, wie auch die Proteine PorA und PorB der Neisserien von der periplasmatischen Seite in die Außenmembran der Bakterien eingebaut. Für diesen Schritt in der Translokation von β -barrel Proteinen wird entsprechend dem SAM-Komplex in Mitochondrien, in Bakterien Omp85 für deren Einbau benötigt [100]. Diese Verwandtschaft lässt vermuten, dass die Grundsätze des Omp85- bzw. SAM-abhängigen Importwegs von Bakterien zu Mitochondrien konserviert sind [101]. Zwei Untereinheiten des SAM-Komplexes wurden zunächst identifiziert, Mas37 und Sam50, wobei Sam50 auch als Tob55 bezeichnet wird [9] [102]. 2004 wurde eine weitere Komponente des SAM-Komplexes identifiziert, Sam35, auch Tob38 oder Tom38 bezeichnet (Abb. 2.4)

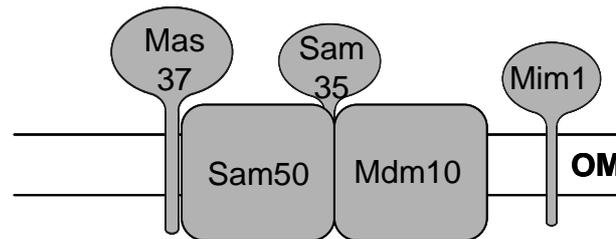


Abb.2.4: Aufbau des SAM-Komplexes

(*sorting and assembly machinery*) der Außenmembran von Mitochondrien

Sam35 ist, wie Sam50, ein essentielles Protein und zeigt die Charakteristika eines peripheren Außenmembranproteins. Sam35 wird beim Import von Tom40 zur Bildung eines Zwischenprodukts während des Imports benötigt und spielt somit eine besondere Rolle in der Biogenese von mitochondrialen β -barrel Proteinen [101]. Sam35, Mas37 und Sam50 bilden den Kernkomplex des SAM-Komplexes von etwa 200 kDa. Er ist für die Assemblierung von β -barrel Proteinen, wie zum Beispiel der Komponente Tom40 des TOM-Komplexes, des in der Außenmembran sehr häufig zu findenden VDAC und der Komponenten Mdm10 und Sam50 des SAM-Komplexes notwendig [103] [104]. Mdm10 (*mitochondrial distribution and morphology*) ist eine weitere Komponente des SAM-Komplexes und spielt eine Rolle bei den letzten Schritten der Assemblierung des TOM-Komplexes, wobei es für den Einbau des VDAC in die mitochondriale Außenmembran nicht benötigt wird. Meisinger et. al. schlussfolgern aus ihren Untersuchungen, dass Mdm10 durch seine Bedeutung für die Biogenese des TOM-Komplexes auf einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Importmaschinerie und dem Erhalt der mitochondrialen Morphologie hinweist [103]. Mim1 spielt, wie Mdm10, eine entscheidende Rolle in der Biogenese des TOM-Komplexes. Die Hauptfunktion von Mim1 besteht darin, die Assemblierung des TOM-Komplexes zu unterstützen. Der TOM-Komplex benötigt Mim1 nach seiner SAM-abhängigen Insertion in die Außenmembran. Entweder spielt Mim1 eine Rolle bei der Freisetzung des Tom40 vom SAM-Komplex oder bei der abschließenden Assemblierung des TOM-Komplexes. Die Assemblierung anderer β -barrel Proteine bleibt von Mim1 unbeeinflusst [105]. Der Importweg von Tom40 läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst wird Tom40 von Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt und durch eine bereits vorhandene Tom40-Pore über die Außenmembran in den

Intermembranraum der Mitochondrien transloziert [9] [62]. Mit Hilfe der im Intermembranraum vorhandenen kleinen Tim-Proteine wird Tom40 vom TOM- zum SAM-Komplex weitergeleitet, wodurch das Zwischenprodukt I von etwa 250 kDa gebildet wird [102] [9]. Anschließend geht Tom40 mit Tom5 eine feste Bindung ein und bildet das etwa 100 kDa große Zwischenprodukt II. Danach assoziieren die weiteren kleinen Tom-Proteine und Tom22 mit Tom40 und formen schließlich den TOM-Komplex von 450 kDa [62] [9].

Für die Translokation des endogenen mitochondrialen β -barrel Proteins VDAC (*voltage dependant anion channel*) über die Außenmembran wurde zunächst Tom20 als entscheidende Rezeptorkomponente für die Erkennung des TOM-Komplexes entdeckt [106]. Diese Erkenntnis konnte allerdings durch den Nachweis der Abhängigkeit von weiteren Komponenten des TOM-Komplexes ergänzt werden. Demnach ist der Import des VDAC von Tom20 und Tom40, Tom22, Tom5 und Tom7 abhängig [27]. Nach der Erkennung durch den TOM-Komplex wird der VDAC über die Tom-Pore in den Intermembranraum der Mitochondrien transportiert. Von dort gelangt er mit Hilfe der kleinen Tim-Proteine zum SAM-Komplex und wird in die Außenmembran eingebaut [62] [98] [99].

2.4 Mitochondrien im Zentrum von Apoptose

2.4.1 Apoptose: morphologische und biochemische Charakteristika

Zwei Formen des Zelltods können unterschieden werden: Nekrose und Apoptose. Während die Nekrose unter physiologischen Bedingungen nur durch das Komplementsystem oder eine Infektion mit lytischen Viren ausgelöst werden kann, ist die Apoptose von Zellen im Organismus von weit größerer Bedeutung. Apoptose ist ein physiologischer Prozess; es läuft ein genetisch gesteuertes Programm ab, bei dem die Zellen sich selbst eliminieren. Apoptose stellt einen aktiven Prozess dar, der von der Zelle selbst durchgeführt wird und einen beträchtlichen Stoffwechsellaufwand bedingt [107].

Morphologisch kann zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachtet werden. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Zellorganellen intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Der Zellkern schrumpft und das

Chromatin verdichtet sich [108]. An der Zytoplasmamembran ist die Ausbildung von Bläschen und Ausstülpungen zu beobachten (*membrane blebbing*). Schließlich schnüren sich membranumschlossene Vesikel, die apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*), von der Zelle ab [109]. Die apoptotischen Körperchen werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit, im Gegensatz zur Nekrose ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert [110]. Biochemisch kommt es bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. Phosphatidylserin, ein Protein, das normalerweise ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite der Zelle lokalisiert ist, wird auf die extrazelluläre Seite der Membran verlagert. Rezeptoren der Makrophagen erkennen das Protein, können an die Zellen binden und sie ohne Entzündungsreaktion aufnehmen und phagozytieren [111]. Im Zellkern zerschneiden DNAsen die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke [108].

2.4.2 Regulation der Apoptose

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Caspasen. Die zur Apoptose führende Signalkaskade kann je nach Zelltyp und Auslöser über unterschiedliche Signalwege eingeleitet werden. Extrazelluläre Signale leiten beim extrinsischen Weg (TypI-Weg) über die Aktivierung eines membranständigen zellulären Rezeptors (Todesrezeptor), mit dem die Liganden einen Komplex bilden, die Aktivierung der Caspasekaskade ein. Ein weiterer Weg Apoptose auszulösen erfolgt über den intrinsischen Weg (TypII-Weg), bei dem Mitochondrien der Zelle eine entscheidende Rolle spielen [3]. Außerdem gibt es die Möglichkeit, dass durch Stress induziert Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, was wiederum die Caspasekaskade aktiviert [112].

Die Rolle der Mitochondrien in der Regulation von Apoptose ist erst seit einigen Jahren bekannt. Sie wurde vor allem nach der Identifizierung einer Reihe von mitochondrialen Proteinen, die entscheidend am Ablauf von Apoptose beteiligt sind, deutlich. Diese Proteine können in zwei Klassen eingeteilt werden: Pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, die in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert sind und Proteine, die während der Apoptose von den

Mitochondrien abgegeben werden, wie AIF (*apoptosis inducing factor*) und Cytochrom c [2].

2.4.2.1 Die Bcl-2 Familie

Das Verhältnis der pro- und antiapoptischen Proteine der Bcl-2 Familie beeinflusst die Antwort der Zelle auf „Todessignale“, womit sowohl Gegebenheiten in der Zelle als auch Mediatoren gemeint sein können [113]. In der Außenmembran der Mitochondrien können die Proteine einerseits Andockstellen für andere Proteine der „Todeskaskade“ bilden [114], andererseits scheinen sie die Entstehung einer Permeabilitätssteigerung der Innenmembran (PT=*permeability transition*) und die Freisetzung von AIF und Cytochrom c zu beeinflussen [115] [116]. PT bezeichnet eine plötzliche Permeabilitätssteigerung der mitochondrialen Innenmembran, die für lösliche Stoffe mit einem Molekulargewicht bis 1500 Da durchlässig wird [117] [118]. Sie führt zur Depolarisierung der Membran, die ATP-Synthese der Mitochondrien wird eingeschränkt [119]. Es gibt Anzeichen dafür, dass die PT als ein frühes Ereignis in der Auslösung von Apoptose gesehen werden kann [120]. Bemerkenswert ist, dass proapoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie die Permeabilitätssteigerung der Innenmembran und die Freisetzung von Cytochrom c begünstigen, wohingegen antiapoptische Proteine, wie Bcl-2, die PT für bestimmte Auslöser erschweren können. Die Effekte könnten auch mit den mechanischen Eigenschaften der Außenmembran, die ihr durch das Vorhandensein von Proteinen der Bcl-2 Familie verliehen werden, zusammenhängen [121]. Mitglieder der Bcl-2 Familie interagieren auch mit dem β -barrel Protein der mitochondrialen Außenmembran, VDAC. Gezeigt wurde, dass proapoptische Proteine der Bcl-2 Familie, wie Bax und Bak, die Öffnung des Kanals begünstigen, während antiapoptische Proteine den Kanal schließen, indem sie direkt an ihn binden [122].

2.4.2.2 Cytochrom c

Cytochrom c ist ein Protein, das in der Innenmembran und im Intermembranraum von Mitochondrien vorkommt. Wird es aus den Mitochondrien ins Zytosol der Zelle freigesetzt, bindet es an Apaf-1. In der Gegenwart von Cytochrom c kann Apaf-1 an Caspase-9 binden, wodurch diese

aktiviert wird. Das so gebildete Apoptosom aktiviert die Caspase-3, die Caspasekaskade ist in Gang gesetzt und Apoptose der Zelle wird ausgelöst [123]. Noch nicht geklärt ist, wie das Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol der Zelle gelangen kann. *In vitro* wurde die Freisetzung durch Überführen der Mitochondrien in hypotones Medium und Waschen der Membranen in isotonischem Salin-Medium gewährleistet [124]. Durch das hypotone Medium wird die mitochondriale Außenmembran zerstört, durch das Waschen mit salzhaltigem Medium wird Cytochrom c von der mitochondrialen Innenmembran abgelöst. Inwiefern diese Manipulation auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen werden können ist fraglich.

2.4.2.3 AIF (*apoptosis inducing factor*)

AIF ist ein Protein, das von Mitochondrien abgegeben wird, deren Membranpotential durch PT zerstört wurde. Dieses Protein stellt den Zusammenhang zwischen der Zerstörung des Membranpotentials von Mitochondrien und apoptotischen Veränderungen im Zellkern der Zelle dar, wie Kondensation von Chromatin und Fragmentierung von DNA. AIF ist eine Protease, die durch die proteolytische Aktivierung von Endonukleasen des Zellkerns die apoptotischen Veränderungen im Zellkern hervorruft.

Dieser Zusammenhang bestätigt die Theorie, dass Mitochondrien die wichtige Aufgabe zukommt Apoptose von Zellen zu regulieren [115].

2.4.3 Einfluss von Mikroorganismen auf Apoptose

Einige Mikroorganismen verändern die Signalwege der Apoptose, um Abwehrmechanismen der Zelle zu umgehen und somit optimale Bedingungen für ihr Überleben zu schaffen. Ein weiteres Ziel ist die Infektion von Zellen zu erleichtern, um die Verbreitung der Mikroben im Organismus zu sichern. Schließlich gibt es noch Mikroorganismen, die Apoptose verhindern, um das Überleben von Zellen zu sichern, die für ihr Überleben und ihre Persistenz entscheidend sind [125].

Bakterielle Pathogene können über verschiedene proapoptotische Strategien Apoptose der Wirtszelle auslösen. Diese Strategien beinhalten die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, die Nachahmung sekundärer Botenstoffe, die

Regulierung der Caspase-Funktion, die Hemmung der Proteinsynthese, Zerstörung von Wirtszellmembranen und weitere noch unbekannte Mechanismen [126].

2.4.3.1 Beispiele einiger Mikroorganismen und die Strategien zur Induktion von Apoptose ihrer Wirtszelle

Alle klinischen Isolate der Shigellen induzieren Apoptose von Makrophagen. Shigellen werden von Makrophagen aufgenommen, sie entkommen den phagozytierenden Vakuolen und gelangen ins Zytosol der Makrophagen. Neben anderen Proteinen sezernieren die Shigellen IpaB (*invasion plasmid antigen B*). IpaB verteilt sich im gesamten Zytoplasma und bindet an ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme*, Caspase1), was zur Auslösung von Apoptose führt [127] [128].

Salmonellen werden, wie die Shigellen, von Makrophagen aufgenommen und können Apoptose auslösen. Die Aufnahme führt zu einem maßgeblichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, wobei Calcium als sekundärer Botenstoff Apoptose aktivieren kann. Außerdem weist SipB (*Salmonella invasion protein B*) Sequenzhomologie zu IpaB auf, was auf die Auslösung von Apoptose durch Bindung an eine Caspase hindeutet [129].

In der systemischen Phase einer Infektion der Leber mit *Salmonella typhimurium* kann Apoptose dieser Zellen beobachtet werden [130].

Listeria monocytogenes induziert Apoptose in dendritischen Zellen und Leberzellen, in Makrophagen ist es allerdings nicht zytotoxisch. Aus Phagolysosomen kann es ins Zytoplasma der infizierten Zelle entkommen [131] [132].

VacA von *Helicobacter pylori* induziert, vermittelt über das CD95 Rezeptor-Ligand-System, Apoptose von Epithelzellen des Magens [133] [134].

Bordetella pertussis löst in Makrophagen Apoptose durch Sekretion des Toxins Adenylatzyklase-Hämolyisin aus. Das Toxin besteht aus zwei Domänen, die Hämolyisin-Domäne bildet eine Pore in der Zytoplasmamembran und ermöglicht die Translokation der Adenylatzyklase-Domäne ins Zytoplasma der Wirtszelle. Die Adenylatzyklase wird durch Calmodulin aktiviert, wodurch die intrazelluläre Konzentration von cAMP ansteigt. Ein weiteres Toxin von *Bordetella pertussis* ist das Pertussis-Toxin, das die Hemmung der zellulären Adenylatzyklase

unterdrückt. Dadurch bewirkt es indirekt einen zusätzlichen Anstieg von cAMP, wodurch Apoptose der Wirtszelle ausgelöst wird [135].

Das α -Toxin von *Staphylococcus aureus* bindet an einen Wirtszellrezeptor und ermöglicht durch die Bildung einer Pore, dass Natrium in die Zelle einströmen kann. Es wird Cytochrom c aus intakten Zellen und isolierten Mitochondrien freigesetzt, was zur Initiierung der Caspasekaskade führt [136] [137].

2.4.3.2 Einfluss von PorB von *Neisseria gonorrhoeae* und PorB von *Neisseria meningitidis* auf Apoptose der Wirtszelle

Die Proteine PorB von *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* translozieren von der Außenmembran der Bakterien in Membranen der Wirtszelle und lokalisieren intrazellulär in den Mitochondrien. PorB-Ngo wirkt pro-, PorB-Nme antiapoptotisch [1].

Nach Infektion von Zellen in Zellkultur mit *Neisseria gonorrhoeae* sind die typischen Anzeichen von Apoptose zu beobachten. Die Induktion der Apoptose ist nicht von den bekannten Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- α , abhängig, da auch nach Hemmung dieser Faktoren Apoptose nicht verhindert werden kann. Zellen verschiedener Zelltypen reagieren nach Inkubation mit PorB-Ngo mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, der durch Zugabe von ATP und GTP verhindert werden kann [1]. Die Durchlässigkeit der Membran kann sowohl in intakten Zellen in Zellkultur, als auch in isolierten Mitochondrien durch Inkubation mit isoliertem PorB-Ngo beobachtet werden. Überexpression von Mitgliedern der antiapoptotischen Bcl-2 Familie schützt Zellen vor PorB-Ngo induzierter Apoptose [6].

Vorbehandlung von Zellen mit PorB-Nme schützt deren Mitochondrien vor Schädigungen durch apoptotische Stimuli. Auch Veränderungen der Zelle im Endstadium von Apoptose, wie die Beschädigung von DNA, können durch PorB-Nme verhindert werden. PorB-Nme koimmunopräzipitiert mit VDAC, dadurch kann die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranen (PT) verringert werden. Apoptose wird verhindert [24].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial

³⁵ S-Methionin	ICN Biochemical Research Products, Eschwege, Deutschland
Acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Acrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Agar	Bit Tek™ Difco Laboratories Detroit, MC, USA
Ampicillin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Antikörper gegen PorB-Ngo	von Frau Dipl.Biol. E. Dian zur Verfügung gestellt
Antikörper gegen Mge1 und Tim23	AG Pfanner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg
Anti-rabbit-Ig-Meerrettich- Peroxidase-gekoppelter Antikörper	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Bacto-Peptone	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Bacto-Typtone	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Bicin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
BRADFORD-Reagenz	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland

BSA (bovines Serum Albumin)	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chromatographiepapier	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G 250	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DiSC ₃	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
dNTPs	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DSS	Pierce, Rockford, Illinois, USA
DTT	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
ECL-Kit	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
EDTA	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
EGS	Pierce, Rockford, Illinois, USA
EGTA	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entwicklerlösung	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit II	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ethanol _{absolut}	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Fixiererlösung	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Frischhaltefolie	Dow Chemical Company, Saran

Galaktose	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Cleveland, OH, USA
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCL _{aq} (37 % rauchend)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Hepes	USB, Cleveland, Ohio, USA
Isopropanol	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumacetat	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
µMACS Protein A Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MassRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
MBS	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Membranfilter	0,2 und 0,45 µm; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MOPS	USB, Cleveland, Ohio, USA
NaOH (Plätzchen _{reinst})	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	USB, Cleveland, Ohio, USA
Natriumsuccinat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nikotinamiddinukleotid	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Whatman, Schleicher und Schuell
Oligodesoxyribonukleotide	biomers.net, Ulm, Deutschland
Percoll	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Polysine TM Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Ponceau S	Serva, Mannheim, Deutschland
Präimmunserum	von Frau Dipl.-Biol. E. Dian zur Verfügung gestellt (aus Immunisierung Kaninchen)
Proteinase K	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Proteinmarker	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Raffinose	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Retikulozytenlysat	Promega, Mannheim, Deutschland
Röntgenfilm (Medical X-Ray Film)	Cronex 5, Agfa, Mortsel, Belgien
Rubidiumchlorid	Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA
Saccharose	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
Sorbitol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Sulfo-MBS	Pierce, Rockford, Illinois, USA
TEMED	Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA
TNT [®] T7/Sp6 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Tris	USB, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Zymolyase 20T	Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan

3.1.2 Geräte

Autoklaven	Sanoclav H+P Varioclav
Autoradiographie	Phosphorimager [™] : BAS-1500 Fujifilm IP-Holder for BAS 2500, Raytest, Isotopenmessgeräte Imaging Plate BAS-IP MS 2025, Fujifilm BAS Cassette2, 2025, Fujifilm Eraser, Raytest Isotopenmessgeräte
Dounce-Homogenisator	Braun, Melsungen, Deutschland
Elektrophoresekammer	ZITT-THOMA GmbH, Laborbedarf- Glasbläserei Freiburg i. Br., Deutschland
Elvehjem-Homogenisator	Kimble-Kontes, Gerresheim, Deutschland
Geltrockner	Unigeldryer 3545 D Uni Equip, Biorad Model 583 Gel Dryer
Heizblock	1102, SKS Bio Medical Instruments, LTD, Luton, Beds, England
Magnetrührer	IKAMAG RH

	IKAMAG REO
Mikrowelle	Micro-Chef FM 421, Moulinex
µMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
Netzgerät	Standard Power Pack, P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Methrom 620, Herisan, Schweiz Methrom 632, Herisan, Schweiz
Photometer	Novaspec Plus, Amersham Jasco FP-750 Spectrofluorometer, Jasco, Deutschland
Potter (Glashomogenisator)	Braun, Melsungen, Deutschland
Semidry-Apparatur (Panther)	Owl Separation System, Peqlab Biotechnologie GmbH
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort Eppendorf Thermomixer compact
Taumelschüttler	Pilot Shake System Kühner, Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
Vortexgerät	SCHNIPP THERM Schutron HAT Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Waagen	Heidolph REAX top Sartorius Basic Sartorius CP 2245 (Feinwaage)
Zentrifugen	Beckman Coulter Avanti™ J-25 Centrifuge (Rotor: JLA10.500, JA 25.50, Becher: JA10, JA20) Beckman, TL-100 Ultrazentrifuge (Rotor: TLA 120.2) Hermle ZK 630 Processor Eppendorf Centrifuge 5417 R

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von Bakterienzellen

Verwendete Bakterienzellen

E.coli XL1-Blue: Genotyp: SupE44, hsdR17, recA1, endA1, ryrA46, thi, relA11, lac⁻F⁺ [proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^r)

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Es wurden kompetente Zellen des *E.coli* Stamms XL1-Blue [138] hergestellt. 100 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{605nm} von 0,5 geschüttelt (die optische Dichte wurde gegen reines Medium als Nullwert gemessen, eine OD_{605nm} von 1 entspricht 1 x 10⁹ Bakterienzellen). Die Kultur wurde für 5 Minuten bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert, die Bakterienzellen in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 Minuten bei 0 °C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 x g und 4 °C, wonach die Zellen in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen und für weitere 15 bis 60 Minuten bei 0 °C inkubiert wurden.

Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Portionen aufgeteilt, durch kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Transformation in *E.coli*:

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA (0,1 bis 1 µg DNA) oder 10 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschritt bei 42 °C für 90 Sekunden und dem Abkühlen bei 0 °C für 2 Minuten wurde der Transformationsansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 90 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln (50 x g) inkubiert. Der Ansatz wurde danach auf selektiven LB-Platten, die 0,1 % Ampicillin zur Selektion enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Bakterienkolonien wurden in Flüssigmedium überführt und deren Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.2.2). Zur Überprüfung wurde die Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotech AG sequenziert (siehe 3.2.4).

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 1 % NaCl
TFB1-Puffer:	100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KAc, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerol, mit HCl auf pH 5,8 eingestellt
TFB2-Puffer:	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerol, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA wurden die Reagenzien des GFX™ *Micro Plasmid Prep Kit* verwendet. Bakterienkolonien wurden von LB-Agar-Platten abgenommen und in 2 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Je nach Resistenzgen des Plasmids wurde ein Antibiotikum ausgewählt, Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in Reaktionsgefäße überführt und für 1 Minute bei 5000 x g abzentrifugiert. Die Bakterienzellen wurden in 150 µl Lösung I resuspendiert, es wurden 150 µl Lösung II zugegeben, nach Zugabe von 300 µl Lösung III wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden gefällte Proteine und chromosomale DNA bei 10000 x g abzentrifugiert und der Überstand in einen Filter mit Auffanggefäß pipettiert. Es wurde für 30 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach einem Waschschrift mit 400 µl Waschpuffer, bei dem für 1 Minute bei 10000 x g zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen wurde, wurde der Filter durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 10000 x g getrocknet und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

Zur Elution der Plasmid-DNA wurde steriles Wasser auf den Filter gegeben, für 1 Minute inkubiert und danach für 2 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der im Wasser gelösten Plasmid-DNA wurde bestimmt (siehe 3.2.3) und die DNA bei -20°C aufbewahrt.

Lösung I (Suspension):	100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 400 µg/ml RnaseI
Lösung II (Lyse):	1M NaOH; 5,3 % [w/v] SDS

Lösung III Gepufferte Lösung, die Acetat und chaotrope Substanz
(Neutralisierung): enthält
Waschpuffer 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 80 % Ethanol_{absolut}
(Reinigung):

Für eine Plasmidisolierung in einem größeren Maßstab wurden die Reagenzien des *E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II* verwendet. Dieses Kit erlaubt den Einsatz von 15 ml Flüssigmedium und somit die Isolierung größerer Plasmidmengen.

3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch. Die Messung eines Absorptionswertes von 1 entspricht, bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm, einer DNA-Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml [139]. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wird folgende Formel verwendet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times F$$

c = Konzentration der DNA

E = Extinktion bei $\lambda = 260$ nm

F = Verdünnungsfaktor

3.2.4 Sequenzierung von DNA

Zu sequenzierende DNA Proben wurden aufgereinigt und deren Konzentration mittels photometrischer Messung analysiert (siehe 3.2.3). Eine Probe von 30 µl mit einer DNA Konzentration von 0,1 µg/µl wurde an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) geschickt, die die Sequenzierung durchführte.

3.2.5 Plasmide

Tab. 3.1 Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Herkunft	Proteine unter der Kontrolle dieses Plasmids
pYES2	Shuttle-Vektor: Ampicillin-Resistenzgen, <i>URA3</i> -Markergen, <i>GAL1</i> Promotor, T7-Promotor	[140]	Ngo, Nme
pGEM4	Sp6-Promotor für <i>in vitro</i> Translation vorhanden	Fa. Promega, Mannheim, Deutschland	AAC
pGEM4Z	Sp6-Promotor für <i>in vitro</i> Translation vorhanden	Fa. Promega, Mannheim, Deutschland	Nmu, DIC
pGEM11Z	T7-Promotor für <i>in vitro</i> Translation vorhanden	Fa. Promega, Mannheim, Deutschland	VDAC
UB08	Sp6-Promotor für <i>in vitro</i> Translation vorhanden	[141]	Bcl-2

3.3 Methoden der Hefegenetik

3.3.1 Verwendete Hefestämme

Tab. 3.2 Verwendete Hefestämme

Stamm:	Genotyp:	Referenz:
YPH499	MAT α , <i>ade2-101</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>lys2-801</i>	[142]
BY4742 WT Y10000	MAT α , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ</i>	Euroscarf, Frankfurt, Deutschland

PK82 (BWT)	MAT α , his-713, lys2, ura3-52, Δ trp1, leu2-3 112	[143]
CEN.PK 111-61A K39	MAT α , ura3-52 leu2-3.1/2 his 3 Δ 1 MAL2-8 ^c MAL3 SUC3 GAL	[144]
KKY 3.4 (TK5) <i>tom40-4</i>	MAT α his2- Δ 200 leu 2-3, 112 ade2- 101 suc2- Δ 9 trp1- Δ 901 ura3-52 tom40::HIS3 (pRS314-tom40-4)	[145]
KKY3.7 (TK8) WT zu <i>tom40-4</i>	MAT α his3- Δ 200 leu 2-3, 112 ade2- 101 suc2- Δ 9 trp1- Δ 901 ura3-52 tom40::HIS3 (pRS314-Tom40)	[145]
YPH-BG-FOMP1 <i>sam50-1</i> , Ts1	MAT α , ade2-101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, sam50::ADE2; pFLfomp1-Ts CEN	[102]
YPH-BG-FOMP1 WT zu <i>sam50-1</i>	MAT α , ade2101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, sam50::ADE2; pFLfomp1-Ts CEN	[102]
BY4742 Δ <i>mas37</i>	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ ; YMR060::Kan MX4	[9]
YPH499, BY4742 WT zu Δ <i>mas37</i>	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ ; YMR060::Kan MX4	[9]
OL200- α Δ <i>tom22</i>	MAT α , his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, tom22::HIS3, rho ⁻	[75]
OL222 WT zu Δ <i>tom22</i>	MAT α , his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, tom22::HIS3, rho ⁺	[75]
KNT80 Δ <i>tim8</i>	MAT α , ade2-101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, tim8::HIS3	[146]

3.3.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefestämme wurden in 15 % [v/v]-Glyzerin bei -80 °C gelagert. Aus diesen Stammkulturen wurden die Zellen auf YPG-Agarplatten ausgestrichen.

Die Anzucht von Wildtyp-Hefekulturen erfolgte bei 30 °C in YPG-Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. Einige Mutanten erforderten eine Anzucht bei 23 °C. Für die Anzucht der Hefezellen wurden 50 ml Medium mit mehreren Kolonien der entsprechenden Stammpolte angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Übernacktkultur in 400 ml Medium überimpft und ebenfalls bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Übernacktkultur wurde am darauf folgenden Tag in 1,6 l Medium ein weiteres Mal überimpft. Zur Isolierung der Wildtyp-Mitochondrien (siehe 3.4.1) wurde diese Kultur nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 30° C verwendet. Die Hefestämme befanden sich zum Zeitpunkt der Ernte in der logarithmischen Wachstumsphase.

YPG-Medium: 2,0 % Bacto-Pepton; 1,0 % Bacto-Hefeextrakt; 3,0 % Glycerin; pH 4,8-5,0 mit HCl_{konz.} eingestellt

YPG-Agarplatten: 2 % [w/v] Agar in YPG-Medium

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Mitochondrienisolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden wie in 3.3.2 beschrieben kultiviert und die Mitochondrien anschließend nach einer optimierten Methode von Daum [147] durch differentielle Zentrifugation isoliert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1100 x g, für 10 Minuten bei 4 °C isoliert und das Pellet mit H₂O_{dd} gewaschen. Es wurde das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und diese in 2 ml/g Zellen DTT-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, die Hefen reisoliert und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen (je 5 Minuten, 2000 x g, 4 °C). Für den enzymatischen Aufschluss der Zellwände (Bildung von Sphäroplasten) wurden die Zellen in 7 ml Zymolyasepuffer/g Zellen resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 mg/g Zellen Zymolyase für 60 Minuten bei 30 °C geschüttelt. Die Sphäroplastenbildung konnte durch osmotische Lyse getestet werden. Dazu wurde vor und nach der Lyse jeweils eine Probe von 10 µl Zellsuspension mit 1 ml H₂O_{dd} gemischt und die OD₆₀₀ bestimmt. Ideal war eine Abnahme der

optischen Dichte auf ein Drittel des OD-Wertes vor der Lyse. War die Abnahme geringer, konnte die Suspension für weitere 15 Minuten bei 30 °C inkubiert werden, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert wurden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Nach einem Waschschrift in 1,2 M Sorbitol und erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 2000 x g, 4 °C) wurden die Sphäroplasten in 7 ml/g Zellen Homogenisierungspuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Dounce-Homogenisator, indem 30 ml-Portionen mit 1 mM PMSF durch 15 Stöße mit einem angepassten Teflon-Stempel homogenisiert wurden. Die Portionen wurden in einem Zentrifugenbecher vereinigt und über 2 Zentrifugationsschritte (5 Minuten, 4 °C , 800 x g und anschließend 1500 x g) von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde weiter verwendet, durch Zentrifugation bei 10000 x g wurden die Mitochondrien im Niederschlag gewonnen. Diese wurden in 5-10 ml SEM aufgenommen, 1 mM PMSF zugegeben, durch Zentrifugation für 5 Minuten, 2000 x g, 4 °C in SEM gewaschen und durch Zentrifugation für 10 Minuten, 10000 x g isoliert. Die Mitochondrien im Niederschlag wurden in 100-200 µl SEM resuspendiert. Die Konzentration der mitochondrialen Proteine wurde mittels Proteinbestimmung nach BRADFORD (siehe 3.5.1) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde schließlich mit SEM auf 10 mg/ml eingestellt. Die Intaktheit der Mitochondrien wurde vor deren Einsatz durch die Messung des Membranpotentials (siehe 3.4.5) überprüft. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

DTT-Puffer:	0,1 M Tris; 10 mM DTT-Stocklösung; pH 9,4 mit H ₂ SO ₄ eingestellt
DTT-Stock :	1 M DTT
Sorbitollösung:	1,2 M Sorbitol
PMSF:	200 mM in Ethanol
SEM-Puffer :	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt
Zymolyase-Puffer:	1,2 M Sorbitol; 20 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit HCl eingestellt
Homogenisierungspuffer:	0,6 M Sorbitol; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4 mit HCl eingestellt; 0,2 % BSA; 1 mM PMSF

3.4.2 Mitochondrienisolierung aus Rattenleber

Frisch entnommenes Lebergewebe einer Ratte (Gewicht der Ratte: 90-150 g) wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in 100-200 ml eiskaltem Puffer A mehrmals gewaschen. Die Leberstücke wurden in einen Potter (Glashomogenisator) gegeben, mit Puffer A auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 1 mM PMSF mit einem gekühlten Teflonpistill auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde die Homogenisierung in einem Volumen von 15 ml wiederholt und durch Zentrifugation bei 500 x g, 4 °C für 10 Minuten das Homogenisat von Zelltrümmern und Zellkernen befreit. Der Überstand wurde für 5 Minuten, 12000 x g, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in Puffer A aufgenommen. Pro 6 ml Suspension wurden 1,4 ml Percoll (20 % [v/v]) zugegeben und nach 10 Minuten bei 17500 x g, 4 °C erhielt man die Mitochondrien im Niederschlag. Diese wurden in einem kleinen Rest des Überstands resuspendiert und erneut in Puffer A gewaschen (5 Minuten, 12000 x g, 4 °C). Die gereinigten Mitochondrien wurden in 0,5 ml Puffer A aufgenommen. Es erfolgte eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (siehe 3.5.1), wonach die Mitochondrien sofort für *in vitro* Importexperimente eingesetzt werden konnten.

Puffer A: 300 mM Saccharose; 10 mM Tris/HCl; 2 mM EGTA; pH 7,2 mit HCl eingestellt

PMSF: 200 mM in Ethanol_{abs}

3.4.3 Mitochondrienisolierung aus Jurkat-Zellen

Ein Zellpellet der Jurkat-Zelllinie wurde aufgetaut, in Kultur genommen und bis zu einer Anzahl von $0,5-3 \times 10^8$ Zellen bei 37 °C im Brutschrank mit 5,5 % CO₂ wachsen gelassen. Die Zellen wurden zunächst in eiskaltem PBS und anschließend in MB-Puffer gewaschen (je 10 Minuten, 400 x g, 4 °C). Sie wurden zum Quellen in 4 ml MB-Puffer aufgenommen, für 25 Minuten auf Eis inkubiert und in einem Elvehjem-Homogenisator mit 1 mM PMSF aufgeschlossen (40 Stöße). Nach Entfernen der Zelltrümmer (1 Minute, 4000 x g, 4 °C) wurden die Mitochondrien sedimentiert (10 Minuten, 15000 x g, 4 °C). Die so geernteten Mitochondrien wurden über einen Saccharose-

Stufengradienten (siehe 3.4.4) angereichert.

Jurkat-Zellen:	Humane Leukämie T-Zellen [148] [149] [150]
Medium für Jurkat-Anzucht:	RPMI 1640 Medium (1 x), L-Glutamin, Antibiotika (Penicillin + Streptomycin) + 10 % Fetales Kälber Serum
PBS:	1,5 M NaCl; 0,03 M KCl; 0,015 M KH_2PO_4 ; 0,08 M Na_2HPO_4 ; pH 7,4
MB:	400 mM Saccharose; 50 mM Tris; 1 mM EGTA; 5 mM D-Mercaptoethanol; 0,2 % BSA; 10 mM KH_2PO_4 ; pH 7,6
PMSF:	200 mM in Ethanol _{abs}

3.4.4 Saccharose-Stufengradient zur Anreicherung von Mitochondrien

Durch differentielle Zentrifugation erhaltene Mitochondrien wurden in 2 ml MSM-Puffer resuspendiert und in einem Ultrazentrifugen-Gefäß auf einen 2-Stufen-Saccharosegradienten aufgetragen. Der Gradient setzte sich aus 3 ml SA-Puffer und 3 ml SB-Puffer zusammen, auf die die Mitochondrien in MSM-Puffer geschichtet wurden. Nach der Ultrazentrifugation für 1 Stunde, 72000 x g, 4 °C sammelten sich intakte Mitochondrien in der Interphase zwischen SA- und SB-Puffer, nicht intakte Mitochondrien befanden sich an der Oberfläche. Die intakten Mitochondrien wurden entnommen, mit dem 4-fachen Volumen an MSM gewaschen (10 Minuten, 45000 x g, 4 °C) und schließlich in 100 µl SEM aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mit der Proteinbestimmung nach BRADFORD (3.5.1) ermittelt.

MSM:	10 mM KH_2PO_4 ; 0,3 mM Mannitol; 0,1 % BSA; pH 7,2
SA-Puffer:	1,6 M Saccharose; 10 mM KH_2PO_4 ; 0,1 % BSA; pH 7,5
SB-Puffer:	1,2 M Saccharose; 10 mM KH_2PO_4 ; 0,1 % BSA; pH 7,5
SEM-Puffer:	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt

3.4.5 Bestimmung des Membranpotentials der Mitochondrien

Das Membranpotential der Mitochondrien konnte qualitativ über den Fluoreszenzfarbstoff DiSC₃ fluorimetrisch ermittelt werden und wurde mit Hilfe des Programms „Spectra Manager“ (Version 1.18.04, Build 1) als Kurvenverlauf der Fluoreszenz sichtbar gemacht. Hierzu wurden 3 ml Phosphatpuffer in eine Küvette gegeben und bei 25 °C (Raumtemperatur) einige Minuten temperiert. Das Fluoreszenzspektrometer wurde eingestellt auf eine Extinktion von 622 nm, eine Emission von 670 nm, eine Bandbreite von 5 nm und eine Aufnahmedauer von 1 Sekunde. Die Messung wurde gestartet; 2 µM DiSC₃ wurden zum Phosphatpuffer zugegeben und gemischt. Anschließend wurden 100 µg der zu messenden Mitochondriensuspension dazu gegeben und die Abnahme der Fluoreszenz anhand des Kurvenverlaufs beobachtet. Sobald keine weitere Abnahme zu sehen war, wurde 1 mM KCN in die Küvette pipettiert und dadurch das Membranpotential über die mitochondriale Innenmembran zerstört. Der Anstieg der Fluoreszenz nach der Zerstörung des Membranpotentials war ein Maß für die Höhe des Membranpotentials. Wenn die Ab- und Zunahme der Fluoreszenz nur unzureichend zu erkennen war, wurden größere Mitochondrienmengen verwendet, bei zu stark gequenchter (gelöschter) Fluoreszenz wurden weniger Mitochondrien eingesetzt.

Phosphatpuffer: 0,6 M Sorbitol; 0,1 % BSA; 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 0,5 mM EDTA; 20 mM KH₂PO₄

DiSC₃: 2 mM in DMSO

KCN: 1 M in H₂O

3.4.6 Proteinase K Sensitivitätstest

Um festzustellen, wie viel Proteinase K (PK) notwendig ist, um die nicht in die Mitochondrien importierten Proteine nach dem Stoppen der *in vitro* Importreaktion (siehe 3.4.10) vollständig abzubauen, wurde eine Titration von Proteinase K unter Zugabe einer konstanten Menge an ³⁵S-markiertem Protein durchgeführt. Die Proteinase K-Sensitivitätsmessung ohne Importreaktion wurde in einem Ansatz von 25 µl SEM-Puffer durchgeführt. Unterschiedliche Konzentrationen an Proteinase K (0 bis 250 µg/ml) wurden mit jeweils 1,5 µl

Lysat für 10 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 4 mM PMSF wurde der Verdau der Proteinase gestoppt und die Ansätze mit 15 µl Laemmli-Puffer versetzt. Bei Proteinase K-Sensitivitätsmessungen im Importansatz (siehe 3.4.10) wurde der Sensitivitätstest entweder in einem Volumen von 50 µl oder von 25 µl durchgeführt. Zu beiden Ansatzvolumina wurden 2 µl Lysat zugegeben; entsprechend dem Gesamtvolumen enthielten die Ansätze 30 µg oder 15 µg Mitochondrien. Die Importreaktion wurde nach 3.4.10 durchgeführt. Die Endkonzentrationen an PK wurden entsprechend den Ansätzen in SEM gewählt. Die Ansätze wurden anschließend ebenfalls in 15 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und alle Proben 5 Minuten geschüttelt und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach Auftragen auf ein SDS-Gel (siehe 3.5.3) konnte dieses getrocknet, exponiert und anschließend autoradiographisch ausgewertet werden.

Laemmli- 2 % SDS [w/v]; 10 % Glycerin [v/v]; 60 mM Tris/HCl (pH 6,8);
Puffer: 0,02 % Bromphenolblau [w/v]; 5 % D-Mercaptoethanol [v/v];
 komplementiert mit 0,2 % 1 M DTT

3.4.7 Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran

Um die submitochondriale Lokalisierung importierter Proteine *in vitro* zu untersuchen, wurde die mitochondriale Außenmembran selektiv durch osmotisches Schwellen disruptiert. Die Proteine wurden, wie in 3.4.10 beschrieben, in Mitochondrien importiert; der Schwellvorgang wurde durch Mischen des Importansatzes im Verhältnis 1:5 bis 1:10 mit EM-Puffer, bzw. SEM-Puffer als Negativkontrolle und Überführen der Ansätze auf Eis gestartet. Nach Inkubation für 10 Minuten auf Eis wurde den Mitoplasten Proteinase K zugegeben, um die im Intermembranraum zugänglichen Proteine zu verdauen und durch 4 mM PMSF nach 10 Minuten die Reaktion gestoppt. Die Mitoplasten wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten, 23000 x g, 4 °C gewonnen, in 100 µl SEM gewaschen (10 Minuten, 23000 x g, 4 °C) und mit 20 µl Laemmli-Puffer versetzt. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE (siehe 3.5.3) und Transfer auf Nitrozellulosemembran (siehe 3.5.6) wurde die Disruption der äußeren und die Integrität der inneren Membran überprüft. Hierfür wurden Western-Blot-Analysen (siehe 3.6.1) mit Antikörpern gegen Tim23 (Innenmembranprotein) und Mge1 (Matrixprotein) durchgeführt.

SEM-Puffer: 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt

EM-Puffer: 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt

3.4.8 Trypsinbehandlung der Mitochondrien

70 µl Mitochondrien in einer Konzentration von 10 mg/ml wurden auf Eis aufgetaut und mit 310 µl SEM vermischt. Der Ansatz wurde aufgeteilt in 2 x 180 µl; dem einen dieser Ansätze wurde 0,1 mg/ml Trypsin und dem anderen im gleichen Volumen SEM zugegeben. Die beiden Ansätze wurden für 15 Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 20 mg/ml Trypsin-Inhibitor folgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten, 23000 x g, 4 °C reisoliert und in je 30 µl SEM resuspendiert (Konzentration: 10 mg/ml wiederhergestellt). Die so behandelten Mitochondrien wurden anschließend für *in vitro* Importexperimente (siehe 3.4.10) eingesetzt. Zum normalen Importansatz wurden nochmals 0,5 mg/ml Trypsin-Inhibitor zugegeben.

Trypsin: 1 mg/ml in SEM

SEM-Puffer: 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA;
10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH
eingestellt

3.4.9 *In vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine

Die Proteine wurden *in vitro* in einer gekoppelten Transkriptions-/Translations-Reaktion synthetisiert und dabei mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Hierfür wurden die Reagenzien des Translationssystems TNT[®] T7 bzw. Sp6 *Coupled Reticulocyte Lysate* System verwendet. Die gewünschten Sequenzen waren in Plasmide kloniert, in denen die Sequenz unter der Kontrolle des T7- bzw. Sp6-Promotors transkribiert wurde. Die Translation erfolgte im gleichen Ansatz in Kaninchen-Retikulozytenlysat [151]. Ein Standardansatz von 50 µl enthielt 25 µl TNT[®]-Kaninchen-Retikulozytenlysat, 2 µl TNT[®]-Reaktionspuffer, 1 µl TNT[®] T7- bzw. Sp6-Polymerase, 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin, 2 µl ³⁵S-Methionin, 1 µl RNase-Inhibitor, Plasmid-DNA in einer Konzentration von 1 µg und ein

entsprechendes Volumen nukleasefreies H₂O, um den Ansatz auf 50 µl aufzufüllen. Der Ansatz wurde für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert und konnte anschließend direkt verwendet oder bis zum Einsatz bei -80 °C gelagert werden.

3.4.10 *In vitro* Import radioaktiv markierter Proteine in Mitochondrien

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit ³⁵S radioaktiv markiert und *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert. Der Standardimportansatz für den Import von VDAC, DIC und AAC umfasste 50 µl und enthielt 2 mM ATP, 2 mM NADH bzw. Na-Succinat bei Mitochondrien aus humanen Zelllinien, K_p-Puffer und P80-Puffer bzw. P0- und P1600-Puffer, mit denen die KCl-Konzentration auf 80 mM eingestellt werden konnte. Es wurden 10 bis 80 µg Mitochondrien eingesetzt. Bei temperatursensitiven Mutanten musste zunächst der Phänotyp induziert werden; hierzu wurden die Mitochondrien vor ihrem Einsatz für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zur Optimierung der Importeffizienz der bakteriellen Porine wurde der Importansatz optimiert. Die Konzentrationen an Saccharose und EDTA wurden angepasst und zusätzliches Retikulozytenlysat in den Importansatz gegeben. Der Importansatz wurde nach der Optimierung auf ein Volumen von 25 µl reduziert, die Konzentrationen der Komponenten im Standardimportansatz wurden beibehalten. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei 25 °C vorinkubiert, anschließend wurden 2 bis 8 % [v/v] radioaktives Protein in Retikulozytenlysat zum Importansatz zugegeben und somit die Importreaktion gestartet. Bei einer Säureaktivierung des Vorstufenproteins wurde das Lysat vor der Zugabe für 10 Minuten bei 20 °C mit 25 mM HCl inkubiert. Die Importreaktion wurde im normalen Ansatz nach definierten Zeiten mit Proteinase K (bis 250 µg/ml) und Überführen der Ansätze auf Eis gestoppt. Bei der optimierten Importreaktion wurde die Anbindung der Proteine an Mitochondrien durch Überführen auf Eis und Zugabe von S₅₀₀EM-Puffer gestoppt. Nach Reisolierung der Mitochondrien (10 Minuten, 23000 x g, 4 °C) wurden diese in SM-Puffer resuspendiert und mit 1 mM ATP und 5 mM MgCl₂ wurde die Importreaktion der assoziierten Proteine bei 25 °C gestartet. Anschließend wurde die Importreaktion auch hier nach

definierten Zeiten mit Proteinase K und Überführen der Ansätze aus Eis gestoppt. 10 bis 30 Minuten nach Zugabe der Proteinase K, wurde die Proteolyse durch 4 mM PMSF beendet. Die Mitochondrien wurden abzentrifugiert, in 100 µl SEM gewaschen (10 Minuten, 23000 x g, 4 °C) und sofern keine weiteren Versuche durchgeführt werden sollten, wurden sie in Laemmli-Puffer aufgenommen, geschüttelt, gekocht und durch SDS-PAGE (siehe 3.5.3) analysiert.

P0/80/1600-Sigma-Puffer:	250 mM Saccharose; 10 mM Mops; 0/80/1600 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 3 % [w/v] BSA
ATP:	0,2 M ATP (Dinatriumsalz) in H ₂ O; 5M KOH
NADH:	0,1 M NADH in H ₂ O
Natrium-Succinat:	2,5 M Na-Succinat in H ₂ O
PMSF:	200 mM PMSF in Ethanol _{abs}
Kp _i -Puffer:	1 M K ₂ HPO ₄ ; pH 7,5 mit 1 M KH ₂ PO ₄ eingestellt
SEM-Puffer:	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt
S ₅₀₀ EM-Puffer:	500 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt
SM-Puffer:	250 mM Saccharose; 10 mM Mops; pH 7,2 mit KOH eingestellt
Retikulozytenlysat:	aus dem TNT [®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, Firma Promega (Mannheim, Deutschland)

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um Proteinmengen im Bereich von 1-10 µg quantitativ zu bestimmen, wurde die Methode nach BRADFORD [152] angewendet. Für die kalorimetrische Messung bei einer Absorption von 595 nm wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 eingesetzt. Für die Eichgerade wurden 0, 3, 5, 10 und 15 µl einer BSA-Standardlösung in Halbmikroküvetten pipettiert, mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und deren Absorption bei 595 nm bestimmt. Ebenso wie mit

der Eichgeraden wurde auch mit den Proben verfahren. 3 x 10 µl und 3 x 20 µl der Proben wurden in Küvetten mit 1 ml Reagenz vermischt und photometrisch gemessen. Die Mittelwerte der Extinktion für die 10 µl und 20 µl Proben wurden mit der Eichgeraden verglichen und es konnte somit die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Bradford-Reagenz: 4 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue G250; 50% [v/v] Ethanol; 85% [v/v] H₃PO₄; vor Gebrauch: vierfaches Volumen H₂O zugegeben und filtriert

3.5.2 Protein-Fällung mit Trichloressigsäure

Zur Fällung von Proteinen wurden die Proben mit 10 % [v/v] eiskalter Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation (15 Minuten, 23000 x g, 2 °C) sedimentiert und zweimal mit Aceton gewaschen. Die Proteine wurden in einem Zehntel des Ausgangsvolumens 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 Minuten bei 25 °C geschüttelt und anschließend 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proben konnten auf ein SDS-Gel (siehe 3.5.3) aufgetragen oder bis zum Auftragen bei -20 °C eingefroren werden.

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt [153]. Glasplatten von 16 x 18 cm wurden mit Ethanol gereinigt und mit Abstandshaltern von 1 mm Dicke und 10 mm Breite vertikal in einem Gelschuh aufgestellt. Zum Gießen wurde das Gel mit Bodengel abgedichtet, zwischen die Glasplatten wurde nacheinander Trenn- und Sammelgel gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, welches vor dem Gießen des Sammelgels entfernt werden musste. In die Sammelgellösung wurde ein Kamm eingesetzt, der nach der Polymerisierung vorsichtig entfernt wurde. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und der Anoden- und Kathodenbehälter mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben in Laemmli-Puffer wurden zusammen mit einem Proteinmarker (Abb. 3.1) mittels einer Hamiltonspritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA für 1½ bis

2 Stunden. Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt (siehe 3.5.4) oder auf Nitrozellulose transferiert (siehe 3.5.6).



Abb. 3.1: Proteinmarker der Firma Fermentas

(entnommen aus dem Fermentas Online-Katalog 2006)

Trenngelpuffer (5 x):	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
Sammelgelpuffer (5 x):	0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
SDS:	10 % SDS [w/v] in H ₂ O _{dd}
Elektrophoresepuffer:	0,2 M Glycin; 0,1 % SDS [w/v]; 0,025 M Tris
Bodengel (20 %):	20 % Acrylamid [v/v]; 11 % H ₂ O [v/v]; 20 % Trenngelpuffer [v/v]; 0,01 % SDS [w/v]; 0,1 % APS-Lösung [v/v]; 0,2 % TEMED [v/v]
Trenngel (15%):	15 % Acrylamid [v/v]; 28 % H ₂ O [v/v]; 21 % Trenngelpuffer [v/v]; 1 % SDS [w/v]; 0,6 % APS-Lösung [v/v]; 0,1 % TEMED [v/v]
Sammelgel (5 %):	5 % Acrylamid [v/v]; 71 % H ₂ O [v/v]; 10 % Sammelgelpuffer [v/v]; 0,1 % SDS [v/v]; 1 % APS-Lösung [v/v], 0,2 % TEMED [v/v]
Laemmli-Puffer [153]:	2 % SDS; 10 % Glycerin; 60 mM Tris/HCl; pH 6,8; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % Mercaptoethanol
APS-Lösung:	1 % Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O _{dd}

3.5.4 Färbung mit Coomassie Blau

Nach der SDS-PAGE (siehe 3.5.3) wurden Boden- und Sammelgel entfernt und das Trenngel in einer mit Färbelösung befüllten Schale für 1 Minute in der Mikrowelle erhitzt. Die Färbelösung wurde gegen Entfärbelösung ausgewechselt und nach erneuter Erhitzung für 1 Minute in der Mikrowelle für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Entfärbelösung wurde gegebenenfalls erneuert, das Gel konnte anschließend getrocknet (siehe 3.5.5) und mittels Autoradiographie (siehe 3.5.7) ausgewertet werden.

Färbelösung: 30 % [v/v] Methanol; 10 % [v/v] Eisessig; 0,125 % [w/v] Coomassie-Brilliant Blau G-250

Entfärbelösung: 30 % [v/v] Methanol; 10 % [v/v] Eisessig

3.5.5 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-gefärbten Gele wurden auf Chromatographie-Papier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und im Geltrockner bei 65 °C für 90 Minuten unter Vakuum getrocknet.

3.5.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem „Semidry“-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [154]. In Blot-Puffer getränkte Chromatographiepapiere wurden auf der unteren Graphitelektrode (Anode) der Semidry-Apparatur (Panther) übereinander geschichtet. Das Gel wurde auf dem getränkten Filterpapier und die Nitrozellulosemembran auf dem SDS-Gel platziert. Mit zwei weiteren Chromatographiepapieren und der oberen Graphitelektrode (Kathode) wurde der Blotsandwich abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte für 90 Minuten bei 2 mA/cm². Die Membran wurde für 1 Minute in Ponceau-S-Lösung gefärbt und mit deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran entweder bei Raumtemperatur getrocknet oder direkt für eine Antikörperreaktion (siehe 3.6.1) vorbereitet.

Blot-Puffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0,02 % SDS [w/v]; 20 %
Methanol_{techn.} [v/v]

Ponceau S-Lösung: 3 % TCA [w/v]; 0,3 % Ponceau S [w/v]

3.5.7 Autoradiographie von Polyacrylamidgelen und Membranen

Radioaktiv markierte Proteine auf SDS-Gelen bzw. Nitrozellulose-Membranen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele bzw. Membranen getrocknet (siehe 3.5.5) und ein strahlungssensibler Nachweisschirm für 1-3 Tage aufgelegt. Die Signalintensitäten wurden über laserinduzierte Phosphoreszenz durch den PhosphorimagerTM und das Computerprogramm *BASReader* (Version 2.11, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgelesen und die Banden densitometrisch mit *Aida* (Version 2.01, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgewertet. Nach der Quantifizierung konnten mehrere Ergebnisse über Bildung des Mittelwerts und Standardabweichung (Microsoft Excel) zusammengefasst werden.

3.5.8 Quervernetzung von Proteinen nach *in vitro* Import in Mitochondrien

Zur chemischen Quervernetzung wurden in dieser Arbeit MBS, Sulfo-MBS (n-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), DSS (Disuccinimidyl suberate) und EGS (Ethylene glycol *bis* [succinimidylsuccinate]) verwendet. Nach dem Import von ³⁵S-markierten Proteinen in Mitochondrien (siehe 3.4.10), wobei Lysat im Überschuss zugegeben wurde (bis zu 50 % [v/v]), wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 23000 x g für 10 Minuten, 4 °C reisoliert und in HS-Puffer in einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml resuspendiert. Zu den Ansätzen wurde 1 mM Quervernetzer bzw. zur Kontrollprobe nur DMSO zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 0,1 M Glycin gestoppt und die Proben für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 23000 x g und 4 °C reisoliert und in HS-Puffer gewaschen. Zur Analyse mit SDS-PAGE (siehe 3.5.3) wurden sie in 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen, für die Coimmunfällung (siehe 3.6.3) wurden die Mitochondrien in Lysepuffer aufgenommen und weiter bearbeitet.

MBS/DSS/EGS:	je 200 mM in DMSO
Sulfo-MBS:	200 mM in HS-Puffer
Glycin:	1 M, pH 8
HS-Puffer:	0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH; pH 7,4

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Immunologischer Antigen-Nachweis nach Western-Blot

Die Membran wurde für den immunologischen Antigennachweis 2 bis 4 Stunden in 40 ml TBS/MP bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 5 Minuten mit 40 ml TBS gewaschen. Der Erstantikörper wurde in TBS verdünnt (Mge1-AK 1:1000, Tim23-AK 1:5000, PorB-Ngo-AK 1:10000) und die Membran entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 6 x 5 Minuten mit 40 ml TBS gewaschen und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach Waschen der Membran für 6 x 5 Minuten mit 40 ml TBS konnten die Proteinbanden durch Belichtung in einer Lumineszenzreaktion (siehe 3.6.2) sichtbar gemacht werden.

TBS-Puffer: 10 mM Tris; 0,9 % NaCl

TBS/MP: 5 % Magermilchpulver in TBS gelöst

3.6.2 Verstärkte Chemilumineszenzbestimmung

Bei dieser Reaktion („*enhanced chemiluminescence (ECL) detection*“) wurden die Reagenzien des ECL-Kits verwendet. Die Nitrocellulosemembran wurde in einer 1:1-Mischung der ECL-Lösungen für 5 Minuten geschwenkt. Danach wurde für 10 Minuten ein für Blaulicht empfindlicher Film auf die Membran gelegt und belichtet. Nach der Entwicklung mit Hilfe einer Entwickler- und Fixierlösung konnten die antikörpergebundenen Proteine detektiert werden.

3.6.3 Coimmunfällung nach Quervernetzung

Zur Vorbereitung wurde ein *in vitro* Import nach 3.4.10 durchgeführt, es wurden jedoch 30 µg Mitochondrien und 24 µl ³⁵S-markiertes Protein pro 50 µl Reaktionsgemisch eingesetzt. Die Proben wurden anschließend nach 3.5.8 chemisch quervernetzt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Quervernetzung wurden die Proben nicht in Probenpuffer, sondern in 60 µl Lysepuffer resuspendiert, dem zusätzlich 1 mM PMSF zugegeben wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 3 Minuten auf 95 °C gestellt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. 1,14 ml Waschpuffer, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF wurden zugegeben und für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und mit 8 µl AK-Lösung oder Präimmenserum als Kontrolle vermischt. Zudem wurden 100 µl µMACS Protein A Microbeads zu jeder Probe zugegeben und die Reaktionsansätze für 45 Minuten auf Eis inkubiert, wobei sie gelegentlich durchmischt wurden. Die MACS Separation Columns wurden in die dazu gehörige µMACS Separation Unit gestellt und mit 200 µl Waschpuffer benetzt. Die Proben wurden nach der Inkubation vollständig in die Columns gegeben (Durchfluss) und 4-mal mit 200 µl Waschpuffer (Waschfraktion) gewaschen. Eluiert wurden die Proben durch Zugabe von 20 µl erhitztem Laemmli-Puffer, Inkubation für 5 Minuten und anschließender Zugabe von 60 µl SDS-Probenpuffer (Eluat 1). Für eine zweite Elution wurde dieser Vorgang wiederholt (Eluat 2). Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt, 5 Minuten gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

HS-Puffer:	0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes; pH 7,4 mit KOH eingestellt
Lysepuffer (Endres):	1 % SDS; 100 mM Tris ; pH 7,4 mit HCl eingestellt
Waschpuffer (Endres):	0,5 % Triton X-10 in 1-fach TBS-Puffer [v/v]
TBS-Puffer (10-fach):	10 mM Tris; 0,9 % NaCl [w/v]

4. ERGEBNISSE

4.1 *In vitro* Proteinimport von PorB-Ngo und VDAC in Mitochondrien

Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass verschiedene Bakterien Toxine oder andere Effektorproteine an Wirtszellen abgeben, die zu den Mitochondrien der Zelle transportiert werden und dann eine Apoptose auslösen [57]. Ein derartiges Effektorprotein ist das Hauptaußenmembranprotein PorB von *Neisseria gonorrhoeae* (PorB-Ngo). Um die Wechselwirkungen des PorB-Ngo mit Mitochondrien näher untersuchen zu können, wurde zunächst nach geeigneten Bedingungen für ein *in vitro* System gesucht. In den Experimenten zum mitochondrialen Import des PorB-Ngo und bei der anschließenden Charakterisierung der beteiligten Mechanismen wurde zum Vergleich das endogene mitochondriale β -barrel-Protein VDAC (*voltage dependant anion channel*) in die Untersuchungen mit einbezogen. Beim VDAC handelt es sich um ein mitochondriales Porin, das zu den Porinen der pathogenen Neisserien auffällige strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zeigt [1].

2.4.4 *In vitro* Transkription und Translation von PorB-Ngo und VDAC

Für den *in vitro* Import von Proteinen in isolierte Mitochondrien existiert seit vielen Jahren ein standardisiertes Verfahren. Zu Beginn der Studie war es deshalb nahe liegend, dieses Verfahren auch zum Import des PorB-Ngo zu nutzen. Zu diesem Zweck mussten die Proteine zunächst in einer gekoppelten Transkriptions- und Translationsreaktion synthetisiert werden. Die benötigten DNA-Fragmente, codierend für PorB-Ngo bzw. VDAC, standen jeweils in pYES2-Vektoren unter der Kontrolle des T7-Promotors zur Verfügung. Unter Verwendung der Reagenzien des TNT® T7 *Coupled Reticulocyte Lysate* Systems der Firma Promega wurden die Proteine in Kaninchen-Retikulozytenlysat synthetisiert und dabei mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (siehe 3.4.9). Zur Überprüfung der Reaktion wurden 2 μl der jeweiligen Reaktionsansätze mit 20 μl Laemmli-Probenpuffer verdünnt, auf 95°C erhitzt und auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel getrocknet, exponiert und autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.1).

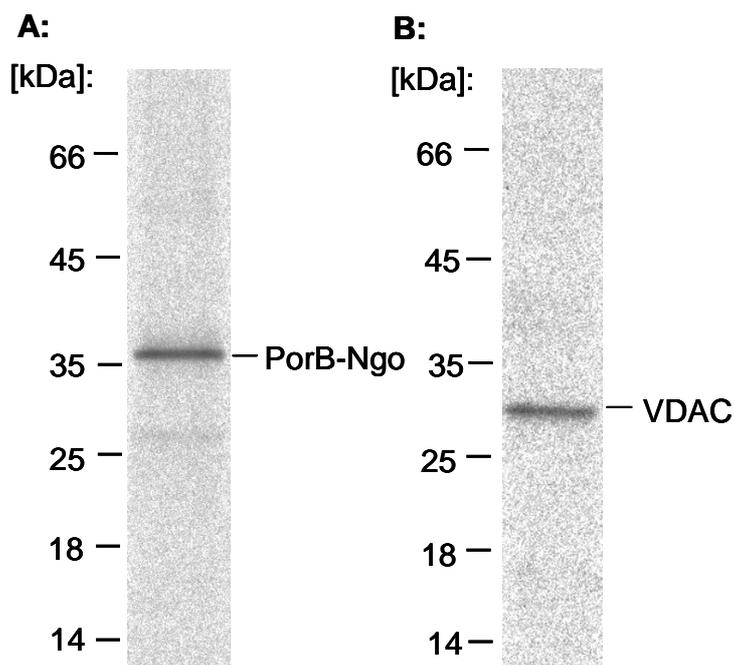


Abb. 4.1: Proteinsynthese von PorB-Ngo (A) und VDAC (B) in Kaninchen-Retikulozytenlysat

Die Proteine wurden mithilfe des TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems der Firma Promega in Kaninchen-Retikulozytenlysat synthetisiert und 2 µl LySAT auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das radioaktive Signal der mit ³⁵S-Methionin markierten Proteine PorB-Ngo und VDAC wurde durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht.

Im Vergleich mit den verwendeten Markerproteinen zeigte das PorB-Ngo in den SDS-Polyacrylamidgelen eine molare Masse von etwa 36 kDa. Dieser Wert liegt nur geringfügig über der ausgehend von der Aminosäuresequenz errechneten molaren Masse von 34 kDa. Das Laufverhalten des VDAC entsprach recht genau dem errechneten Wert von 30,5 kDa.

2.4.5 *In vitro* Import von VDAC in Wildtypmitochondrien

Für den Standardimport von Proteinen in Mitochondrien ist es wichtig, dass die Proteine im Reaktionsansatz löslich sind. Weiterhin ist deren Protease-Sensitivität entscheidend, da im Anschluss an die Importreaktion stets eine Protease zugesetzt wird, um im Testansatz alle Vorstufenproteine abzubauen, die nicht importiert wurden. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann durch Reisolierung der Mitochondrien und Quantifizierung der aufgenommenen

Proteine die Effizienz bestimmt werden, mit der die Proteine in die Mitochondrien importiert wurden. Für das endogene mitochondriale Protein VDAC ist aus früheren Studien bekannt, dass es sehr effizient sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Mitochondrien importiert werden kann [27]. Da es ein authentisches mitochondriales Protein ist, das in β -barrel Struktur vorliegt, ist es sehr interessant dieses Protein im Vergleich zum bakteriellen Effektorprotein PorB-Ngo zu untersuchen, das ebenfalls β -barrel Struktur aufweist.

Die Importreaktion des VDAC wurde nach dem Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) durchgeführt. Das Protein wurde in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in Retikulozytenlysat synthetisiert und 2 μl des Lysats wurden in einem 50 μl Reaktionsansatz bei 25 °C mit isolierten Hefemitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien waren aus dem Stamm YPH499 isoliert worden, der Reaktionsansatz enthielt 30 μg mitochondriales Protein. Die Proben enthielten zudem P80-Puffer, 2 mM NADH, 1 mM ATP und 20 mM Kaliumphosphat. Nach bestimmten Zeiten wurde die Importreaktion durch Zugabe von Proteinase K (PK) gestoppt. Die Protease baut nicht importiertes Protein ab. Importiertes Protein hingegen ist in den Mitochondrien vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt. Da die Protease bei zu lang andauernder Inkubation auch die Mitochondrien angreift, muss die Reaktion durch Zugabe von PMSF, ein Serinprotease-Hemmer, nach 10 Minuten inaktiviert werden. Die Mitochondrien wurden nach einem Waschschrift reisoliert und parallel zu einer Probe von 2 μl Lysat auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Auswertung der Proteinbanden wurde deren Signalintensität im Verhältnis zur Lysatprobe (100%) berechnet (Abb. 4.2).

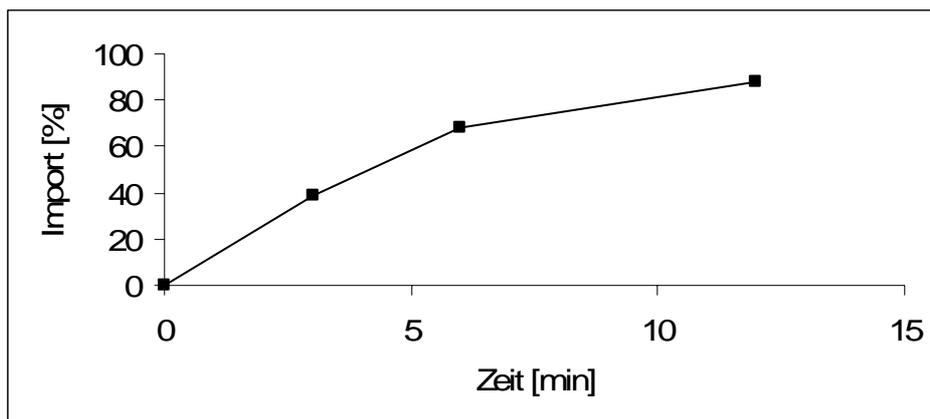


Abb. 4.2: Quantifizierung des *in vitro* Imports von VDAC in Hefemitochondrien

³⁵S-markierter VDAC wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert. 2 μ l des Retikulozytenlysats wurden anschließend bei 25 °C in Ansätzen von jeweils 50 μ l mit isolierten Hefemitochondrien inkubiert. Nach je 3, 6 und 12 Minuten wurde die Importreaktion mit 150 μ g/ml PK gestoppt. Die Proben wurden parallel zu 2 μ l Lysat auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die VDAC-Banden wurden unter Verwendung eines Phosphorimagers quantifiziert und die Importeffizienz wurde in Bezug auf die Lysatprobe (100 %) errechnet.

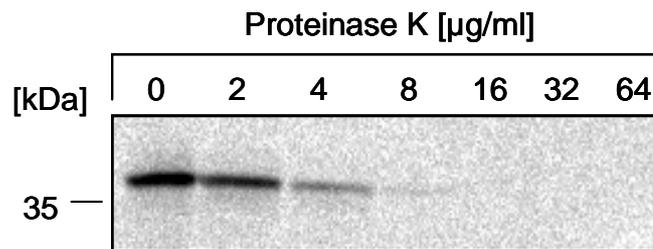
Nach dem Standardimportprotokoll ließ sich der VDAC sehr effizient in Hefemitochondrien importieren. Nach einer Importreaktion von 12 Minuten bei 25 °C konnten 88 % des eingesetzten Proteins in den Mitochondrien detektiert werden. Anhand der Kinetik konnte die Geschwindigkeit des Proteinimports beurteilt werden. Die Importreaktion lief in den ersten Minuten sehr schnell ab. Bereits nach 6 Minuten waren $\frac{3}{4}$ des eingesetzten radioaktiv markierten VDAC in den Mitochondrien zu lokalisieren. Der Kurvenverlauf weist darauf hin, dass die Importreaktion letztlich durch die Menge an verfügbarem VDAC begrenzt wurde. Offenbar war nahezu das gesamte radioaktiv markierte Protein importkompetent.

Unter Verwendung des gleichen Standardprotokolls wurde dann untersucht, ob sich mit ähnlicher Effizienz auch das bakterielle PorB-Ngo in Hefemitochondrien importieren lässt.

2.4.6 Proteinase K-Sensitivität des PorB-Ngo

Der Sensitivitätstest diente dazu, die geringste Konzentration an Proteinase K zu bestimmen, bei der das zu importierende PorB-Ngo vollständig abgebaut wird (Abb. 4.3).

A:



B:

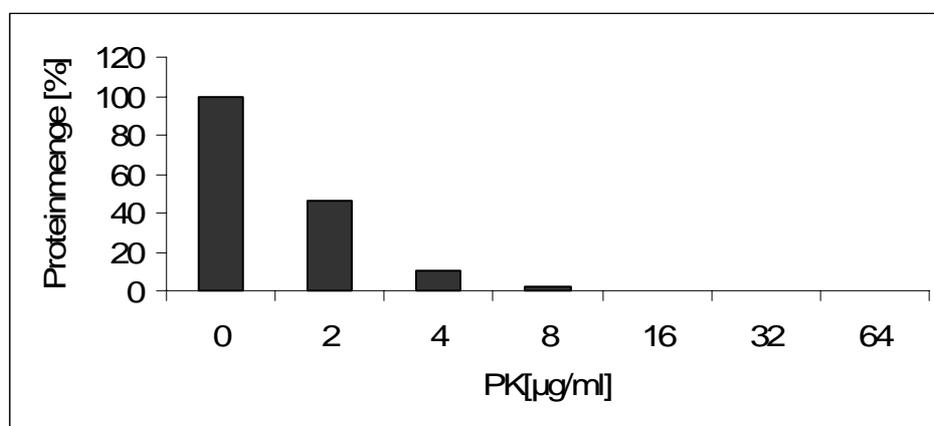


Abb. 4.3: A: SDS-Polyacrylamidgel der Bestimmung der Proteinase K Sensitivität

1,5 µl Retikulozytenlysat wurden 10 Minuten mit 25 mM HCl säureaktiviert und zu einem 25 µl Ansatz SEM gegeben. PK-Konzentrationen von 0 bis 64 µg/ml PK wurden zugegeben und die Reaktion nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 0°C durch Zugabe von 4 mM PMSF beendet. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das radioaktive Signal des unverdauten Proteins durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht

B: Quantifizierung der Bestimmung der Proteinase K Sensitivität

Die nach Autoradiographie quantifizierten Banden aus Abbildung 4.3 A wurden auf die Signalintensität der Probe ohne Proteinase K (100%) bezogen.

Die ermittelte Konzentration der Protease sollte in den folgenden Importexperimenten gewährleisten, dass das gesamte PorB-Ngo abgebaut wurde, das nicht zumindest die äußere Membran der Mitochondrien überquert hatte. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Menge des nach einem Importexperiment detektierten PorB-Ngo der Anteil ist, der vor der Protease geschützt in den Mitochondrien lokalisiert ist. Der Proteinase K-Sensitivitätstest wurde in SEM-Puffer (siehe 3.4.6) durchgeführt.

Aus den erhaltenen Daten (Abb. 4.3) ging hervor, dass bei einem Sensitivitätstest in SEM bereits eine Konzentration von 16 µg/ml PK

ausreichend war, um PorB-Ngo vollständig abzubauen. Für die folgenden Experimente wurde eine Proteinase K-Konzentration von 50 µg/ml gewählt, um sicher zu gehen, dass das Protein vollständig abgebaut wird. Diese Konzentration war außerdem niedrig genug, um die Intaktheit der mitochondrialen Membranen in den Importexperimenten zu gewährleisten.

2.4.7 Aggregationskontrolle von PorB-Ngo im Importansatz

Um die Aggregationsneigung des PorB-Ngo zu überprüfen, wurden 2 µl Lysat unter den üblichen Standardbedingungen der *in vitro*-Importexperimente inkubiert (siehe 3.4.10), wobei aber zunächst noch keine Mitochondrien zugegeben wurden.

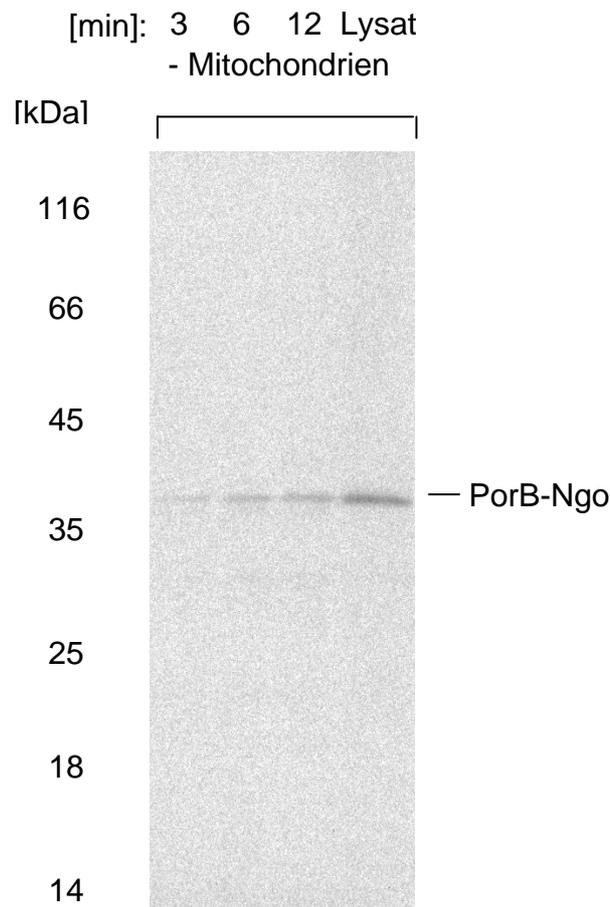


Abb. 4.4: SDS-Polyacrylamidgel der Aggregationskontrolle von PorB-Ngo

2 µl Retikulozytenlysate wurden im Importansatz ohne Mitochondrien bei 25 °C inkubiert. Nach jeweils 3, 6 und 12 Minuten wurden 50 µg/ml PK zugegeben. Die Proben wurden mit einer Lysatprobe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das radioaktive Signal des unverdauten Proteins durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht.

Ähnlich wie bei einer Importreaktion wurden die Ansätze nach definierten Zeiten mit Proteinase K behandelt und das Enzym wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von PMSF inaktiviert (Abb. 4.4).

Da keine Mitochondrien im Importansatz eingesetzt wurden, müsste bei einer ausreichenden Menge an Proteinase K das gesamte PorB-Ngo abgebaut werden.

Wie aus Abbildung 4.4 hervorgeht, waren Banden des PorB-Ngo zu detektieren, die mit längeren Inkubationszeiten deutlicher hervortraten. Dieser Anteil an proteaseresistentem Protein weist auf eine erhebliche Aggregation des PorB-Ngo hin. Das Auftreten dieser Aggregate stellte die Verwendbarkeit des etablierten Standardprotokolls zum mitochondrialen *in vitro* Import des PorB-Ngo in Frage, denn offenbar war unter den gegebenen Reaktionsbedingungen im Importansatz eine Proteaseresistenz des PorB-Ngo nicht mit einem mitochondrialen Import gleichzusetzen.

In den folgenden Experimenten wurde deshalb versucht, die Importeffizienz des *in vitro* Systems zu erhöhen und vor allem die Aggregation des PorB-Ngo zu reduzieren. Bei allen folgenden Importexperimenten wurde zu jedem Reaktionsansatz ein paralleler Reaktionsansatz ohne Mitochondrien identisch behandelt und der proteaseresistente Anteil des PorB-Ngo ermittelt. Dieser Anteil an aggregiertem Protein wurde vom Signal der Proben mit Mitochondrien abgezogen und lediglich die Differenz beider Werte wurde als Hinweis auf einen Import in die Mitochondrien gewertet.

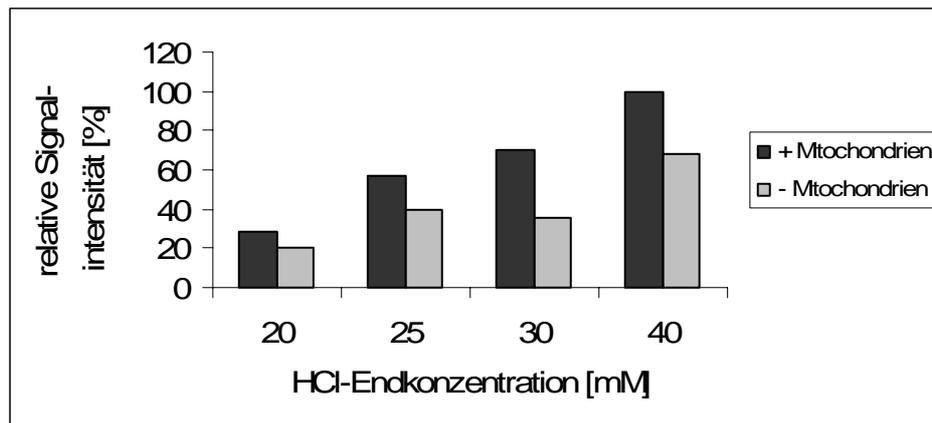
2.4.8 Säureaktivierung von PorB-Ngo

Aus verschiedenen Daten ist bekannt, dass die generelle Importpore der mitochondrialen Außenmembran einen Innendurchmesser von maximal 2,5 nm aufweist und stabil gefaltete Proteine aufgrund ihrer Größe nicht importiert werden können [20]. Andererseits ist auch bekannt, dass bakterielle Porine allgemein eine sehr stabile Tertiärstruktur aufweisen. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass das PorB-Ngo in seiner stabilen β -barrel Struktur von der generellen Importpore der Mitochondrien aufgenommen werden kann. Um die Importeffizienz zu erhöhen wurde deshalb nach einer Methode gesucht, durch die sich die Tertiärstruktur des PorB-Ngo destabilisieren ließ.

In der Arbeitsgruppe war bereits beobachtet worden, dass sich eine

Vorinkubation mit HCl positiv auf die Importeffizienz des p34, der kleinen Untereinheit des VacA-Toxins von *Helicobacter pylori* auswirkt [155]. Es wurde nun untersucht, ob sich eine ähnliche Säureaktivierung auch mit dem PorB-Ngo durchführen ließ (Abb. 4.5).

A:



B:

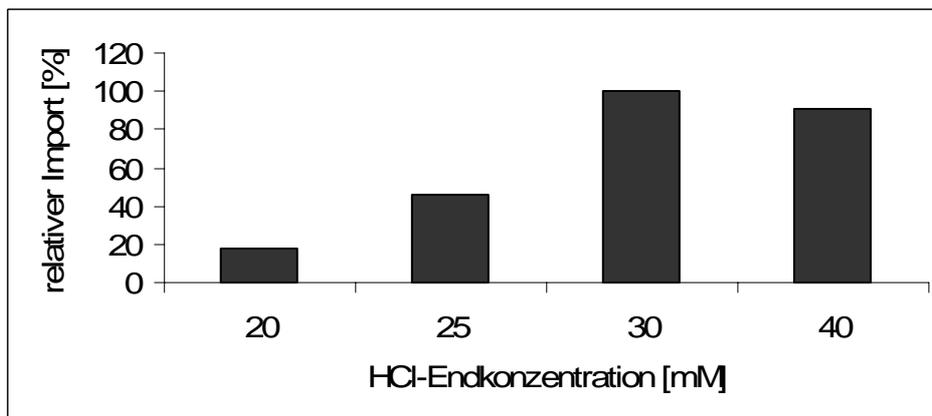


Abb. 4.5: HCl-Titration zur Säureaktivierung von PorB-Ngo vor dem Import in Hefemitochondrien

PorB-Ngo Lysat wurde mit jeweils 20, 25, 30 und 40 mM HCl vorinkubiert, bevor es in einem Standardimportansatz eingesetzt wurde. Die Importreaktion wurde nach 10 Minuten mit 50 µg/ml PK gestoppt. Anhand einer 2 µl Lysatprobe wurden die Proteinbanden quantifiziert. Der höchste ermittelte Wert wurde für die Darstellung auf 100 % gesetzt und alle weiteren Werte relativ zu diesem berechnet (relativer Import). **Abb. A** zeigt die relative Signalintensität von PorB-Ngo aus den Importansätzen mit und ohne Mitochondrien. Der Anteil an aggregiertem PorB-Ngo ist anhand der Ansätze ohne Mitochondrien ersichtlich.

In **Abb. B** ist die Aggregation von den Werten der Importansätze mit Mitochondrien abgezogen und zeigt ausschließlich importiertes Protein.

Das Retikulozytenlysat des PorB-Ngo wurde vor der Importreaktion mit verschiedenen HCl-Konzentrationen für 10 Minuten bei 20 °C inkubiert.

Anschließend wurden 2 µl des säureaktivierten Retikulozytenlysats zum Importansatz zugegeben und der Import wurde nach Standardprotokoll (siehe 3.4.10) durchgeführt. Durch die Pufferbedingungen des Importansatzes wurde die Salzsäure neutralisiert, sodass der Import des PorB-Ngo in die Mitochondrien beim Einsatz von 20 bzw. 25 mM HCl bei nahezu neutralen pH-Werten erfolgte. Für die Behandlung der Proben mit Proteinase K wurde eine Konzentration von 50 µg/ml gewählt. Um das Verhältnis der Aggregation zum importierten Protein beurteilen zu können, wurde das PorB-Ngo in dem Experiment der Abbildung 4.5 A parallel, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Mitochondrien, inkubiert.

Die Auswertungen zeigten, dass die Säureaktivierung die Importeffizienz des PorB-Ngo signifikant erhöhte. Zu bemerken war jedoch auch, dass die Aggregationsneigung des Proteins bei der Säurekonzentration erheblich zunahm. Eine Überprüfung mit pH-Indikatorpapier ergab, dass der pH-Wert im Retikulozytenlysats nach Zugabe von 25 mM HCl bei 5 bis 6 lag. Bei Zugabe von 30 mM HCl sank der pH-Wert auf 3 bis 4 und es trat eine Verfärbung des Lysats ein.

Bei den folgenden Experimenten wurde die Säureaktivierung deshalb mit einer Konzentration von 25 mM HCl durchgeführt. Auch unter Berücksichtigung der verstärkten Aggregationsneigung konnte das PorB-Ngo unter diesen Bedingungen wesentlich effizienter importiert werden als nach dem üblichen Standardprotokoll. In einer umfangreichen Serie weiterer Experimente war es nun das Ziel, die Importbedingungen für das PorB-Ngo weiter zu optimieren.

2.4.9 Import des PorB-Ngo in Mitochondrien verschiedener Hefestämme

Da es viele verschiedene Hefestämme gibt, deren Mitochondrien für den Proteinimport geeignet sind, wurden mit einigen Mitochondrienpräparationen Importexperimente des PorB-Ngo durchgeführt, um die Importeffizienz zu vergleichen. Die Stämme K39, YPH499 und PK82 wurden eingesetzt und eine Importkinetik erstellt (Abb. 4.6).

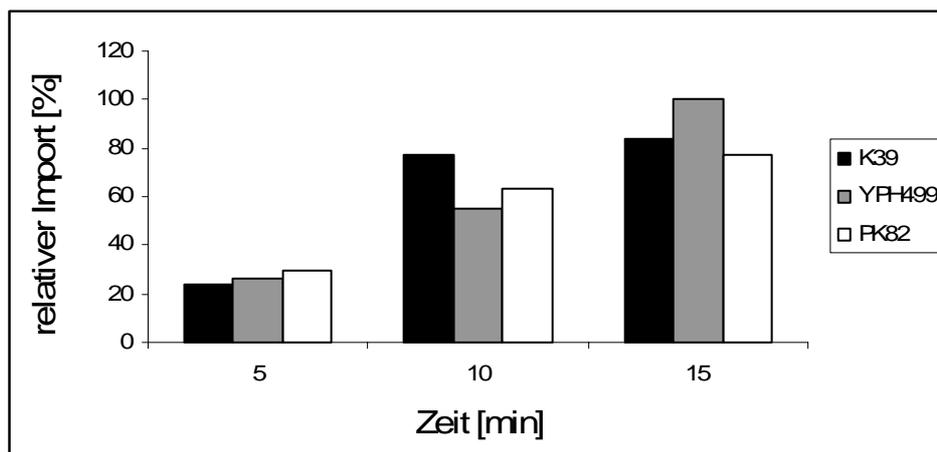


Abb. 4.6: Quantifizierung des *in vitro* Imports von PorB-Ngo in Mitochondrien verschiedener Hefestämme

Das Lysat von PorB-Ngo wurde mit 25 mM HCl aktiviert und je 2 μ l im Standardimportansatz mit 30 μ g der verschiedenen Mitochondrienpräparationen eingesetzt. Nach jeweils 5, 10 und 15 Minuten wurde die Reaktion mit 50 μ g/ml PK gestoppt. Die Proben wurden nach SDS-PAGE und Autoradiographie quantifiziert und auf das Signal der Lysatprobe (100 %) bezogen. Die maximal ermittelte Importeffizienz wurde im Anschluss auf 100 % gesetzt und alle weiteren Werte relativ zu diesem Wert berechnet (relativer Import).

Die Daten zeigten, dass PorB-Ngo in die Mitochondrien der drei ausgewählten Hefestämme mit ähnlicher Effizienz importiert werden konnte. Für weitere Experimente wurden Mitochondrien des Stamms YPH499 eingesetzt.

2.4.10 Mitochondrientitration

Die Mitochondrienmenge wurde titriert, um die optimale Menge an Mitochondrien für den Import von PorB-Ngo herauszufinden. Es sollte eine ausreichende Menge an Mitochondrien eingesetzt werden, um nach der Auswertung eines Importexperiments ein deutliches Signal von PorB-Ngo auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Gleichzeitig musste darauf geachtet werden, dass nicht zu viele Mitochondrien eingesetzt wurden, da sonst das SDS-Polyacrylamidgel mit zu viel mitochondrialem Protein überladen würde, was Einbußen bei der Auftrennung der Proteine mit sich bringt. Das Importexperiment wurde mit 10, 20, 40 und 80 μ g Mitochondrien in einem 50 μ l Ansatz durchgeführt. Um beurteilen zu können, wie sich die Aggregation des PorB-Ngo bei unterschiedlichen Mengen an Mitochondrien verhält, wurden auch Proben ohne Mitochondrien mit bearbeitet (Abb. 4.7).

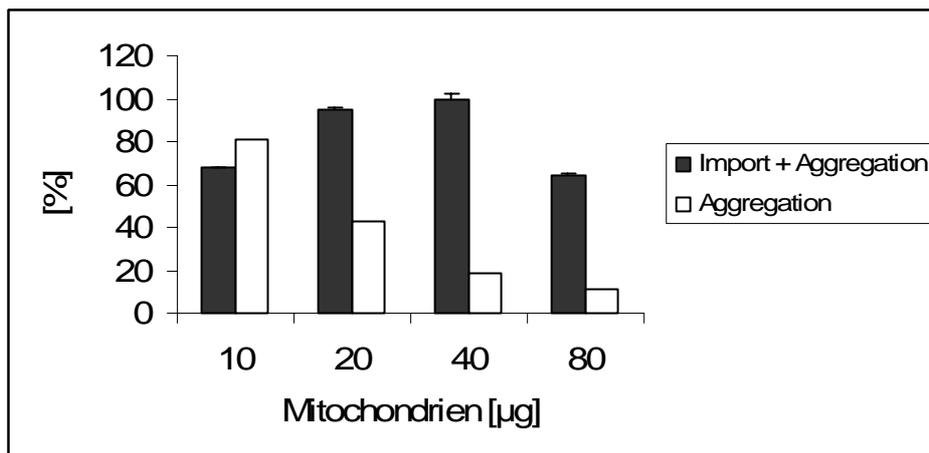


Abb. 4.7: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo nach Mitochondrientitration

In einem Standardimportansatz wurden 10, 20, 40 und 80 µg Mitochondrien des Stamms YPH499 eingesetzt. 2 µl zuvor HCl aktiviertes Lysat wurden 10 Minuten mit und ohne Mitochondrien im Importansatz inkubiert. Die Reaktion wurde durch 50 µg/ml PK gestoppt. Nach Zugabe von PMSF wurden die Proben zentrifugiert und nach Zugabe von Laemmli-Puffer auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Signal des radioaktiv markierten PorB-Ngo wurde autoradiographisch quantifiziert und auf eine 2 µl Lysatprobe bezogen. [n=3]

„Import und Aggregation“ zeigt die quantifizierte Menge des PorB der Proben mit Mitochondrien, „Aggregation“ die der Proben ohne Mitochondrien.

Bei den Mitochondrienkonzentrationen ab 20 µg konnte ein deutliches Signal des PorB-Ngo detektiert werden. Da die Importeffizienz bei 20 µg bzw. 40 µg Mitochondrien im Importansatz am besten war, wurden bei weiteren Experimenten 30 µg Mitochondrien im Importansatz eingesetzt. Bei dieser Konzentration war auch gewährleistet, dass die SDS-Polyacrylamidgele nicht mit Proteinen überladen wurden.

2.4.11 Einfluss verschiedener Parameter auf die Aggregation des PorB-Ngo

Durch die Einführung der Säureaktivierung hatte sich in den Importexperimenten die Importeffizienz des PorB-Ngo erheblich steigern lassen. Durch die Aggregationsneigung des PorB-Ngo war die Auswertung der Experimente aber weiterhin erschwert und die Verlässlichkeit der Daten in Frage gestellt. Es wurde deshalb auf verschiedenen Wegen nach einer Möglichkeit gesucht, die Bildung der Aggregate zu verhindern bzw. zu verringern.

4.1.1.1 Bestimmung der Zeitabhängigkeit der *in vitro* Translation von PorB-Ngo

Zunächst wurde die Zeit der *in vitro* Translation verändert, da bei zunehmender Inkubationszeit während bzw. nach der Translation bereits Aggregate entstehen könnten. Die vom Hersteller des TNT® T7 *Reticulocyte Lysate* Systems vorgeschlagenen Translationszeiten betragen 60 bis 90 Minuten. Da bei der bisherigen *in vitro* Translation von PorB-Ngo der Ansatz für 90 Minuten inkubiert worden war, wurden nun kürzere Translationszeiten gewählt und die Konsequenzen für einen nachfolgenden Proteinimport in Mitochondrien untersucht (Abb. 4.8).

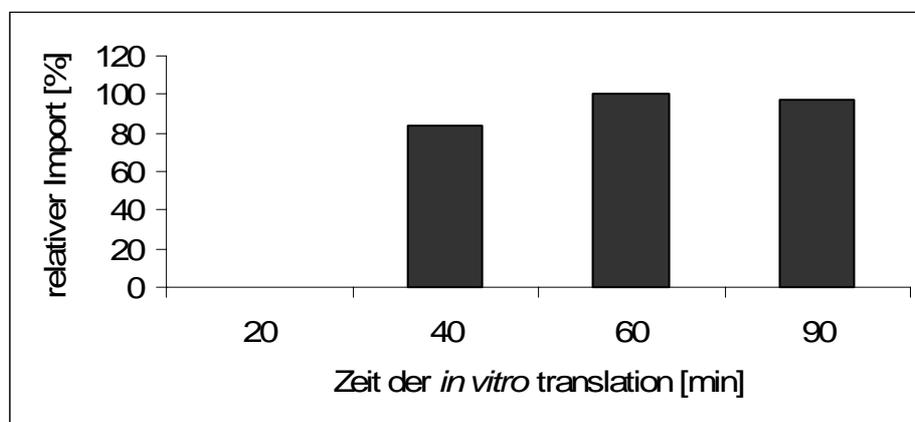


Abb. 4.8: Quantifizierung der Zeitabhängigkeit der *in vitro* Translation von PorB-Ngo

Die *in vitro* Translation wurde mit den Reagenzien des TNT® T7 *Reticulocyte Lysate* System (der Firma Promega) durchgeführt und für jeweils 20, 40, 60 und 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein Standardimport durchgeführt, bei dem 2 µl des nach unterschiedlichen Translationszeiten im Lysat hergestellten Proteins säureaktiviert und zu einem Ansatz mit 30 µg Mitochondrien des Stamms YPH499 zugegeben wurden. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µg/ml PK gestoppt. Die Banden wurden nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel autoradiographisch quantifiziert. Die höchste ermittelte Importeffizienz in Bezug auf die Lysatprobe wurde 100 % gleichgesetzt.

Außer bei einer *in vitro* Translation von nur 20 Minuten, bei der das Protein noch nicht in ausreichender Menge synthetisiert worden war, zeigten die Importe mit Retikulozytenlysat aus der Translation für 40 bis 90 Minuten ein deutliches Signal. In den folgenden *in vitro* Translationen von PorB-Ngo wurde eine Translationszeit von nur 60 anstatt 90 Minuten eingehalten, da bei einer Translation von 90 Minuten die Aggregation höher und dadurch die Importeffizienz geringer war als bei der Translation für 60 Minuten. Außerdem befand sich die Zeit der 60-minütigen *in vitro* Translation noch in dem vom

Hersteller vorgeschlagenen Zeitfenster, weshalb schließlich die 40-minütige Inkubationszeit des Translationsansatzes ausgeschlossen wurde.

4.1.1.2 Änderung der Zeitdifferenz zwischen Säureaktivierung und Lysatzugabe zum Importansatz

Die Säureaktivierung war für das Erreichen einer importkompetenten Struktur des PorB-Ngo notwendig. Es war jedoch offensichtlich, dass sich durch den niedrigeren pH-Wert auch die Aggregationsneigung des PorB-Ngo erhöhte. Es wurde deshalb der Zeitpunkt der HCl-Aktivierung verändert und überprüft, ob sich dadurch die Aggregation umgehen oder reduzieren ließ. Als Vergleichsgröße wurde das Lysat 10 Minuten vor der Zugabe zum Importansatz HCl aktiviert und bei 20 °C inkubiert. Des Weiteren wurde das Lysat direkt vor der Zugabe zum Importansatz aktiviert. In zwei weiteren Experimenten wurde das Lysat zunächst zum Importansatz zugegeben und erst nach einer Inkubation von 5 bzw. 10 Minuten des Lysats im Importansatz der gesamte Ansatz mit 25 mM HCl behandelt (Abb. 4.9).

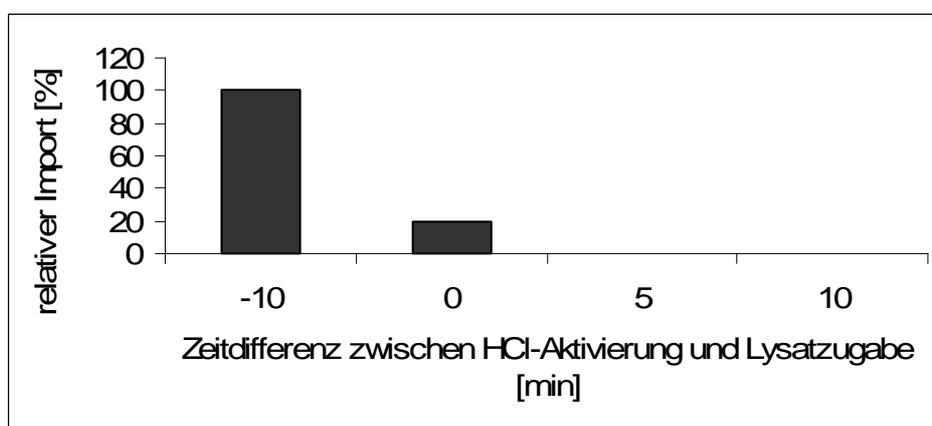


Abb. 4.9: Quantifizierung der Änderung der Zeitdifferenz zwischen Säureaktivierung und Lysatzugabe zum Importansatz

Das Importexperiment wurde nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) durchgeführt, die Proben wurden nach Zugabe von 2 µl Lysat zu 30 µg Mitochondrien für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurde diese auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bezogen auf eine Lysatprobe (100 %) autoradiographisch quantifiziert.

- 10: Säureaktivierung des Lysats 10 Minuten vor Zugabe zum Importansatz
- 0: Säureaktivierung des Lysats unmittelbar vor Zugabe zum Importansatz
- 5: Säureaktivierung des Importansatzes 5 Minuten nach Lysatzugabe
- 10: Säureaktivierung des Importansatzes 10 Minuten nach Lysatzugabe

Bei der Säureaktivierung des Importansatzes nach Lysatzugabe konnte kein PorB-Ngo auf dem SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden, unabhängig davon, ob man die Ansätze 5 oder 10 Minuten mit HCl inkubierte. Auch die unmittelbare Zugabe des Lysats nach der Aktivierung erbrachte keine zufriedenstellende Importeffizienz des PorB-Ngo in Hefemitochondrien. Scheinbar war für die Modifikation des PorB-Ngo in eine importkompetente Form eine gewisse Inkubationszeit des Lysats in HCl erforderlich, weshalb die Inkubation für 10 Minuten bei 20 °C in HCl beibehalten wurde.

2.4.12 Titration der Lysatmenge mit radioaktiv markiertem PorB-Ngo

Das Kaninchen-Retikulozytenlysat des TNT® T7 *Coupled Reticulocyte Lysate* Systems der Firma Promega wird durch Isolation, Reinigung und anschließende Lyse der Retikulozyten aus Kaninchenblut hergestellt. Die Kaninchen werden zuvor mit bestimmten Reagenzien behandelt, sodass eine Akkumulation von Retikulozyten im Blut erfolgt.

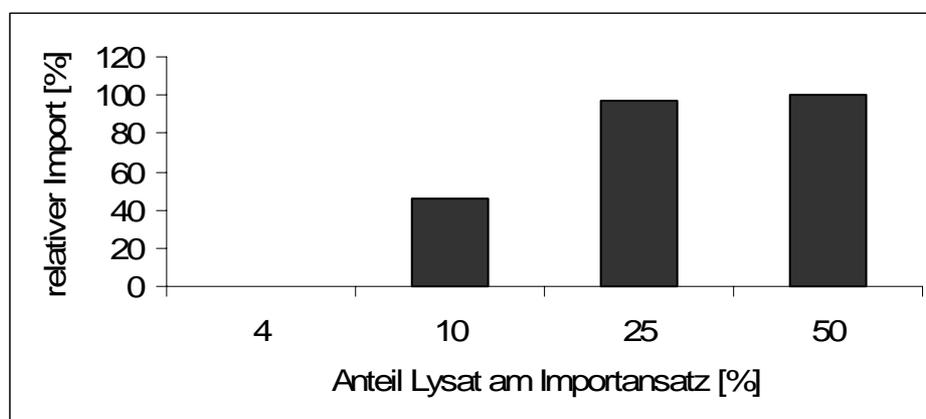


Abb. 4.10: Quantifizierung der Titration der Lysatmenge

Unterschiedliche Mengen Lysat (4, 10, 25, 50 % des Importansatzes) wurden für 10 Minuten bei 20 °C säureaktiviert und in je einem 50 µl Importansatz mit 30 µg Mitochondrien für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 50 µg/ml PK gestoppt und nach weiteren 10 Minuten PMSF zugegeben. Zu jedem Ansatz wurde eine Lysatprobe, mit der entsprechenden Lysatmenge auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit einem Phosphorimager bezogen auf die zugehörige Lysatprobe (100 %) quantifiziert. Anschließend wurde die höchste ermittelte Importeffizienz des PorB auf 100 % gesetzt, alle weiteren wurden auf diesen Wert bezogen.

Das Retikulozytenlysat enthält tRNAs, Aminosäuren, Ribosomen, Initiations-, Elongations-, Terminationsfaktoren und Chaperone. Es dient als Grundlage der *in vitro* Transkription und Translation von PorB-Ngo, das im Lysat mit radioaktivem Methionin synthetisiert wird. Um die Importeffizienz zu steigern, wurde die Menge des Lysats mit radioaktivem Protein im Importansatz erhöht, wobei bis zu 50 % Lysat eingesetzt wurden (Abb. 4.10).

Durch die Zugabe von mehr Retikulozytenlysat und somit mehr Protein konnte der Import von PorB-Ngo in Wildtyphefemitochondrien effizient gesteigert werden. Um jedoch nicht mit solchen großen Mengen an Radioaktivität arbeiten zu müssen, wurde der Effekt von reinem Kaninchen-Retikulozytenlysat des TNT® T7 *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* - ohne darin synthetisiertem PorB-Ngo - bezüglich der Importeffizienz untersucht.

2.4.13 Titration der Retikulozytenlysatmenge

Chaperone sind Moleküle, die in jeder Zelle vorkommen und beim Proteinimport in Mitochondrien die Aufgabe haben, die zu importierenden Proteine in einer translokationskompetenten Konformation zu halten [31]. Um dies zu gewährleisten, binden die Chaperone an die neu synthetisierten Proteine und schützen sie vor Aggregation. Da das Kaninchen-Retikulozytenlysat (siehe 2.4.12) Chaperone enthält, wurde der Effekt einer größeren Menge Retikulozytenlysat (ohne Protein) auf die Importkompetenz des PorB-Ngo untersucht (Abb. 4.11).

Da auch das Kaninchen-Retikulozytenlysat ohne radioaktives Protein die Importeffizienz des PorB-Ngo in Hefemitochondrien erheblich steigerte, wurde es in allen folgenden Experimenten eingesetzt. Bevorzugt wurde mit einem Anteil von 15 % Retikulozytenlysat im Importansatz gearbeitet, da diese Menge bereits eine deutliche Steigerung der Importkompetenz von PorB-Ngo zur Folge hatte.

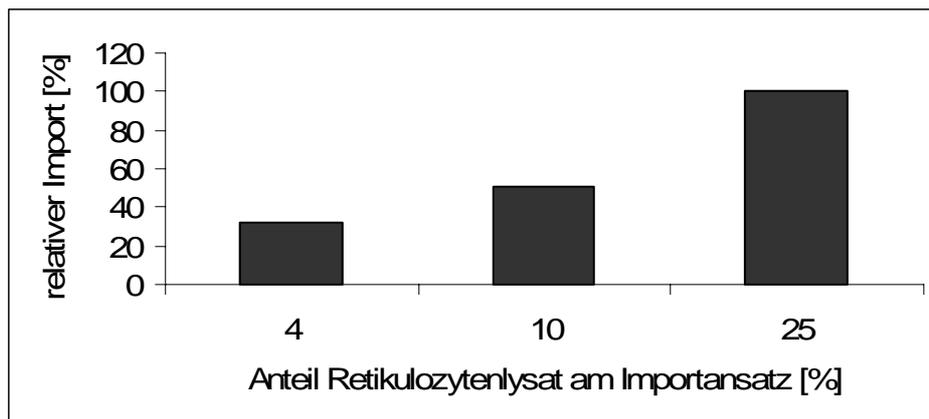


Abb. 4.11: Quantifizierung der Titration der Retikulozytenlysatmenge

Zum normalen Importansatz (siehe 3.4.10) wurden zusätzlich 4, 10 und 25 % Retikulozytenlysat zugegeben. Das Lysat mit Protein wurde bei 20 °C HCl-aktiviert und je 2 µl für 10 Minuten zum Importansatz mit Retikulozytenlysat zugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 µg/ml PK gestoppt und nach weiteren 10 Minuten PMSF zugegeben. Die Banden wurden nach SDS-PAGE anhand einer Lysatprobe autoradiographisch ausgewertet und anschließend die relative Importeffizienz, bezogen auf den höchsten ermittelten Wert, berechnet.

Um die absolute Menge an Retikulozytenlysat möglichst gering zu halten, wurde der Importansatz auf ein Volumen von 25 µl reduziert und die entsprechende Menge an Mitochondrien von 30 auf 15 µg halbiert. Die Menge an Lysat wurde bei 2 µl belassen, um den positiven Effekt des zusätzlichen Retikulozytenlysat im Importansatz durch den Effekt einer größeren Lysatmenge mit Protein (siehe 2.4.12) zu verstärken.

2.4.14 Saccharose-Titration

Ihre physiologische Morphologie weisen Mitochondrien in isoosmotischer Lösung auf. Um diese natürliche Morphologie auch bei der Lagerung zu gewährleisten, werden isolierte Mitochondrien in SEM-Puffer aufbewahrt, der zu diesem Zweck 250 mM Saccharose enthält. Puffer mit einer höheren Konzentration an Saccharose sind hyperton und verursachen, dass die Mitochondrien schrumpfen. Bei einer niedrigeren Konzentration an Saccharose ist die Lösung hypoton und die Mitochondrien schwellen an. Um zu testen, ob sich die Morphologie der Mitochondrien auf deren Importkompetenz auswirkt, wurde die Saccharosekonzentration im Importansatz erhöht und der Anteil an aggregiertem PorB-Ngo beurteilt (Abb. 4.12).

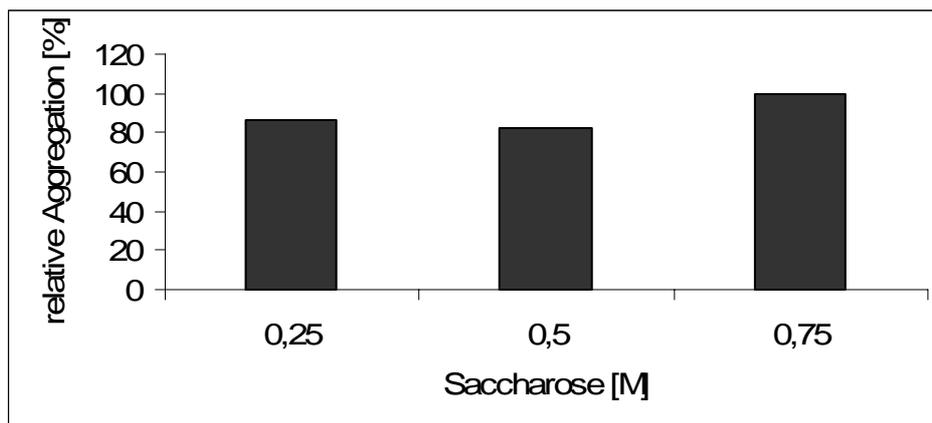


Abb. 4.12: Quantifizierung der Saccharose-Titration

Ein Standardimport (siehe 3.4.10) ohne Mitochondrien, mit zusätzlichem Retikulozytenlysat (15 %) wurde im Importansatz durchgeführt. Die Saccharose-Konzentration im Importansatz wurde auf 250, 500 und 750 mM eingestellt und 2 μ l säureaktiviertes LySAT für die Reaktion zugegeben. Der Anteil an aggregiertem Protein konnte durch Bezug des proteaseresistenten Proteins auf eine LySATprobe ermittelt werden. Der höchste ermittelte Wert wurde für die Darstellung auf 100 % gesetzt und alle weiteren Werte relativ zu diesem berechnet (relative Aggregation).

Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, konnte die Aggregation des PorB-Ngo durch höhere Saccharosekonzentrationen nicht verringert werden. Die Mitochondrien in hypotonem Medium schienen das Protein tendenziell schlechter aufzunehmen, weshalb beim Einsatz von 750 mM Saccharose mehr PorB-Ngo aggregierte. Aus diesem Grund wurde die Saccharosekonzentration für den Import von PorB-Ngo in Mitochondrien auf 250 mM Saccharose eingestellt, was die Mitochondrien osmotisch stabilisiert und den natürlichen Bedingungen in der Zelle entspricht.

2.4.15 Einfluss von $MgCl_2$, EDTA, DTT und ATP auf die Importeffizienz

Salze, EDTA, DTT und ATP sind Bestandteile des Standardimportansatzes für den Proteinimport in Mitochondrien (siehe 3.4.10). In mehreren Titrationen wurden nun die Konzentrationen dieser Komponenten variiert und der Einfluss auf die Aggregation des PorB-Ngo untersucht.

Die optimale Salzkonzentration beim Proteinimport in Mitochondrien ist von Protein zu Protein unterschiedlich, normalerweise ist eine Konzentration von 80 mM KCl ausreichend. Einige Proteine, wie zum Beispiel der ADP/ATP-Translokator zeigen eine bessere Importeffizienz bei höheren KCl-

Konzentrationen oder bei zusätzlichem MgCl_2 [156]. Möglicherweise erleichtert die Zugabe des MgCl_2 im Reaktionsansatz auch die Komplexbildung des ATP mit Magnesiumionen. In vielen biochemischen Reaktionen reagiert MgATP wesentlich effizienter als das freie ATP. Daher wurde der Importansatz von PorB-Ngo mit 5 mM MgCl_2 ergänzt.

EDTA ist ein Chelatkomplexbildner, es kann sich 6-fach an Kationen binden und bildet dabei sehr stabile Komplexe. Isolierte Mitochondrien werden bei vielen Versuchen in Gegenwart von EDTA inkubiert, um metallabhängige Proteasen zu inaktivieren. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bestimmte Kationen direkt oder indirekt in die Aggregation des PorB-Ngo eingreifen, wurde auch der Effekt einer Zugabe von 1 mM EDTA zum Importansatz geprüft.

Durch die Zugabe von DTT werden in Zellfraktionen reduzierende Bedingungen geschaffen. DTT reduziert Disulfidbrücken und kann in niedrigen Konzentrationen auch Enzyme und andere Proteine mit freien Sulfhydrylgruppen stabilisieren. Um einen möglichen Einfluss auf die Aggregation des PorB-Ngo zu überprüfen, wurde DTT in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.

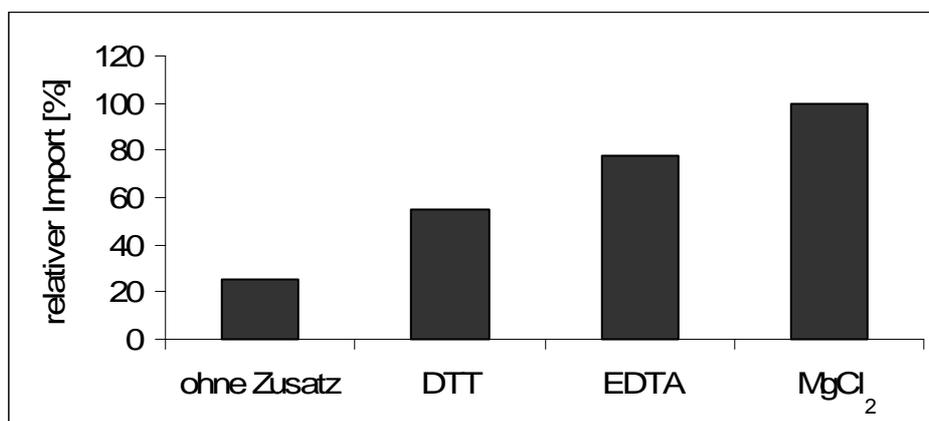


Abb. 4.13: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo nach Zugabe von DTT, EDTA und MgCl_2

Das Importexperiment von PorB-Ngo wurde mit Mitochondrien des Hefestamms YPH499 durchgeführt. Die Importansätze enthielten zusätzlich zum 25 μl Importansatz mit Retikulozytenlysat je 1 mM DTT, 1 mM EDTA oder 5 mM MgCl_2 . Die Importreaktion wurde nach 10 Minuten bei 25 °C durch Inkubation für 10 Minuten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ PK gestoppt und anschließend mit PMSF behandelt. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die Proteinbanden ausgewertet. Die höchste ermittelte Importeffizienz wurde 100 % gleichgesetzt.

Überraschend zeigten alle Zusätze einen positiven Effekt auf die Importeffizienz (Abb. 4.13). Insbesondere durch Zugabe von MgCl_2 ließ sich die Importeffizienz deutlich steigern. In weiteren Tests wurde deshalb eine Zugabe von DTT mit der Zugabe von MgCl_2 kombiniert (Abb. 4.14).

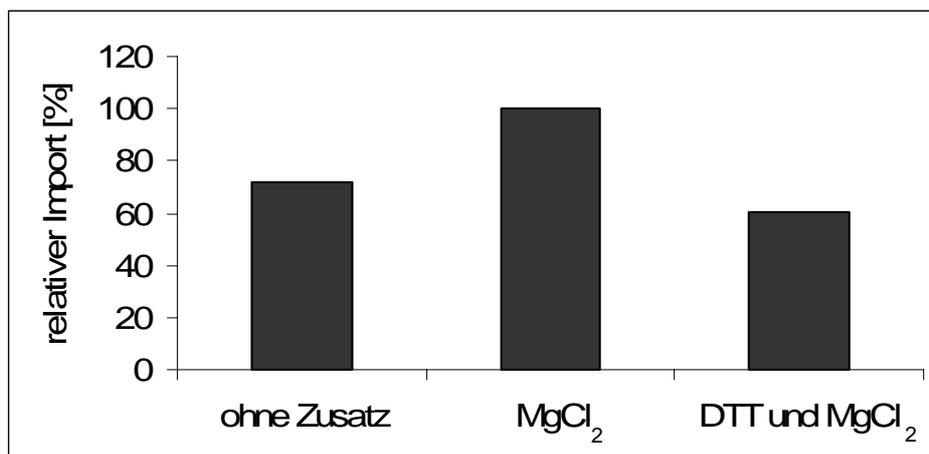


Abb. 4.14: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo nach Zugabe von MgCl_2 und DTT + MgCl_2

Zum 25 μl Importansatz mit 15 % Retikulozytenlysats wurden 5 mM MgCl_2 und 1 mM DTT mit 5 mM MgCl_2 zugegeben. Nach Säureaktivierung des Lysats und Zugabe zum Importansatz wurde der Import nach 10 Minuten durch 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K gestoppt. Über SDS-PAGE und autoradiographische Auswertung wurde die Signalstärke des Proteins ermittelt.

In Gegenwart des MgCl_2 hatte DTT keinen positiven Effekt mehr, weshalb in weiteren Versuchen auf die Zugabe zusätzlichen DTTs verzichtet wurde.

Aus früheren Projekten war in der Arbeitsgruppe bekannt, dass eine Zugabe von ATP die Importeffizienz verschiedener Vorstufenproteine sowohl steigern als auch erniedrigen kann. Allgemein wird eine Stimulation des mitochondrialen Proteinimports mit der ATP-Abhängigkeit mehrerer zytosolischer Chaperonproteine erklärt. Die Gründe, für die gelegentlich insbesondere bei höheren ATP-Konzentrationen beobachtete Hemmung des Proteinimports, sind unbekannt. In einem ersten Experiment wurde nun die Aggregation des PorB-Ngo in Gegenwart und in Abwesenheit von ATP untersucht, wobei das ATP in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt wurde (Abb. 4.15).

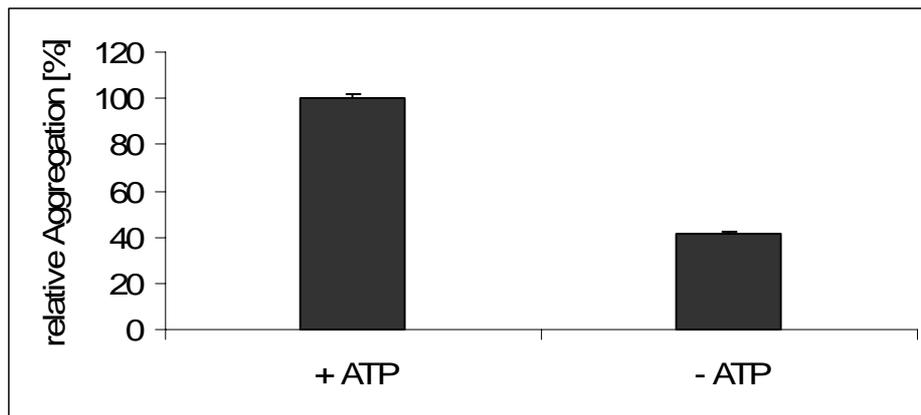


Abb. 4.15: Quantifizierung der Aggregation von PorB-Ngo mit und ohne Zugabe von ATP zum Importansatz

Dem 25 μ l Importansatz mit Retikulozytenlysat und ohne Mitochondrien wurde 1 mM ATP zugegeben und die Reaktion nach Zugabe von 2 μ l säureaktiviertem Lysat nach 10 Minuten mit 50 μ g/ml gestoppt. PMSF wurde zugegeben, die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Banden autoradiographisch quantifiziert. Die maximale Aggregation wurde auf 100 % gesetzt. [n=3]

Die Zugabe des ATP zeigte reproduzierbar einen ausgeprägten Effekt. In Gegenwart des ATP aggregierte mehr als doppelt so viel PorB-Ngo als in Abwesenheit des Nukleotids. Die Aggregation des PorB-Ngo wurde vermutlich durch eine ATP-abhängige Ablösung des Proteins von den zytosolischen Chaperonproteinen ausgelöst.

In der Diskussion der deutlichen Effekte, die sowohl das ATP, als auch das $MgCl_2$ gezeigt hatten, erwies sich wiederum ein Blick auf die älteren Studien zum mitochondrialen Import des VDAC als hilfreich. Für den Import des VDAC war zunächst postuliert worden, dass die Insertion in die mitochondriale Außenmembran allein von der Komponente Tom20 des TOM-Komplexes abhängig sei. Im direkten Anschluss an eine kurzzeitige Bindung an Tom20 schien der VDAC unmittelbar in die Membran zu inserieren [106]. Dieses Schema wurde später von Krimmer et. al. erheblich modifiziert. Es ließ sich zeigen, dass am Import des VDAC tatsächlich mehrere weitere Proteine der mitochondrialen Außenmembran beteiligt sind, unter anderem das Protein Tom40, das die generelle Importpore der Mitochondrien bildet. Es ließen sich nun zwei Schritte definieren: In einem ersten Schritt kommt es an der Außenseite der Mitochondrien zu einer Anbindung des VDAC an den TOM-Komplex. Die Anbindung ist noch unabhängig von der generellen Importpore.

Erst in einem weiteren Schritt erfolgt die Translokation des VDAC durch die Tom40-Pore über die Außenmembran [27].

Eine derartige 2-stufige Importreaktion konnte nun auch für das PorB-Ngo etabliert werden: (1) In einem ersten Ansatz wurde das PorB-Ngo mit Mitochondrien inkubiert, um lediglich eine Anbindung des Proteins an die Mitochondrien zu ermöglichen. (2) Die Mitochondrien wurden dann reisoliert und in einem zweiten Ansatz unter veränderten Bedingungen inkubiert, die nun auch die Translokation des Proteins über die mitochondriale Außenmembran ermöglichte.

Der erste Schritt, die Anbindung des PorB-Ngo an die Mitochondrien, wurde in Gegenwart von EDTA durchgeführt. Wie in Abbildung 4.16 gezeigt, war die Aggregationsneigung des PorB-Ngo in Gegenwart von EDTA vergleichsweise gering. Vermutlich erschwerte das EDTA durch Bindung der im Retikulozytenlysat vorhandenen Magnesiumionen die Reaktionen des ATP mit den Chaperonproteinen und damit die Freisetzung (und nachfolgende Aggregation) des PorB-Ngo. Andererseits war zu erwarten, dass die Stabilisierung der PorB-Ngo-Chaperon-Komplexe eine Translokation des PorB-Ngo verhindern sollte. Die optimale Konzentration an EDTA wurde durch eine Titration ermittelt (Abb. 4.16).

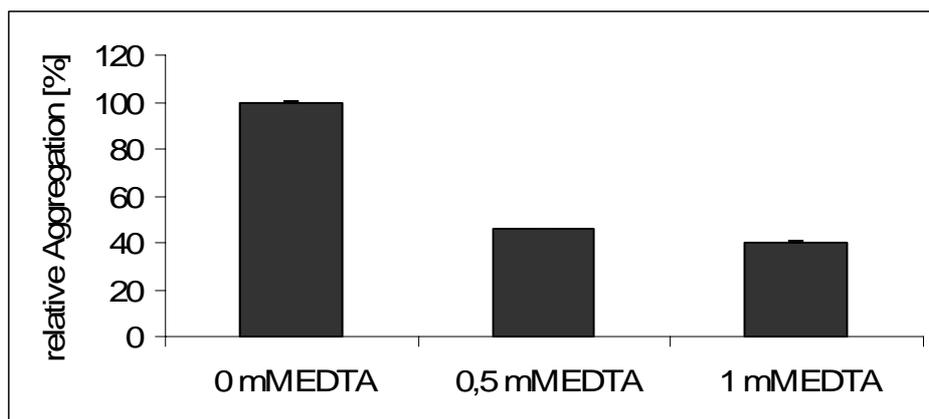


Abb. 4.16: Quantifizierung der EDTA-Titration

Im 25 μ l Volumen wurde ein Importexperiment mit Retikulozytenlysat, ohne EDTA bzw. mit 0,5 und 1 mM EDTA und ohne Mitochondrien im Importansatz durchgeführt. 2 μ l Lysat wurden nach Säureaktivierung eingesetzt, nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 50 μ g/ml PK beendet und das Enzym mit PMSF gestoppt. Über SDS-PAGE und Autoradiographie wurde die Aggregatbildung quantifiziert. [n=4]

Da die Aggregation von PorB-Ngo bei Zugabe von 1 mM EDTA zum Importansatz am geringsten war, wurde diese Konzentration zur Anbindung des Proteins an die Mitochondrien beibehalten.

Die Anbindungsreaktion wurde beendet, indem die Mitochondrien vom Retikulozytenlysat getrennt wurden. Zu diesem Zweck wurde der Importansatz auf ein Saccharosekissen (500 mM Saccharose in „S₅₀₀EM-Puffer“) pipettiert und bei 16000 x g zentrifugiert. Das leichtere Lysat wurde dabei von den schwereren Mitochondrien abgetrennt und konnte nach Zentrifugation mit der oberen Phase abgenommen werden.

Im zweiten Schritt wurde das an die reisolieren Mitochondrien gebundene PorB-Ngo in Gegenwart von ATP importiert. Die dazu benötigte ATP-Konzentration wurde in einer Titration ermittelt (Abb. 4.17).

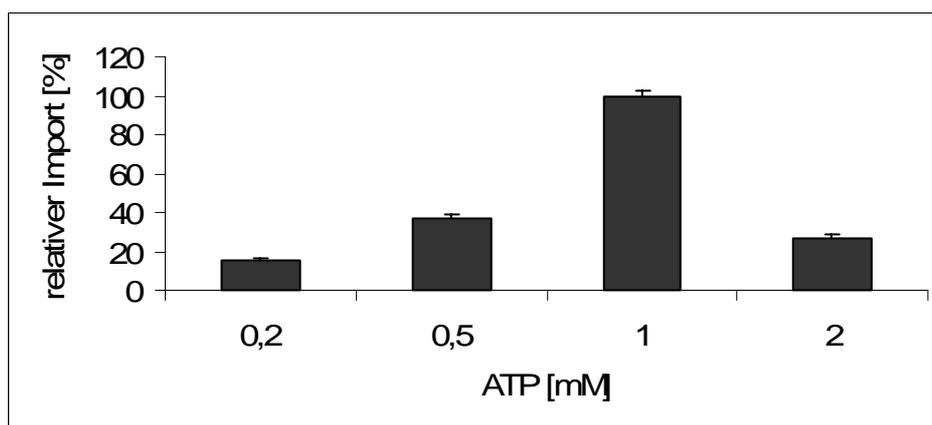


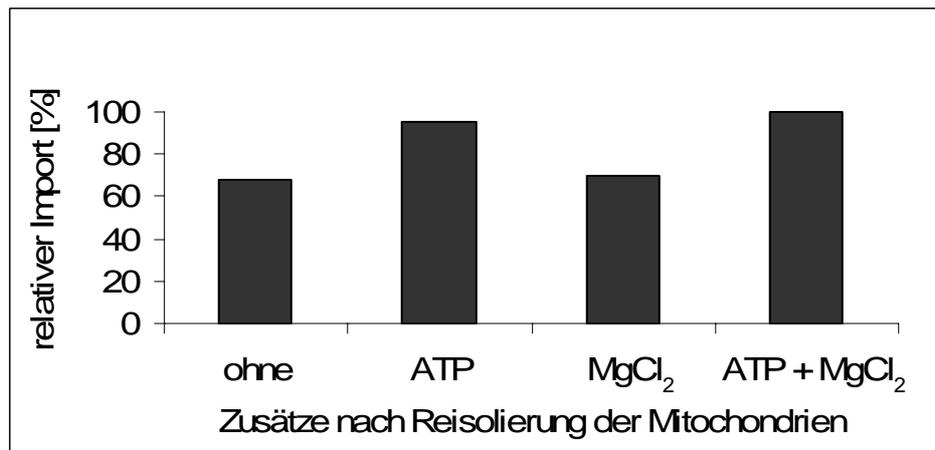
Abb. 4.17: Quantifizierung der ATP-Titration

Im 25 µl Volumen wurden die Mitochondrien mit 15 % Retikulozytenlysat, 1 mM EDTA, ohne ATP im Importansatz für 5 Minuten inkubiert. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurden sie in SM-Puffer (also ohne EDTA) mit 0,2, 0,5, 1 und 2 mM ATP für weitere 5 Minuten inkubiert und die Reaktion anschließend wie im Standardimportprotokoll mit 50 µg/ml PK und PMSF gestoppt. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die Proteinbanden quantifiziert. [n=3]

Nach der Anbindung von PorB-Ngo und Reisolierung der Mitochondrien ergab der Zusatz von ATP eine deutliche Steigerung der Importeffizienz. Da die PorB-Ngo Moleküle bereits an die Mitochondrien gebunden waren, war die Tendenz zur Aggregation vergleichsweise gering. Vermutlich beruhte der Effekt des ATP auf einer Freisetzung des PorB-Ngo von Chaperonproteinen.

Da sich die Zugabe von MgCl₂ positiv auf die Importeffizienz von PorB-Ngo in Mitochondrien ausgewirkt hatte (siehe Abb. 4.13), wurde sie nach Reisolierung der Mitochondrien mit der Zugabe von ATP kombiniert (Abb. 4.18 A).

A:



B:

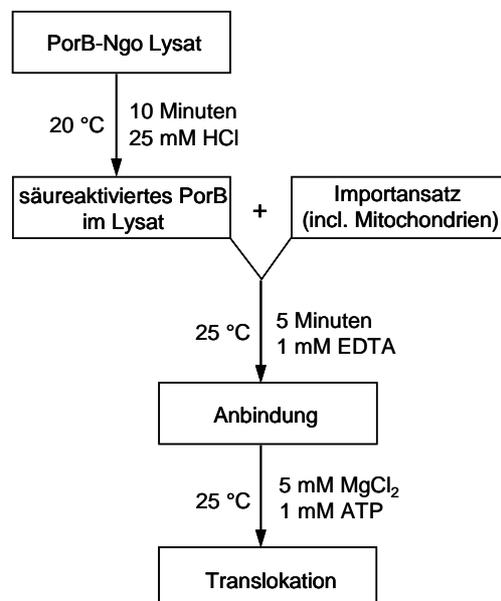


Abb. 4.18 A: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo nach Zugabe von ATP, MgCl₂ und ATP + MgCl₂

Das optimierte Importprotokoll (siehe Abb. 4.18 B) wurde mit 15 % Retikulozytenlysat, 1 mM EDTA, ohne ATP im Importansatz eingesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation und 2 µl Lysatzugabe wurden die Mitochondrien reisoliert und in SM-Puffer resuspendiert. 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂ und in der gleichen Konzentration beides gemeinsam wurde zu je einer Probe Mitochondrien in SM-Puffer gegeben, wo für 5 Minuten die Translokation bei 25 °C ablief. Die Proteinbanden wurden autoradiographisch quantifiziert.

B: Optimiertes Protokoll zum Import von PorB-Ngo in Mitochondrien

Nach 10-minütiger Säureaktivierung des PorB-Ngo im Lysat wird es zu den Mitochondrien im Importansatz zugegeben. In den nächsten 5 Minuten findet in Gegenwart von 1 mM EDTA im Importansatz die Anbindung des Proteins an die mitochondriale Oberfläche statt. Nach Reisolierung der Mitochondrien wird durch Zugabe von 5 mM MgCl₂ und 1 mM ATP die Translokation des PorB-Ngo über die mitochondriale Membran erreicht.

Die Kombination der beiden Komponenten ATP und $MgCl_2$ war für die Translokation von PorB-Ngo am effektivsten. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass die Zugabe des MgATP nicht essentiell war. Auch ohne die Zugabe des MgATP ließ sich ein erheblicher Teil des PorB-Ngo importieren. Für die weiteren Experimente war es aber entscheidend, dass nun ein Weg gefunden war, die Aggregation des PorB-Ngo während der Importreaktion zu umgehen. Nachfolgende Importexperimente des PorB-Ngo wurden nach diesem optimierten Protokoll (Abb. 4.18 B) durchgeführt.

2.4.16 Importkinetik von PorB-Ngo in Hefemitochondrien

Nach der Optimierung der Importbedingungen wurde erneut die Importkinetik des PorB-Ngo ermittelt. In einem ersten Experiment wurden sowohl die Zeiten der Anbindung, als auch die Zeiten der anschließenden Inkubation in Gegenwart von ATP variiert (Abb. 4.19).

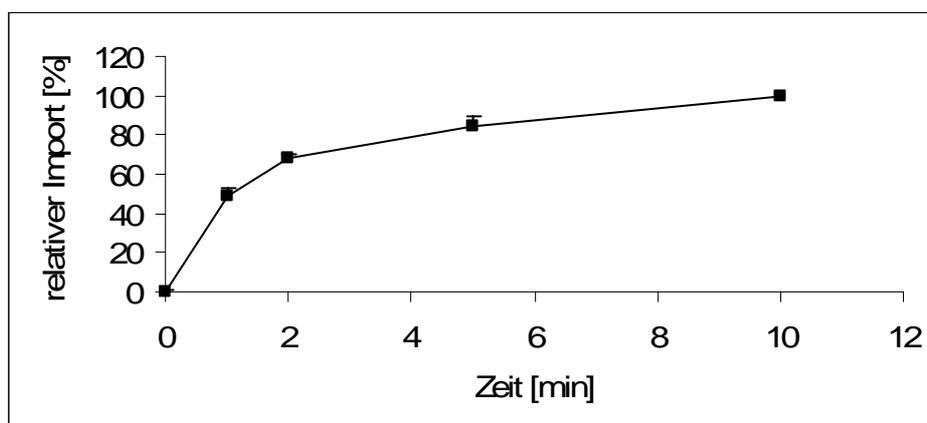


Abb. 4.19: Quantifizierung der Importkinetik von PorB-Ngo in Hefemitochondrien

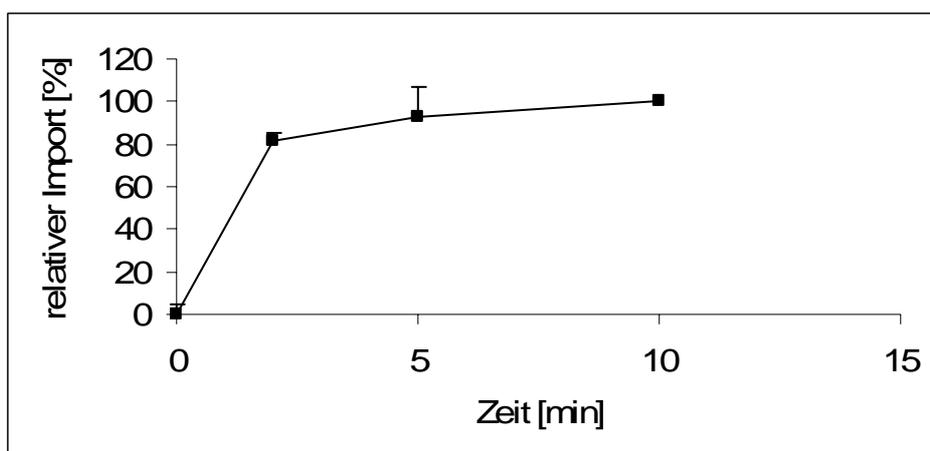
Das säureaktivierte Lysat wurde zum optimierten Importansatz (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) zugegeben und nach 1, 2, 5 und 10 Minuten durch $S_{500}EM$ -Puffer und Überführen auf Eis die Anbindungsreaktion gestoppt. Nach Reisolierung in SM-Puffer mit MgATP wurde für 1, 2, 5 und 10 Minuten auf 25 °C die Translokation abgewartet. Durch Inkubation mit 50 $\mu g/ml$ PK wurde die Reaktion beendet. Nach SDS-PAGE wurden die Banden autoradiographisch ausgewertet. Anhand der maximal erreichten Importeffizienz (100 %) wurde der relative Import [%] berechnet. [n=3]

Nach dem optimierten Importprotokoll ließ sich PorB-Ngo effizient in Hefemitochondrien importieren. Anhand der Kinetik wurde deutlich, dass sich ein großer Teil des PorB-Ngo innerhalb weniger Minuten in die Mitochondrien importieren ließ. Nach 5 Minuten waren bereits über 80 % des nach 10 Minuten Importzeit detektierten Proteins in den Mitochondrien zu lokalisieren.

2.4.17 Zeitabhängigkeit der Anbindung und Translokation

Um den zeitabhängigen Schritt des PorB-Ngo Imports zu identifizieren, wurden die Inkubationszeiten der Anbindungs- und Translokationsreaktion unabhängig voneinander verändert. Bei Veränderung der Anbindungszeit wurde 5 Minuten für die Translokation inkubiert und umgekehrt (Abb. 4.20).

A:



B:

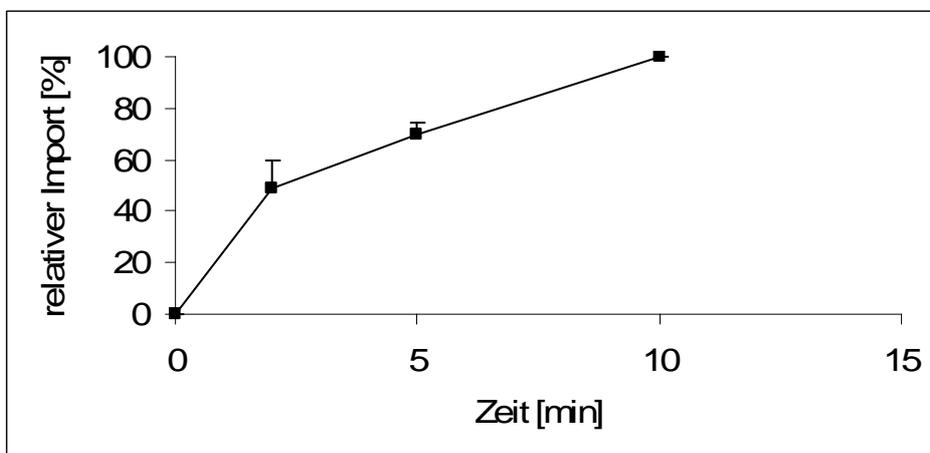


Abb.4.20: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo nach Veränderung der Anbindungs- (A) und Translokationszeit (B)

Das säureaktivierte Lysat wurde zum optimierten Importansatz (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) zugegeben und durch S_{500} EM-Puffer und Überführen auf Eis die Anbindungsreaktion gestoppt. Nach Reisolierung in SM-Puffer mit ATP und $MgCl_2$ wurde bei einer Temperatur von 25 °C die Translokation abgewartet. Durch Inkubation für 10 Minuten mit 50 μ g/ml PK und anschließend mit PMSF wurde die Reaktion beendet. Nach SDS-PAGE wurden die Banden autoradiographisch ausgewertet [n=2].

Abb. A: Anbindung 2, 5 und 10 Minuten; Translokation 5 Minuten

Abb. B: Anbindung 5 Minuten; Translokation 2, 5 und 10 Minuten

Während die Anbindung sehr schnell ablief und bereits nach 2 Minuten keine nennenswerte Steigerung der Bindung mehr zu beobachten war, erfolgte die Translokation in der zweiten Inkubation relativ langsam. Nach 2 Minuten war erst annähernd die Hälfte des maximal importierten Proteins transloziert. Offensichtlich ist die Translokation über die mitochondriale Außenmembran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des PorB-Ngo Imports.

2.4.18 *In vitro* Proteinimport in Säugetiermitochondrien

Nachdem für das PorB-Ngo ein praktikables Protokoll zu einem Import in isolierte Hefemitochondrien entwickelt worden war, stellte sich die Frage, ob dieses Protokoll auch zum Import in Säugermitochondrien verwendet werden könnte. Gegebenenfalls wäre dies eine Möglichkeit, die Untersuchungen auch auf Mitochondrien auszudehnen, die aus Zellen stammen, die tatsächlich von *Neisseria gonorrhoeae* infiziert werden. Zumindest sollte die Spezifität der Importreaktion unter Verwendung isolierter Mitochondrien aus Rattenleber, als einem weiteren anerkannten Modellsystem überprüft werden.

4.1.1.3 *In vitro* Proteinimport von PorB-Ngo in Rattenlebermitochondrien

Mitochondrien wurden aus den Leberzellen einer jungen Ratte isoliert, unmittelbar anschließend wurden Experimente zum Import des PorB-Ngo, sowie des VDAC durchgeführt. Der Proteinimport erfolgte direkt im Anschluss an die Isolierung der Mitochondrien, da diese bereits 3 bis 4 Stunden nach der Isolierung ihr Membranpotential verlieren und dann nicht mehr für einen Proteinimport geeignet sind.

Für VDAC ist nicht nur bekannt, dass er sehr effizient in Hefemitochondrien importiert werden kann, es konnte auch bereits gezeigt werden, dass die Importeffizienz in Rattenlebermitochondrien vergleichbar mit der in Hefemitochondrien ist [8]. Der Import des VDAC wurde nach dem Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) durchgeführt (Abb. 4.21).

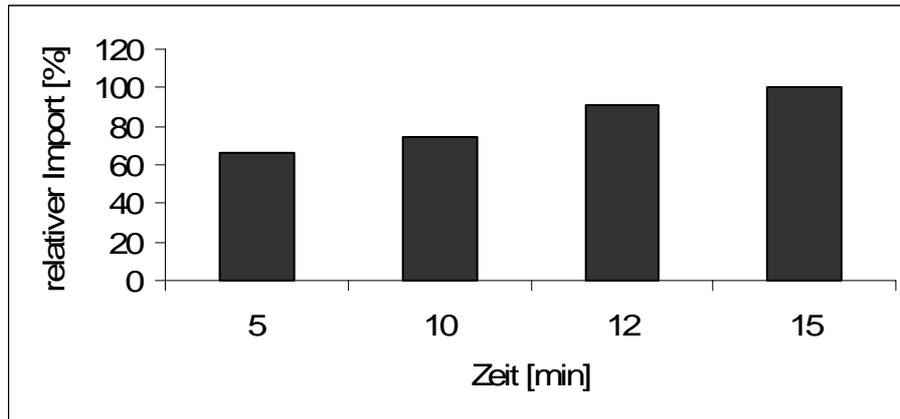


Abb. 4.21: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC in Rattenlebermitochondrien

2 μ l Lysat wurden je in einem 50 μ l Ansatz zu 30 μ g Mitochondrien gegeben und jeweils für 5, 10, 12 und 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μ g/ml PK gestoppt. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die quantifizierten Banden bezogen auf eine 2 μ l Lysatprobe ausgewertet und anschließend der relative Import berechnet.

Anhand der Kinetik war zu sehen, dass VDAC erfolgreich in die isolierten Rattenlebermitochondrien importiert werden konnte. Die Importreaktion lief sehr schnell ab, nach 5 Minuten Importzeit konnten bereits über 60 % des nach 15 Minuten detektierten Proteins in den Mitochondrien lokalisiert werden.

Um PorB-Ngo in Rattenlebermitochondrien zu importieren, wurde das für den Import in Hefemitochondrien etablierte optimierte Importprotokoll verwendet (Abb. 4.18 B).

Das PorB-Ngo wurde also zunächst mit HCl säureaktiviert, dann in Gegenwart von EDTA bei neutralem pH an die Mitochondrien angebunden und schließlich nach Reisolierung der Mitochondrien in Gegenwart von MgATP importiert. Wie beim Import des VDAC in Rattenlebermitochondrien wurde eine Importkinetik erstellt (Abb. 4.22).

Unter den gewählten Bedingungen ließ sich das PorB von *Neisseria gonorrhoeae* mit ähnlicher Effizienz wie in Hefemitochondrien auch in die Rattenlebermitochondrien importieren. Die Importreaktion verlief vergleichsweise langsam, zeigte aber auch nach 10 Minuten noch eine deutliche Zunahme der Menge des importierten Proteins.

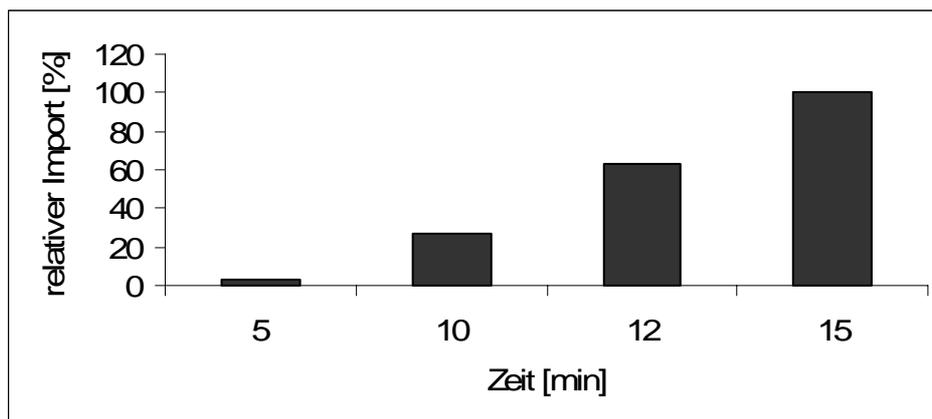


Abb. 4.22: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo in Rattenlebermitochondrien

2 μ l säureaktiviertes Retikulozytenlysat wurden im optimierten Importansatz (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) eingesetzt und 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Anbindungsreaktion wurde gestoppt und die Mitochondrien wurden in SM-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ATP und $MgCl_2$ wurden die Proben für 5, 10, 12 und 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch 50 μ g/ml PK und Zugabe von PMSF wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, autoradiographisch ausgewertet und der relative Import anhand der höchsten Importeffizienz ermittelt.

So bestätigte das Experiment zum einen die Verlässlichkeit des neuen Importprotokolls, zum anderen aber auch die Validität der Hefemitochondrien als Modellsystem für Untersuchungen zum mitochondrialen Proteinimport.

4.1.1.4 *In vitro* Proteinimport von PorB-Ngo in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen

Um PorB-Ngo in Mitochondrien authentischer humaner Zellen zu importieren, wurden humane Leukämie T-Zellen in Kultur genommen und deren Mitochondrien isoliert (siehe 3.4.3). Anschließend wurde, wie bei den Rattenlebermitochondrien (Abb. 4.21), als Kontrolle gleichzeitig der VDAC zeitabhängig in die Mitochondrien aus Jurkat-Zellen importiert (Abb. 4.23).

VDAC konnte in Mitochondrien der humanen Jurkat-Zellen importiert werden. Die Kinetik zeigte eine stetige Zunahme des über die Außenmembran der Mitochondrien translozierten Proteins.

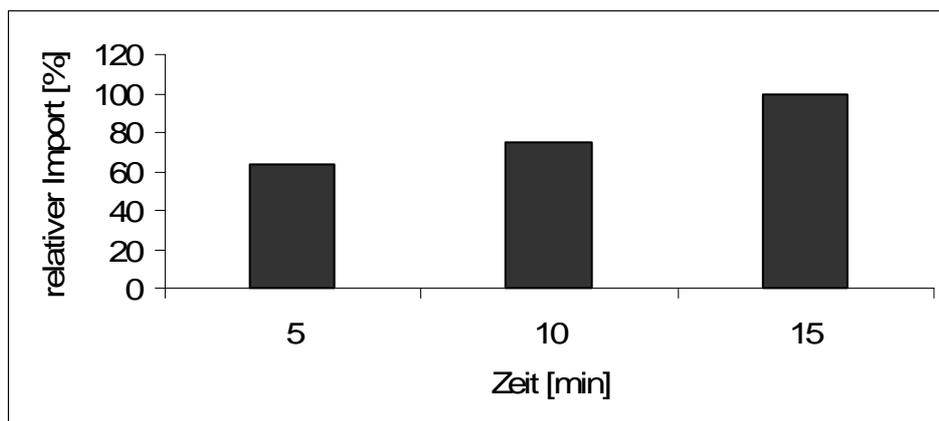


Abb. 4.23: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC in Mitochondrien aus Jurkat

Zellen

2 μ l VDAC Lysat wurden in je einem 50 μ l Standardimportansatz mit 30 μ g Mitochondrien aus Jurkat-Zellen für jeweils 5, 10 und 15 Minuten inkubiert. Nach Stoppen der Importreaktion durch 150 μ g/ml Proteinase K, die wiederum durch PMSF inhibiert wurde, Auftrennung durch SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die Banden ausgewertet. Die Signalintensitäten wurden auf eine Probe mit 2 μ l VDAC Lysat bezogen. Dabei wurde die höchste Importeffizienz des VDAC einem relativen Import von 100 % gleichgesetzt, weitere Werte wurden bezogen auf diesen Wert berechnet.

Wie beim Import des PorB-Ngo in Rattenleber- und Hefemitochondrien, wurde für den Import des PorB-Ngo in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen das optimierte Importprotokoll mit Anbindung und anschließender Translokation nach Reisolierung angewendet (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B). Für die Anbindungs- und Translokationsreaktion wurden die Ansätze jeweils 5 Minuten inkubiert (Abb. 4.24).

Die Ergebnisse zeigten, dass PorB-Ngo nach dem optimierten Importprotokoll auch in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen importiert werden konnte. Die Effizienz wurde anhand des radioaktiven Signals im Niederschlag der Probe mit Mitochondrien nach Behandlung mit Proteinase K ermittelt und lag bei 22 %. Da in der Probe ohne Mitochondrien mit Proteinase K kein Signal zu sehen war, konnte davon ausgegangen werden, dass in diesem Experiment alle Proteine außerhalb der mitochondrialen Membranen von der Proteinase K abgebaut werden konnten und keine proteaseresistenten Aggregate vorhanden waren.

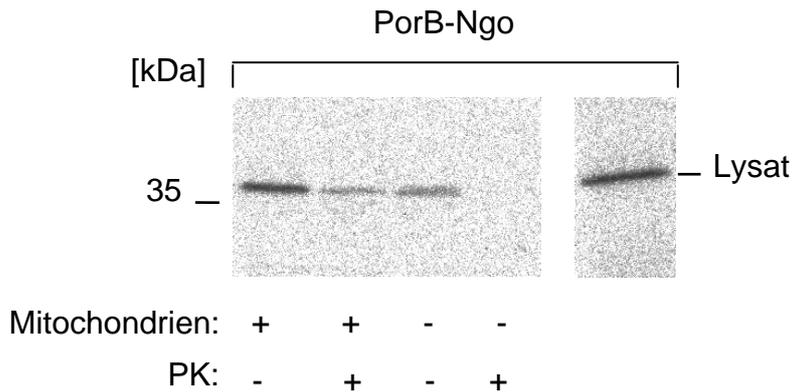


Abb. 4.24: SDS-Polyacrylamidgel der Importeffizienz von PorB-Ngo in Jurkat-

Mitochondrien

Je 2 µl PorB-Ngo Lysat wurden nach dem optimierten Importprotokoll (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) in 15 µg Mitochondrien importiert. Parallel zu den Proben mit Mitochondrien wurden auch Proben ohne Mitochondrien mitbehandelt, um den Anteil des aggregierten Proteins bestimmen zu können. Zusätzlich wurden auch Proben ohne PK-Behandlung auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, um im Vergleich der Proben ohne und mit PK die Anbindung des Proteins an die Mitochondrien zu kontrollieren.

Da für die Isolierung weiterer humaner Mitochondrien keine Jurkat-Zellen mehr zur Verfügung standen, konnten mit den humanen Mitochondrien zunächst keine weiteren Experimente durchgeführt werden. Die erhaltenen Daten weisen aber bereits darauf hin, dass wesentliche Ergebnisse, die mit dem besser zugänglichen Modellsystem der Hefemitochondrien gewonnen wurden, auch auf die Verhältnisse humaner Mitochondrien übertragbar sein sollten.

2.4.19 *In vitro* Import von PorB-Nme und PorB-Nmu in Mitochondrien

Neisseria gonorrhoeae und *Neisseria meningitidis* sind die einzigen primär pathogenen Spezies der Neisserien. Das PorB-Nme von *Neisseria meningitidis* weist zu 78 % identische Aminosäuren zum PorB-Ngo von *Neisseria gonorrhoeae* auf. Auch das PorB-Nme von *Neisseria meningitidis* interagiert mit Wirtszellen und lagert sich in deren Mitochondrien ein. Massari et. al. konnten zeigen, dass PorB-Nme von *Neisseria meningitidis* Zellen vor Apoptose schützt. Mit PorB-Nme vorbehandelte Zellen zeigten geringere oder keine Beschädigung der Mitochondrien durch apoptotische Stimuli [157]. Trotz der Sequenzhomologie von PorB-Ngo und PorB-Nme scheinen somit beide Porine

in den Wirtszellen letztlich gegenteilige Effekte zu induzieren [1]. Vor diesem Hintergrund war es deshalb von Interesse nun auch das PorB-Nme anhand des optimierten Protokolls (Abb. 4.18 B), das für den Import von PorB-Ngo etabliert worden war, in Mitochondrien zu importieren.

Neisseria mucosae ist ein opportunistischer Keim, der im menschlichen Nasopharynx vorkommt. PorB-Nmu weist zu 47 % identische Aminosäuren zu PorB-Ngo auf. Da das PorB-Nmu bei einer Infektion im Zytosol der infizierten Zelle bleibt [158] und sich in der Wirtszelle nicht in Mitochondrien einlagert, diente dieses Protein in den folgenden Importexperimenten als Negativkontrolle.

4.1.1.5 *In vitro* Transkription und Translation von PorB-Nme und PorB-Nmu

PorB-Nme stand in einem pYES2-Vektor unter der Kontrolle des T7-Promotors, PorB-Nmu in einem pGEM4Z-Vektor unter der Kontrolle des Sp6-Promotors zur Verfügung. Die Proteine wurden *in vitro* in einer gekoppelten Transkriptions-, Translationsreaktion in Kaninchen-Retikulozytenlysats synthetisiert und dabei mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Hierfür wurden wieder die Reagenzien des Translationssystems TNT® T7 und Sp6 *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* verwendet. Je 2 µl der synthetisierten Proteine in Retikulozytenlysats wurden in Laemmli-Probenpuffer auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und am nächsten Tag autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.25).

Das errechnete Molekulargewicht von PorB-Nme (33,8 kDa) und PorB-Nmu (37,8 kDa) wurde durch die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel bestätigt. Die zweite Proteinbande in der Spur des PorB-Nmu Lysats, auf der Höhe von etwa 26 kDa, ist durch ein Methionin-Codon innerhalb der Sequenz des PorB-Nmu zu erklären, das von den Ribosomen des Retikulozytenlysats offenbar als zweites Startcodon erkannt wird.

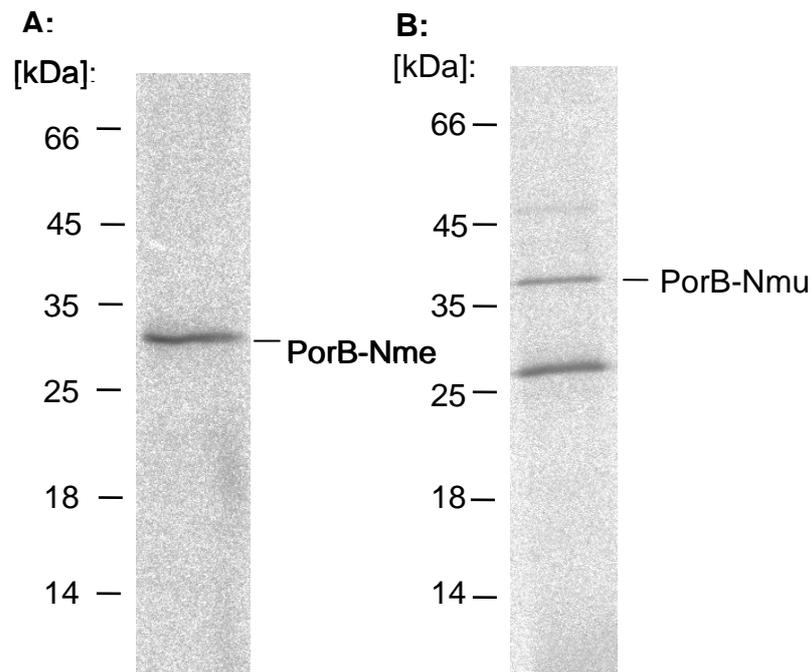


Abb. 4.25: SDS-Polyacrylamidgel von PorB-Nme (A) und PorB-Nmu (B)

Nach *in vitro* Transkription und Translation mit den Reagenzien des TNT® T7 und Sp6 *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* wurden 2 µl synthetisiertes Protein im Lysat auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das radioaktive Signal über Autoradiographie ermittelt.

4.1.1.6 HCl-Titration von PorB-Nme

Da sich die Importeffizienz des PorB-Ngo durch eine Säureaktivierung steigern ließ, wurde nun auch mit den Retikulozytenlysaten des PorB-Nme und PorB-Nmu eine Säureaktivierung durchgeführt. Für PorB-Nme wurden zunächst HCl-Konzentrationen von 20 bzw. 40 mM HCl gewählt und das Protein wurde anschließend in einem ersten Experiment unter Standardbedingungen in Hefemitochondrien importiert (siehe 3.4.10). Zur Kontrolle der Aggregation wurden Proben ohne Mitochondrien in das Experiment mit einbezogen. Da die Proteasesensitivität des PorB-Nme zunächst nicht bekannt war, wurde mit 150 µg/ml Proteinase K eine vergleichsweise hohe Konzentration der Protease gewählt (Abb. 4.26).

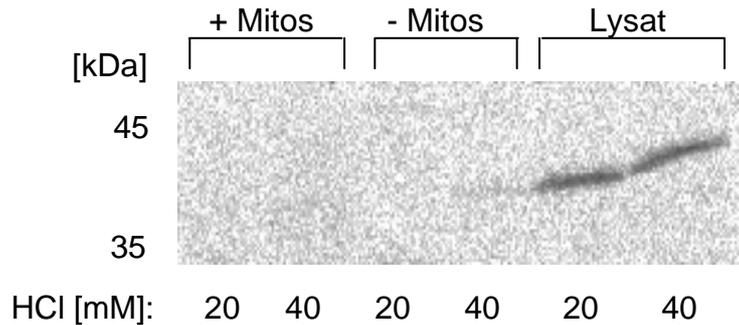


Abb. 4.26: SDS-Polyacrylamidgel der HCl-Titration von PorB-Nme

Jeweils 2 μ l PorB-Nme Lysat wurden mit 20 bzw. 40 mM HCl säureaktiviert und im 50 μ l Importansatz mit 30 μ g Hefemitochondrien inkubiert. Durch Inkubation der Proben für 10 Minuten mit 150 μ g/ml PK wurde das nicht importierte Protein abgebaut. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von PMSF zum Ansatz wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend durch einen Phosphorimager das radioaktive Signal des Proteins sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 4.26 zu sehen ist, konnte unter diesen Bedingungen kein Import des PorB-Nme festgestellt werden. Möglicherweise war die in diesem Experiment eingesetzte Konzentration der Proteinase K von 150 μ g/ml zu hoch, sodass die Mitochondrien lysiert wurden. Für die weiteren Experimente wurden, analog zur HCl-Konzentration für die Aktivierung von PorB-Ngo, auch für PorB-Nme und PorB-Nmu 25 mM HCl eingesetzt.

4.1.1.7 Proteinase K-Sensitivitätstest von PorB-Nme und PorB-Nmu

Das erste Experiment zum Import des PorB-Nme hatte gezeigt, dass die Mitochondrien durch eine Behandlung mit 150 μ g/ml Proteinase K möglicherweise zerstört werden. Es wurde deshalb geprüft, ob sich PorB-Nme und PorB-Nmu auch bei geringeren Proteasekonzentrationen hydrolysieren ließen.

Für PorB-Nme wurde eine Protease-Sensitivitätsbestimmung im Importansatz durchgeführt, bei der Proben mit und ohne Mitochondrien behandelt wurden (Abb. 4.27). Die Proteinase K wurde in Konzentrationen von 20 bis 100 μ g/ml eingesetzt.

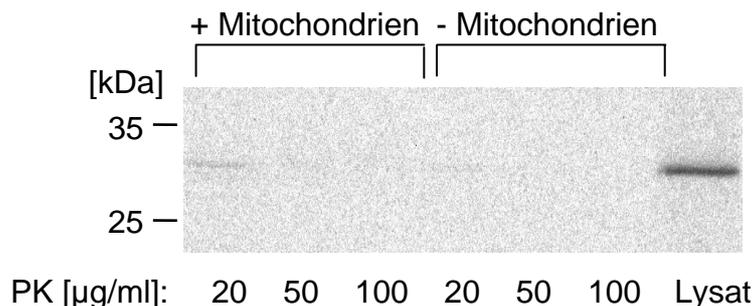


Abb. 4.27: SDS-Polyacrylamidgel des Proteinase K-Sensitivitätstests von PorB-Nme

Das Retikulozytenlysat wurde mit 25 mM HCl aktiviert und je 2 µl im Standardimportansatz mit 30 µg bzw. ohne Mitochondrien für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Mit 20, 50 und 100 µg/ml PK wurde die Reaktion gestoppt. Die Banden wurden nach SDS-PAGE über einen Phosphorimager sichtbar gemacht.

Unter diesen Bedingungen war eine Proteinase K-Konzentration von 50 µg/ml ausreichend, um das PorB-Nme vollständig abzubauen. In Gegenwart von 20 µg/ml blieb hingegen noch ein Teil des Proteins erhalten. In den folgenden Experimenten zum Import des PorB-Nme wurde die Proteinase K deshalb in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

Die Proteinase K-Sensitivität von PorB-Nmu wurde in SEM bestimmt. PK-Konzentrationen von 20 bis 200 µg/ml wurden zum Lysat in SEM zugegeben und die Reaktion wurde durch PMSF gestoppt. Analog zu den Ergebnissen der HCl-Titrations für die Aktivierung von PorB-Ngo wurden für die Aktivierung von PorB-Nmu 25 mM HCl eingesetzt. Der Proteinase K Sensitivitätstest wurde mit und ohne HCl durchgeführt (Abb. 4.28).

Unabhängig von der Säureaktivierung konnte das PorB-Nmu selbst bei einer Konzentration von 200 µg/ml Proteinase K nicht vollständig hydrolysiert werden. Die Proteinase K-Konzentration konnte nicht höher gewählt werden, da sonst die Mitochondrien von der Protease angegriffen werden. Daher wurden in folgenden Versuchen 100 µg/ml Proteinase K eingesetzt. Parallel wurden Proben ohne Mitochondrien behandelt, um die unabhängig vom Import bei der Proteasebehandlung übrig bleibenden Anteile von der ermittelten Importeffizienz in den Proben mit Mitochondrien abzuziehen.

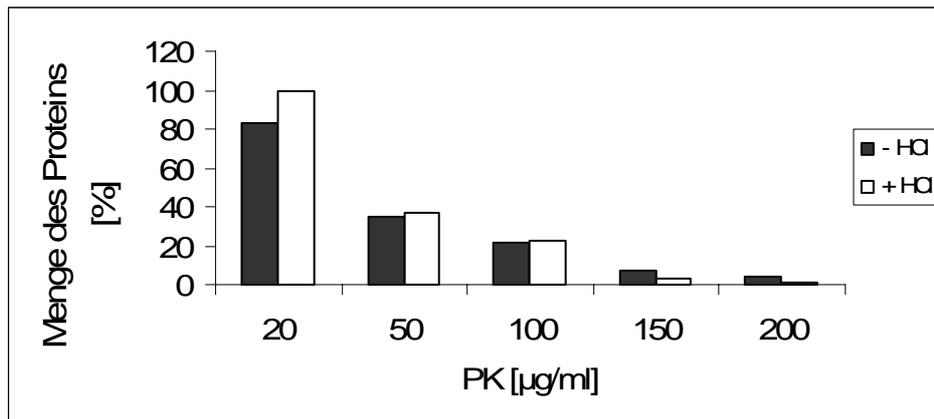


Abb. 4.28: Quantifizierung des Proteinase K Sensitivitätstests von PorB-Nmu

Je 1 μl Lysat wurde in SEM für 10 Minuten mit 20, 50, 100, 150 und 200 $\mu\text{g/ml}$ PK auf Eis inkubiert. Die Hälfte der Proben wurde zuvor mit 25 mM HCl aktiviert, die andere Hälfte der Lysatproben wurde direkt mit Proteinase K behandelt. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, autoradiographisch ausgewertet und anhand einer Probe ohne Proteinase K quantifiziert.

4.1.1.8 *In vitro* Import von PorB-Nme und PorB-Nmu in Hefemitochondrien

PorB-Nme wurde in Hefemitochondrien des Stamms YPH499 importiert (Abb. 4.29). Hierzu wurde das ursprünglich für PorB-Ngo etablierte Importprotokoll mit getrennter Anbindung und Translokation verwendet (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B). PorB-Nme konnte in die Hefemitochondrien importiert werden, die Importeffizienz des PorB-Nme war allerdings wesentlich geringer als die Effizienzen, die zuvor für das PorB-Ngo beobachtet worden waren. Die Quantifizierung der in Abbildung 4.29 gezeigten Banden ergab, dass lediglich 3,3 % des im Importansatz eingesetzten PorB-Nme in die Mitochondrien importiert worden war.

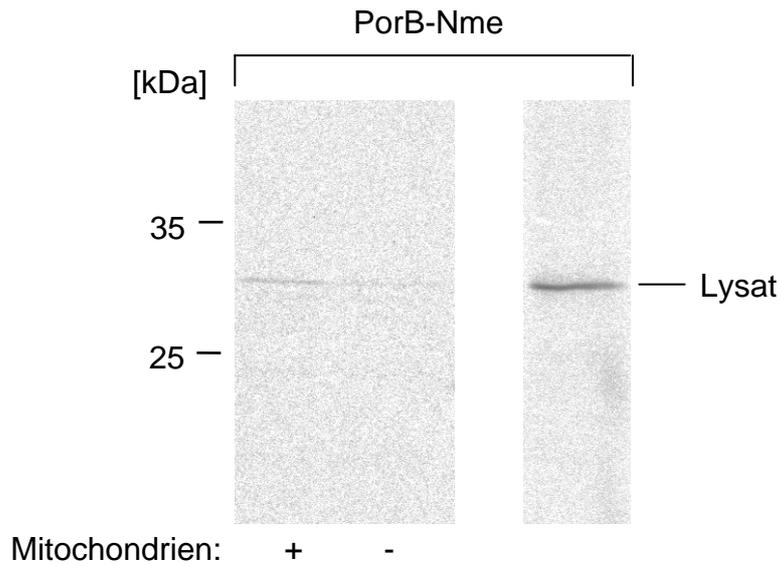


Abb. 4.29: Import von PorB-Nme in Hefemitochondrien

Je 2 μ l Retikulozytenlysat wurden HCl-aktiviert und für 5 Minuten in Gegenwart von 1 mM EDTA mit 15 μ g bzw. ohne Mitochondrien inkubiert. Nach Reisolierung wurden die Mitochondrien in SM-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten in Gegenwart von ATP und $MgCl_2$ inkubiert. Der Import des PorB-Nme wurde durch Zugabe von 50 μ g/ml PK beendet, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das radioaktive Signal des Proteins durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht.

PorB-Nmu wurde nach dem gleichen Importprotokoll mit Hefemitochondrien inkubiert wie zuvor PorB-Ngo und PorB-Nme (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B). PorB-Nmu wurde also zunächst säureaktiviert und dann in zwei Schritten erst an die Mitochondrien angebunden und dann für die Translokation mit den Mitochondrien in Gegenwart von MgATP inkubiert (Abb. 4.30). Um gegebenenfalls eine endogene Proteaseresistenz bzw. eine Aggregation des PorB-Nmu kontrollieren zu können, wurden Proben ohne Mitochondrien in das Experiment einbezogen. Das Ausmaß der Anbindung des PorB-Nmu an die Mitochondrien wurde durch je eine Probe ohne PK-Behandlung ermittelt.

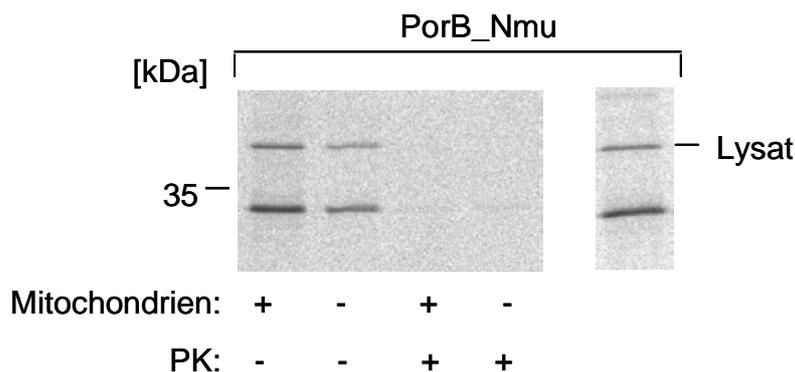


Abb. 4.30: Import von PorB-Nmu in Hefemitochondrien

PorB-Nmu wurde säureaktiviert und nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) in Hefemitochondrien des Stamms YPH499 importiert. Die Importreaktion wurde entweder mit 100 µg/ml Proteinase K oder bei den Proben ohne PK durch Zentrifugation der Proben gestoppt. Die Proben wurden zusammen mit einer Probe PorB-Nmu Lysat auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Autoradiographie das radioaktive Signal des Proteins sichtbar gemacht.

Nachdem das PorB-Nmu in SEM-Puffer eine außerordentlich hohe Proteaseresistenz gezeigt hatte (Abb. 4.28), fiel das Ergebnis des Importexperiments überraschend eindeutig aus. Das PorB-Nmu zeigte nur eine geringfügige Assoziation mit den Mitochondrien, und es ließ sich keinerlei Import des Proteins in die Mitochondrien nachweisen.

Möglicherweise war die Anlagerung des PorB-Nmu an die Oberfläche der Mitochondrien mit einer teilweisen Entfaltung des Proteins verbunden, was die überraschend vollständige Hydrolyse des Proteins durch Proteinase K erklären könnte. Der Befund, dass PorB-Nmu *in vitro* keinerlei Import in Mitochondrien zeigte, steht in Übereinstimmung mit früheren Daten von Müller et al. (2000), nach denen ein mitochondrialer Import des PorB-Nmu auch in intakten Säugerzellen nicht zu beobachten ist. In diesem Fall sind Hefemitochondrien offenbar ein geeignetes Modellsystem, um auch Unterschiede in der Importkompetenz verschiedener bakterieller Porine nachzuweisen.

4.1.1.9 *In vitro* Import von PorB-Nme in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen

Neisseria meningitidis ist, wie *Neisseria gonorrhoeae* ein humanpathogener Erreger, weshalb das PorB-Nme ebenfalls in Mitochondrien der humanen Jurkat-Zellen importiert wurde (siehe 3.4.10, Abb. 4.31). Das optimierte

Importprotokoll (Abb. 4.18 B) wurde weitgehend beibehalten, im Importansatz wurde lediglich Natriumsuccinat anstelle von NADH eingesetzt, um die Aktivität der Atmungskette in den Mitochondrien der humanen Zellen aufrecht zu erhalten.

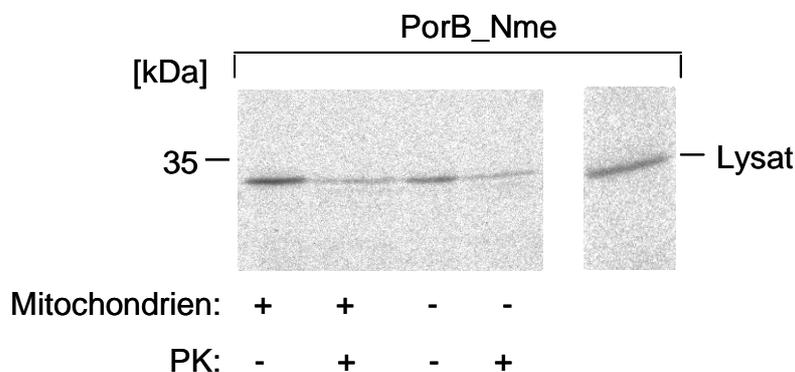


Abb. 4.31: Import von PorB-Nme in Jurkat-Mitochondrien

PorB-Nme wurde im Retikulozytenlysat mit 25 mM HCl säureaktiviert und je 2 µl im 25 µl Ansatz mit 15 µg bzw. ohne Mitochondrien für 5 Minuten inkubiert. Die Translokationszeit nach Reisolierung der Mitochondrien wurde nach 5 Minuten durch 50 µg/ml PK gestoppt. Nach Beenden der Reaktion durch PMSF wurden die Proben zusammen mit einer Lysatprobe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

PorB-Nme ließ sich auch in Mitochondrien der humanen Leukämie T-Zelllinie Jurkat importieren. Die Importeffizienz war allerdings sehr gering, sie lag bei 2 %. Die Proteinbande, in deren Ansatz keine Mitochondrien enthalten waren, deutete auf einen hohen Anteil an proteaseresistenten Aggregaten hin. Gleichwohl war auffällig, dass PorB-Nme sich sowohl in Säuger- als auch in Hefemitochondrien nur mit geringer Effizienz importieren ließ, während PorB-Ngo in beiden Fällen sehr effizient importiert werden konnte (Abb. 4.19, 4.20, 4.22, 4.24).

4.2 Interaktionspartner beim *in vitro* Import von PorB-Ngo in Mitochondrien

Die Porine vom Typ PorB sind die häufigsten Außenmembranproteine der pathogenen Neisserien, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*. Beide Porine werden von den Bakterien während einer Infektion an die Umgebung abgegeben und gelangen auf bislang noch nicht näher charakterisierten Wegen zu den Mitochondrien der infizierten Gewebe [1].

Speziell für das PorB-Ngo von *Neisseria gonorrhoeae* wurde in diesem Zusammenhang eine Auslösung von Apoptose beschrieben [6], [14]. Ist in einer Wirtszelle die Apoptose ausgelöst worden, wird aus den Mitochondrien Cytochrom c freigesetzt. Dieses verbindet sich im Zytosol mit Apaf1 und der entstandene Komplex aktiviert das Caspasesystem, wodurch schließlich die verschiedenen Prozesse der Apoptose initiiert werden. Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde ein *in vitro* System entwickelt, das erstmals einen effizienten Import des PorB-Ngo in isolierte Mitochondrien erlaubte. Damit ließ sich bereits ein wesentlicher Schritt *in vitro* rekonstruieren, der zu den Voraussetzungen einer PorB-Ngo-abhängigen Auslösung von Apoptose zählt.

Ausgehend von den nun gegebenen experimentellen Möglichkeiten wurde in weiteren Experimenten geprüft, ob sich an oder in den Mitochondrien Interaktionspartner des PorB-Ngo identifizieren ließen. Dabei war es das Ziel, zwei Fragen zu beantworten: (1.) Lassen sich in den Mitochondrien Proteine identifizieren, die dem PorB-Ngo als Zielstrukturen dienen und bei der Auslösung der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen? (2.) Lassen sich Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie identifizieren, die den Import des PorB-Ngo vermitteln? In den Untersuchungen wurden zu diesem Zweck zwei unterschiedliche experimentelle Strategien verfolgt: Zum einen wurde versucht, potentielle Partnerproteine durch chemische Quervernetzung zu identifizieren, zum anderen wurden Mitochondrien aus definierten Mutanten der Hefe isoliert und es wurde geprüft, ob sich im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien signifikante Unterschiede in den Wechselwirkungen mit dem PorB-Ngo nachweisen ließen.

2.4.20 Chemische Quervernetzung von PorB-Ngo nach *in vitro* Import in Hefemitochondrien

Durch eine chemische Quervernetzung können Proteine oder andere biologisch relevante Moleküle kovalent miteinander verbunden werden. Verschiedene bifunktionelle Quervernetzungsreagenzien sind kommerziell erhältlich. Die Methode erlaubt die Analyse von Nachbarschaftsbeziehungen und kann auch zur Identifizierung bislang unbekannter Partnerproteine eingesetzt werden. Die

Quervernetzung eines Proteins mit einem benachbarten Protein kann in der Regel mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels nachgewiesen werden. Die folgenden Versuche zur Quervernetzung des PorB-Ngo mit mitochondrialen Proteinen wurden nach Import des radioaktiv markierten PorB-Ngo in Hefemitochondrien durchgeführt, wobei unterschiedliche Quervernetzungsreagenzien getestet wurden.

4.2.1.1 Quervernetzung mit MBS

MBS (n-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester) ist ein wasserunlöslicher nicht spaltbarer Quervernetzer. Die reaktiven Gruppen von MBS sind NHS (N-Hydroxysuccinimid) Ester und Maleimid, die sich mit Amino- und Sulfhydrylgruppen verbinden. Der *in vitro* Import des PorB-Ngo in Hefemitochondrien wurde nach dem optimierten Importprotokoll (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) mit Säureaktivierung und separater Anbindung und Translokation an die Mitochondrien durchgeführt. Die Mitochondrien wurden nach dem Import des PorB-Ngo durch Zentrifugation reisoliert, in HS-Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH; pH 7,4) resuspendiert, und schließlich mit MBS inkubiert (siehe 3.5.8, Abb. 4.32).

In der Spur der Probe, die mit 1 mM MBS inkubiert worden war, ließ sich bei der Auswertung mit dem Phosphorimager eine zusätzliche Bande bei 46 kDa nachweisen (in Abbildung 4.32 mit * gekennzeichnet). Da nach Autoradiographie nur radioaktiv markierte Proteine auf dem Nachweisschirm sichtbar werden, konnte zunächst vermutet werden, dass sich das radioaktiv markierte PorB-Ngo, das ein Molekulargewicht von 36 kDa aufweist, mit einem 10 kDa großen Protein verbunden hatte. Möglicherweise war durch das Quervernetzungsreagenz aber auch nur ein Methionin-bindendes Protein des Retikulozytenlysats mit freiem radioaktiv markiertem Methionin gekoppelt worden. Bevor das Ergebnis abschließend beurteilt werden konnte, waren deshalb verschiedene Kontrollen erforderlich.

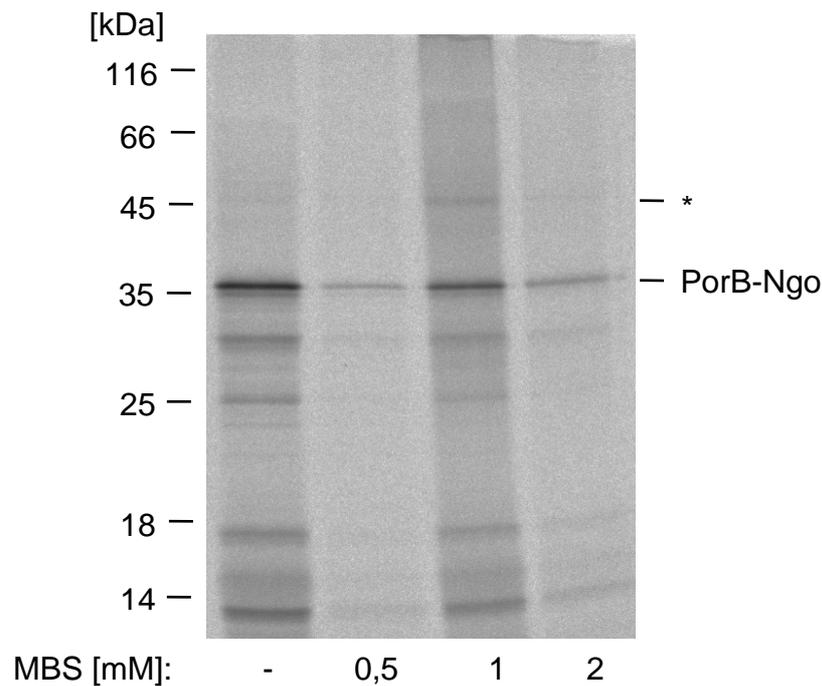


Abb. 4.32: SDS-Polyacrylamidgel der Quervernetzungsreaktion von PorB-Ngo durch unterschiedliche Konzentrationen an MBS

Das PorB-Ngo wurde im Retikulozytenlysat säureaktiviert, jeweils 2 μ l Lysat wurden in 15 μ g Mitochondrien nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) importiert. Nach Resuspension in HS-Puffer wurde der Ansatz mit 0,5; 1 und 2 mM MBS für 30 Minuten auf Eis inkubiert und die Reaktion durch Inkubation für 15 Minuten auf Eis mit Glycin gestoppt. Die Mitochondrien wurden nach einem Waschschrift in HS-Puffer auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und autoradiographisch ausgewertet.

So wurde zur Überprüfung der Reaktion mit MBS der AAC (ADP/ATP-Translokator) mit dem gleichen Reagenz quervernetzt. Der radioaktiv markierte AAC wurde in Hefemitochondrien importiert, wobei dem Importansatz das Entkopplungsreagenz Valinomycin zugegeben wurde. Durch die Aufhebung des Membranpotentials wurde das Protein während der Translokation im Intermembranraum arretiert. Mehrere frühere Studien hatten gezeigt, dass der AAC unter diesen Bedingungen an den Tim9/10-Komplex des Intermembranraums bindet und mit den Untereinheiten dieses Komplexes quervernetzt werden kann [159], [160], [160], [161]. Die Mitochondrien wurden nach Import des AAC bzw. des PorB-Ngo mit 1 mM MBS inkubiert (Abb. 4.33).

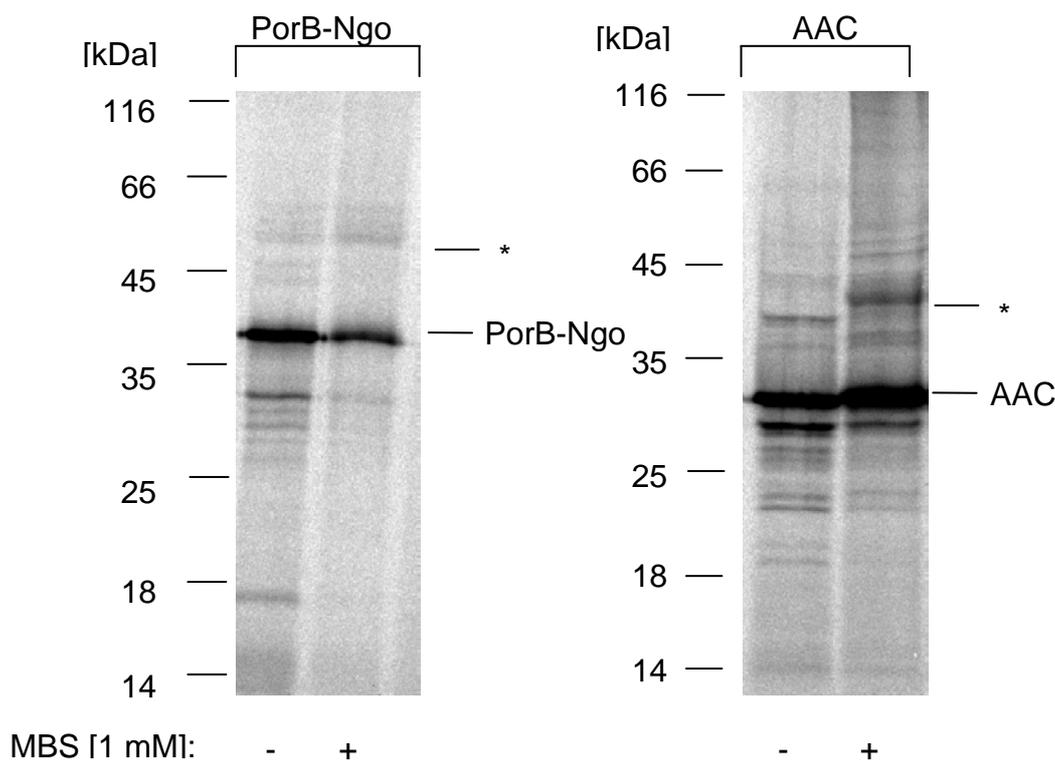


Abb. 4.33: SDS-Polyacrylamidgel der Quervernetzungsreaktion von PorB-Ngo und AAC durch 1 mM MBS

PorB-Ngo wurde HCl-aktiviert und nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B), der AAC nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) in Hefemitochondrien importiert. Die Quervernetzungsreaktion erfolgte nach Reisolierung der Mitochondrien in HS-Puffer durch Zugabe von 1 mM MBS und Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Inkubation mit Glycin für 15 Minuten auf Eis gestoppt (siehe 3.5.8) und die Proben anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie ausgewertet.

Tatsächlich ließ sich nach Import des AAC und Inkubation mit MBS ein Protein von etwa 40 kDa nachweisen (die Bande ist in Abbildung 4.33 mit einem Stern * gekennzeichnet). Bei diesem Protein handelte es sich offenbar um ein Quervernetzungsprodukt des AAC mit einem der kleinen Tim-Proteine [159], [160], [160]. Das verwendete Verfahren war somit im Prinzip geeignet, eine effiziente Quervernetzung importierter Proteine in den Mitochondrien zu erzielen.

Im parallel durchgeführten Versuch zur Quervernetzung des PorB-Ngo trat erneut die 45 kDa Proteinbande auf (in Abb. 4.33 mit ** gekennzeichnet). Deutlich ließ sich ein Protein der gleichen Größe allerdings auch in der Probe ohne Quervernetzungsreagenz nachweisen. Es wurde deshalb beschlossen, zunächst andere Quervernetzungsreagenzien zu testen.

4.2.1.2 Quervernetzung mit DSS, EGS und Sulfo-MBS

Als alternative Quervernetzungsreagenzien wurden DSS, EGS, und Sulfo-MBS verwendet. DSS (Disuccinimidyl suberate) ist ein homobifunktionaler, nicht spaltbarer, membrangängiger Quervernetzer. Als reaktive Gruppen enthält DSS zwei amino-reaktive NHS Ester, die sich mit primären Aminen verbinden. Der Quervernetzer EGS (Ethylenglykol-*bis*-succinimidylsuccinat) reagiert ebenfalls mit Aminogruppen. Sulfo-MBS (*n*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimidester) ist wasserlöslich, sonst weist es die gleichen Eigenschaften wie MBS auf (siehe 4.2.1.1). PorB-Ngo und AAC wurden erneut in Hefemitochondrien importiert und dann für 30 Minuten in getrennten Ansätzen mit den Quervernetzungsreagenzien inkubiert.

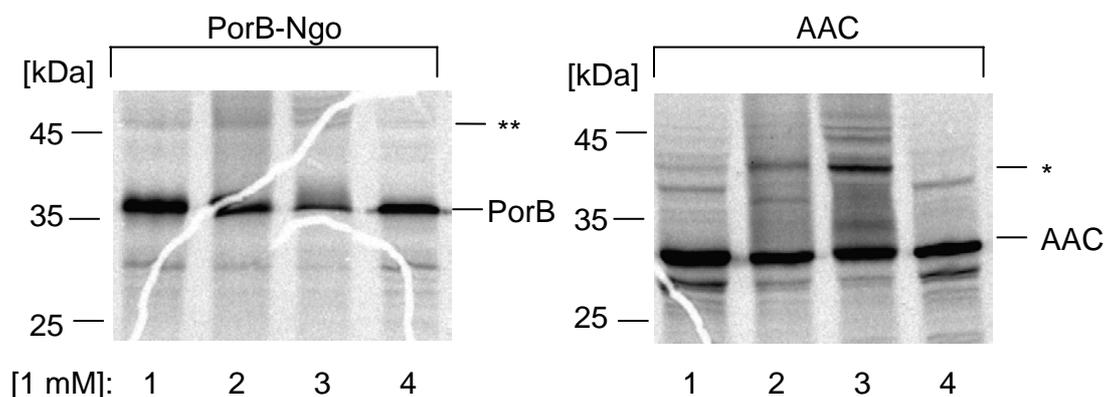


Abb. 4.34: SDS-Polyacrylamidgel der Quervernetzungsreaktion von PorB-Ngo und AAC durch 1 mM DSS, EGS und Sulfo-MBS

PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B), AAC nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) in Mitochondrien des Hefestamms YPH499 importiert. Nach Inkubation für 30 Minuten auf Eis mit 1 mM DSS, EGS und Sulfo-MBS und Stoppen der Reaktion durch Inkubation mit Glycin für 15 Minuten auf Eis (siehe 3.5.8) wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt.

1:DSS, 2:EGS, 3:Sulfo-MBS, 4: ohne Quervernetzungsreagenz

Nach Quervernetzung des PorB-Ngo mit DSS, EGS bzw. Sulfo-MBS konnte erneut das bereits nach Quervernetzung mit MBS beobachtete 45 kDa-Protein beobachtet werden (durch ** gekennzeichnet). Allerdings wurde ein Protein gleicher Größe auch in der Spur ohne Quervernetzungsreagenz gefunden. Für den AAC lieferte insbesondere die Reaktion mit Sulfo-MBS eine sehr effiziente Quervernetzung mit einem der kleinen Tim-Proteine (durch * gekennzeichnet).

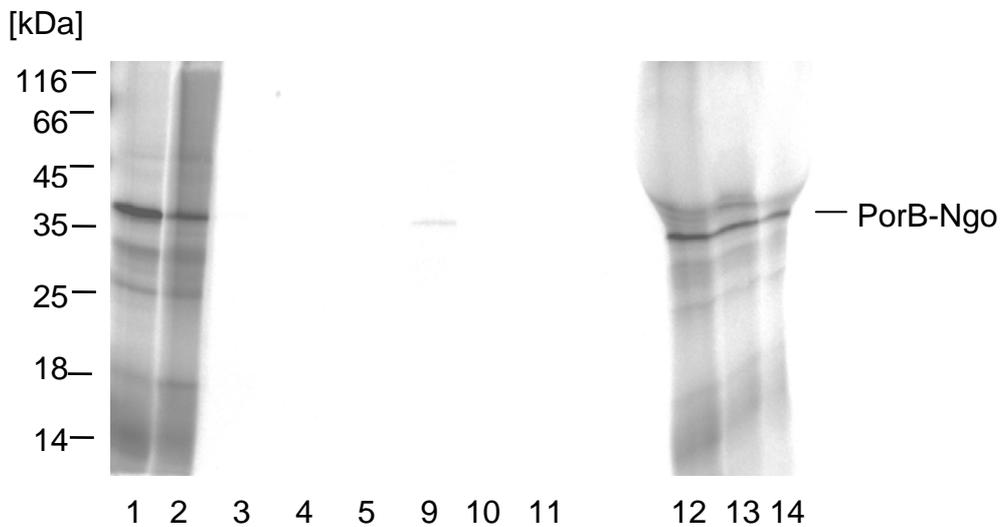
4.2.1.3 Versuche zur Immunfällung nach Quervernetzung mit MBS

Um aufzuklären, welches etwa 10 kDa große Protein zusammen mit PorB-Ngo nach Quervernetzung ein Vernetzungsprodukt von 45 kDa bildet, wurde eine Immunfällung mit Anti-Tim10 und Anti-Tim13 Serum durchgeführt (siehe 3.6.3). Die Proteine Tim10 und Tim13 gehören zur Gruppe der kleinen Tim-Proteine. Die „kleinen Tims“ sind im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert. Sie haben vor allem die Aufgabe hydrophobe Innenmembranproteine ohne N-terminale Präsequenz, wie zum Beispiel die Translokator-Proteine, am Kanal der generellen Importpore der Außenmembran aufzunehmen und sie durch den Intermembranraum der Mitochondrien zum Tim22 Komplex zu begleiten [162]. Die kleinen Tims sind auch für die Biogenese bestimmter Außenmembranproteine notwendig, was erklärt, warum die Porine einen intakten Intermembranraum für ihren Einbau in die Außenmembran benötigen. Sowohl der essentielle Tim9/Tim10-Komplex, als auch der nicht essentielle Tim8/Tim13-Komplex fördern den Transport von β -barrel Proteinen zum SAM-Komplex [159], [160].

Für die Quervernetzungsreaktion, die vor der Immunfällung durchgeführt werden sollte, wurden die Reagenzien MBS (siehe 4.2.1.1) und DSS (siehe 4.2.1.2) verwendet. Nach Import des PorB-Ngo in Mitochondrien und Quervernetzung für 30 Minuten wurden die Mitochondrien reisoliert, in Gegenwart von 1 % Triton X-100 lysiert und das Lysat für 45 Minuten mit Anti-Tim10 und Anti-Tim13 Antikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden schließlich mit Hilfe einer *MACS Separation Unit* (Miltenyi Biotec) abgetrennt (Abb. 4.35).

Bei der Auswertung am Phosphorimager war erneut das Protein mit dem Molekulargewicht von etwa 45 kDa zu sehen (Abb. 4.35 A und B, Spur 2). In den Spuren der Immunfällung waren jedoch keinerlei Reaktionsprodukte detektierbar. Eine Quervernetzung des PorB-Ngo mit Tim10 oder Tim13 ließ sich in diesen Experimenten also nicht bestätigen.

A:



B:

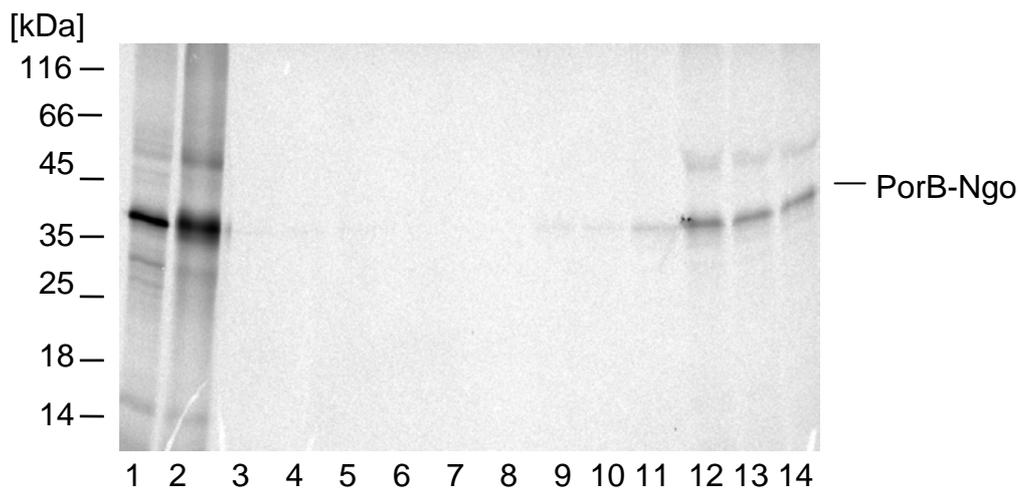


Abb. 4.35: Versuch zur Coimmunfällung von PorB-Ngo mit Antiseren gegen Tim10 und Tim13 nach Quervernetzung durch 1 mM MBS (A) bzw. 1 mM DSS (B)

1:-MBS/DSS, 2:+MBS/DSS

Eluat (3: Präimmunserum, 4: Anti-Tim10-AK, 5: Anti-Tim13-AK)

Eluat 2 (6: Präimmunserum, 7: Anti-Tim10-AK, 8: Anti-Tim13-AK)

Waschfraktion (9: Präimmunserum, 10: Anti-Tim10-AK, 11: Anti-Tim13-AK)

Durchfluss (12: Präimmunserum, 13: Anti-Tim10-AK, 14: Anti-Tim13-AK)

Radioaktiv markiertes PorB-Ngo wurde in isolierte Hefemitochondrien importiert (Abb. 4.18 B). Anschließend wurden Proben mit und ohne 1mM MBS bzw. DSS inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und ein Teil der Proben unmittelbar auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (+ MBS/DSS, - MBS/DSS). Die übrigen Mitochondrien der Ansätze wurden in Lysepuffer lysiert. Nach Zugabe von Waschpuffer wurden die Überstände nach Zentrifugation mit Antikörpern (gegen Tim10 und Tim13) bzw. Präimmunserum (ohne Antikörper) und Protein A Microbeads inkubiert. Die MACS μ Columns wurden mit Waschpuffer gewaschen und anschließend coimmungefällte Proteine über den Separator gebunden und durch erhitzten Laemmli-Probenpuffer eluiert. Die Waschfraktionen und der Durchfluss wurden ebenfalls aufgefangen, TCA-gefällt (siehe 3.5.2) und alle Proben über SDS-PAGE aufgetrennt.

4.2.1.4 Chemische Quervernetzung nach *in vitro* Import von PorB-Ngo in $\Delta tim8$ Mitochondrien

Tim8 gehört, wie die zuvor erwähnten Proteine Tim10 und Tim13, zu den kleinen Tim-Proteinen des mitochondrialen Intermembranraumes. Durch Quervernetzung wurde getestet, ob PorB-Ngo sich beim *in vitro* Import mit diesem Protein verbinden lässt. PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) sowohl in Wildtypmitochondrien (WT) als auch in Mitochondrien, in deren Hefestamm Tim8 deletiert wurde (M = Mutante) importiert und anschließend die Quervernetzungsreaktion mit 1 mM MBS durchgeführt (siehe 3.5.8, Abb. 4.36).

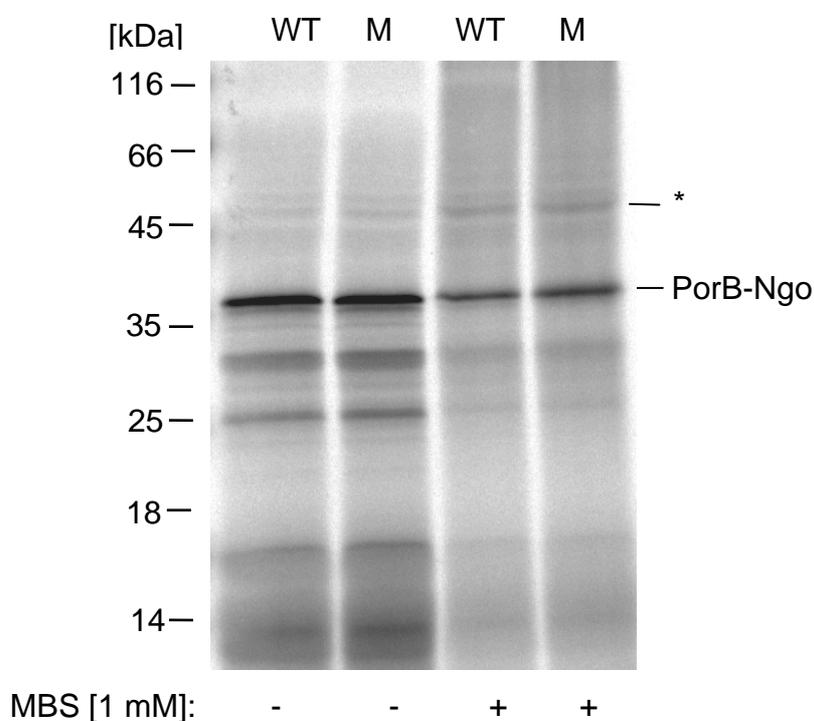


Abb. 4.36: SDS-Polyacrylamidgel der Quervernetzungsreaktion von PorB-Ngo durch 1 mM MBS nach Import in $\Delta tim8$ - und Wildtypmitochondrien

PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) in $\Delta tim8$ (M) und Wildtypmitochondrien (WT) importiert. Nach Quervernetzung durch 1 mM MBS (siehe 3.5.8) wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und durch einen Phosphorimager die radioaktiven Signale der Proteine sichtbar gemacht.

Da unabhängig vom Import in Wildtyp- oder $\Delta tim8$ Mitochondrien die 45 kDa-Bande auf dem autoradiographisch ausgewerteten SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden konnte (in Abb. 4.36 mit * gekennzeichnet), war damit

nachgewiesen, dass Tim8 kein Bestandteil des 45 kDa-Proteins sein konnte. Für das 45 kDa-Protein ließ sich weder ein Bezug zum PorB-Ngo, noch zu einem mitochondrialen Protein definieren.

Aus den Versuchen zur Quervernetzung des PorB-Ngo ließen sich somit keine Hinweise auf potentielle Bindeproteine in den Mitochondrien gewinnen. Andererseits zeigte die effiziente Quervernetzung des AAC (Abb. 4.33 und Abb. 4.34), dass in den Experimenten zumindest mit den Reagenzien EGS und Sulfo-MBS durchaus Reaktionsbedingungen gegeben waren, unter denen grundsätzlich eine Möglichkeit zu einer kovalenten Kopplung unmittelbar benachbarter Proteine gegeben war. Das Ausbleiben einer Quervernetzung des PorB-Ngo könnte dadurch begründet sein, dass im PorB-Ngo geeignete Aminosäurereste als Reaktionspartner der Quervernetzungsreagenzien fehlen. Es könnte aber auch als Hinweis gewertet werden, dass PorB-Ngo nach dem Import in Mitochondrien weitgehend monomer vorliegt und eine Bindung an definierte Partnerproteine nicht gegeben ist.

Bevor das PorB-Ngo in den Mitochondrien akkumuliert, wird es aber zumindest vorübergehend mit dem TOM-Komplex der Außenmembran oder mit anderen Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie in funktionelle Wechselwirkungen treten müssen. Um derartige Wechselwirkungen des PorB-Ngo mit der Proteinimportmaschinerie erfassen zu können, wurde im Folgenden - unabhängig von der Technik der chemischen Quervernetzung - eine Möglichkeit genutzt, die in besonderer Weise mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gegeben ist. Die Experimente zum mitochondrialen Import *in vitro* hatten gezeigt, dass sich das PorB-Ngo sehr effizient in Hefemitochondrien importieren lässt. Eine Beteiligung definierter Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie lässt sich in der Hefe über die Verwendung entsprechender Mutanten nachweisen, in denen diese Komponenten fehlen oder in denen diese Komponenten definierte Defekte aufweisen.

4.3 Importweg und Lokalisation des PorB-Ngo in Mitochondrien

2.4.21 *In vitro* Import von PorB-Ngo in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien

Die mitochondriale Proteinimportmaschinerie exponiert an der Außenseite der Mitochondrien mehrere Tom-Proteine, die für extern zugegebene Proteasen zugänglich sind. Durch eine Protease-Vorbehandlung isolierter Mitochondrien können diese Tom-Proteine leicht abgebaut werden. Betroffen sind vorwiegend die Importrezeptoren Tom20, Tom22 und Tom70. Wenn diese Proteine fehlen ist ein Import von Vorstufenproteinen weiterhin möglich, da der Tom40-Kanal, der die generelle Importpore der Mitochondrien bildet, bei einer Proteasebehandlung der Mitochondrien zunächst erhalten bleibt. Die Effizienz des Proteinimports ist aber deutlich herabgesetzt. Somit ist eine einfache experimentelle Möglichkeit gegeben, eine Beteiligung von Tom-Proteinen am Import eines Proteins in Mitochondrien nachzuweisen. Traditionell wird in derartigen Versuchen Trypsin verwendet. Trypsin ist eine Serin-Endoprotease, die aus der Vorstufe Trypsinogen entsteht und aus bovinem Pankreas gewonnen wird.

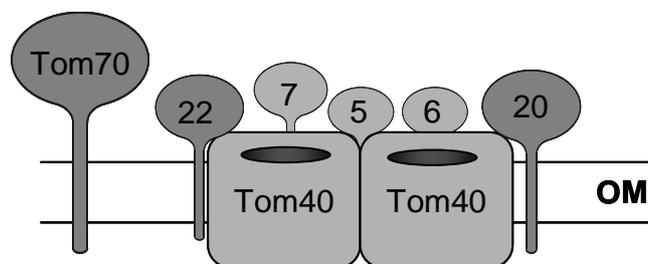


Abb. 4.37: Aufbau des TOM-Komplexes

(*translocase of the outer mitochondrial membrane*) der Außenmembran von Mitochondrien

Die Rezeptor-Komponenten des TOM-Komplexes sind dunkelgrau unterlegt. Der TOM-Komplex (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) bildet die zentrale Eintrittspforte für alle im Zellkern kodierten endogenen Proteine der Mitochondrien. Der TOM-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten: die kanalbildende Untereinheit Tom40, die Rezeptor-Komponenten Tom22, Tom20 und Tom70 und die kleinen Tom-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 [162].

4.3.1.1 *In vitro* Import in Trypsin-vorbehandelte Hefemitochondrien

In separaten Ansätzen wurden parallel PorB-Ngo und der VDAC in Hefemitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden zuvor für 10 Minuten

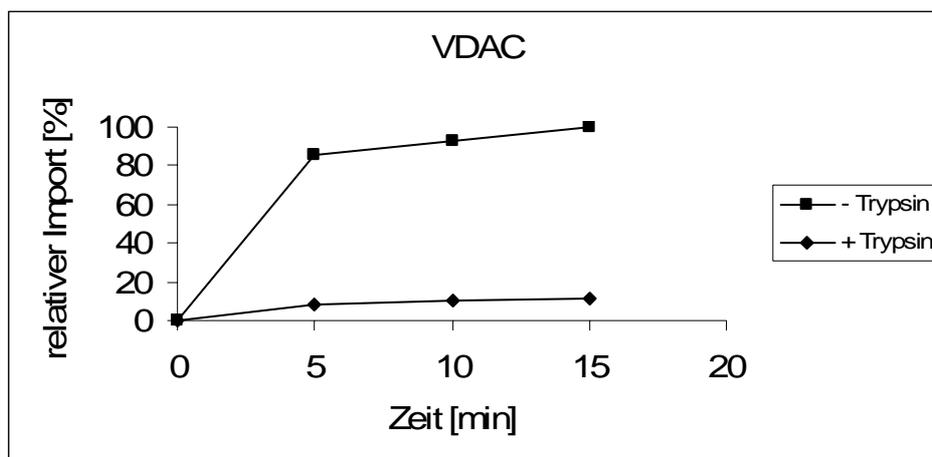
bei 0°C mit 0,1 mg/ml Trypsin vorbehandelt. Zum Vergleich wurden die Proteine in Mitochondrien importiert, die ohne Trypsin-Vorbehandlung eingesetzt wurden.

Der VDAC wurde als Kontrollprotein eingesetzt, da aus früheren Studien bekannt ist, dass der Import des VDAC von Tom20, Tom22, Tom5 und Tom7 abhängig ist und die Importeffizienz durch eine Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien erheblich reduziert wird [27]. Der VDAC wurde nach dem in der Literatur beschriebenen Standardprotokoll (siehe 3.4.10) importiert. PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Protokoll (Abb. 4.18 B) importiert, also mit einer Säureaktivierung des Proteins und einer separaten Anbindung des PorB-Ngo an die Mitochondrien (Abb. 4.38).

Beim Import des VDAC war ein ausgeprägter Effekt der Trypsin-Behandlung der Mitochondrien auf die Importeffizienz zu sehen. Der VDAC wurde in Mitochondrien, die nicht Trypsin-behandelt waren, also noch alle Rezeptoren der mitochondrialen Importmaschinerie besaßen, innerhalb der ersten 5 Minuten nahezu 10-mal effizienter importiert als in Trypsin-behandelte Mitochondrien. Die Rezeptoren des TOM-Komplexes spielten demnach beim Import des VDAC in Hefemitochondrien eine entscheidende Rolle. Hingegen war beim Import des PorB-Ngo in Trypsin-behandelte Mitochondrien im Vergleich zu den unbehandelten Mitochondrien keinerlei Reduktion in der Importeffizienz festzustellen. Tatsächlich wurde das PorB-Ngo in die Trypsin-behandelten Mitochondrien schneller importiert als in die unbehandelten Mitochondrien.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass PorB-Ngo als Effektorprotein eines humanpathogenen Erregers bevorzugt und spezifisch mit den Importrezeptoren der humanen TOM-Komplexe reagiert und die homologen Rezeptoren der Hefemitochondrien deshalb nicht erkennt. Die experimentellen Daten lassen vermuten, dass die Rezeptorproteine der TOM-Komplexe in der Hefe den PorB-Ngo-Import durch die TOM-Pore eher behindern als erleichtern.

A:



B:

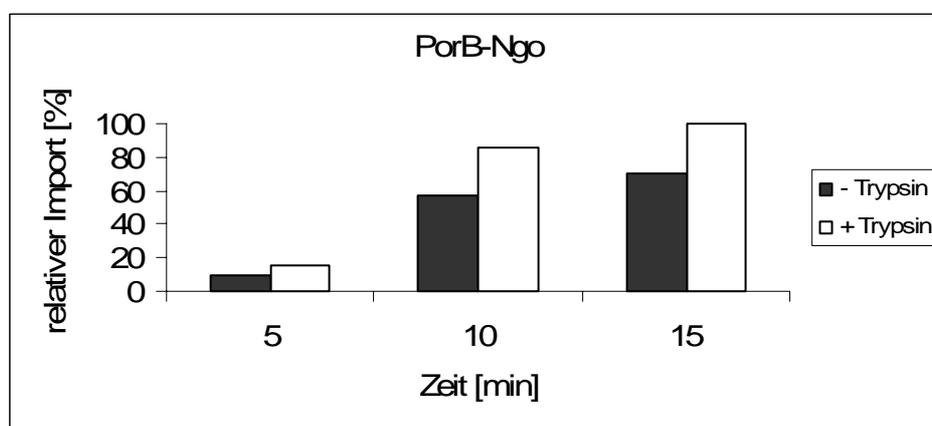


Abb. 4.38: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und PorB-Ngo (B) nach Import in mit Trypsin behandelte Hefemitochondrien

Die Mitochondrien wurden nach Zugabe von 0,1 mg/ml Trypsin bzw. SEM für 30 Minuten auf Eis inkubiert und der enzymatische Abbau durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor gestoppt (siehe 3.4.8). VDAC wurde nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10), PorB-Ngo nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) importiert, wobei den Importansätzen Trypsin-Inhibitor zugegeben wurde. Die Proben wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anhand der jeweiligen Lysatproben autoradiographisch ausgewertet. Die relative Importeffizienz wurde in Bezug auf die jeweils höchste Importeffizienz (100 %) berechnet.

Um diesen Möglichkeiten nachzugehen, wurde das Experiment erneut durchgeführt und das PorB-Ngo nicht in Mitochondrien der Hefe, sondern in Trypsin-behandelte Mitochondrien aus Säugetierzellen importiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst Rattenlebermitochondrien isoliert.

4.3.1.2 *In vitro* Import in Trypsin-vorbehandelte Rattenlebermitochondrien

Um den Effekt der Trypsin-Behandlung auf die Rattenlebermitochondrien zu kontrollieren, wurde parallel zum PorB-Ngo wieder der VDAC importiert (Abb. 4.39).

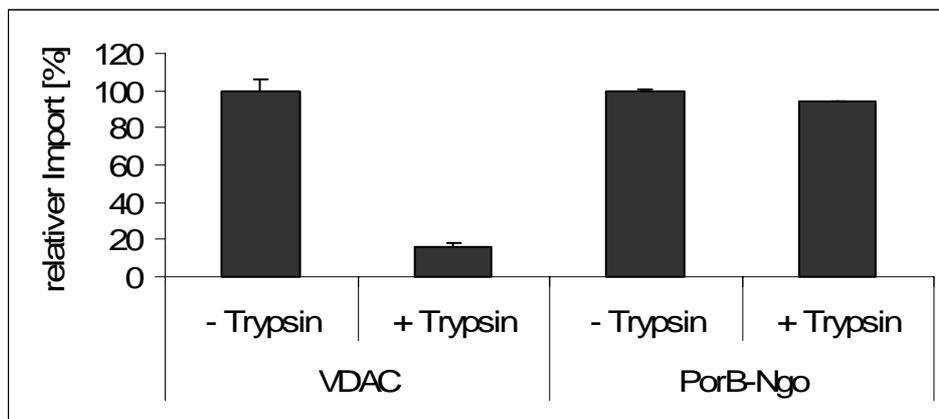


Abb. 4.39: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC und PorB-Ngo nach

Import in Trypsin-behandelte Rattenlebermitochondrien

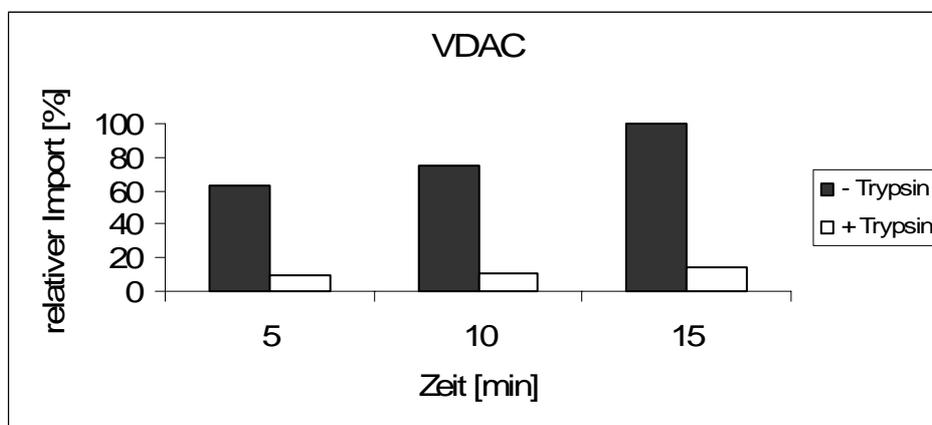
Nach Trypsin-Behandlung der Rattenlebermitochondrien für 15 Minuten mit 0,1mg/ml Trypsin wurden VDAC und PorB-Ngo nach Standard- (siehe 3.4.10) bzw. optimiertem Importprotokoll (Abb. 4.18 B) importiert. Für die Importreaktion des VDAC wurden die Proben für 10 Minuten inkubiert, für den PorB-Ngo Import erfolgte sowohl die Anbindungs- als auch die Translokationsreaktion in jeweils 5 Minuten. Dem Importansatz wurde Trypsin-Inhibitor zugegeben und die Proben wurden zusammen mit der Lysatprobe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Autoradiographie wurden die Banden anhand der entsprechenden Lysatproben quantifiziert und jeweils der relative Import ausgerechnet. [n=3]

Überraschend ergaben sich mit den Rattenlebermitochondrien ähnliche Verhältnisse der relativen Importeffizienzen wie zuvor mit den Hefemitochondrien. Der Import des VDAC wurde durch die Trypsin-Vorbehandlung der Rattenlebermitochondrien innerhalb der ersten 5 Minuten um mehr als 80% reduziert. Der Import des PorB-Ngo wurde hingegen nur unwesentlich reduziert. Eine Erhöhung der Importeffizienz war mit der Protease-Vorbehandlung der Rattenlebermitochondrien - anders als mit den Hefemitochondrien - nicht verbunden. Allerdings konnte nach diesen Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass PorB-Ngo in humanen Zellen mit eigentümlichen Strukturen des TOM-Komplexes reagiert, die weder in der Hefe, noch in der Ratte konserviert sind. Deshalb wurde auf die Möglichkeit zurückgegriffen, PorB-Ngo in humane Mitochondrien zu importieren, die sich aus Jurkat-Zellen isolieren ließen.

4.3.1.3 *In vitro* Import in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien aus Jurkat-Zellen

Um zu untersuchen, ob PorB-Ngo als Effektorprotein eines humanpathogenen Erregers spezielle Rezeptorstrukturen benötigt, die nur an der Oberfläche menschlicher Mitochondrien vorkommen, wurde PorB-Ngo in Trypsin-behandelte Mitochondrien aus Jurkat-Zellen importiert. Zum Vergleich wurden Mitochondrien der gleichen Präparation verwendet, die ohne Protease inkubiert wurden. Um die Trypsin-Behandlung der Mitochondrien zu überprüfen, wurde erneut parallel zum Import des PorB-Ngo der VDAC importiert (Abb. 4.40).

A:



B:

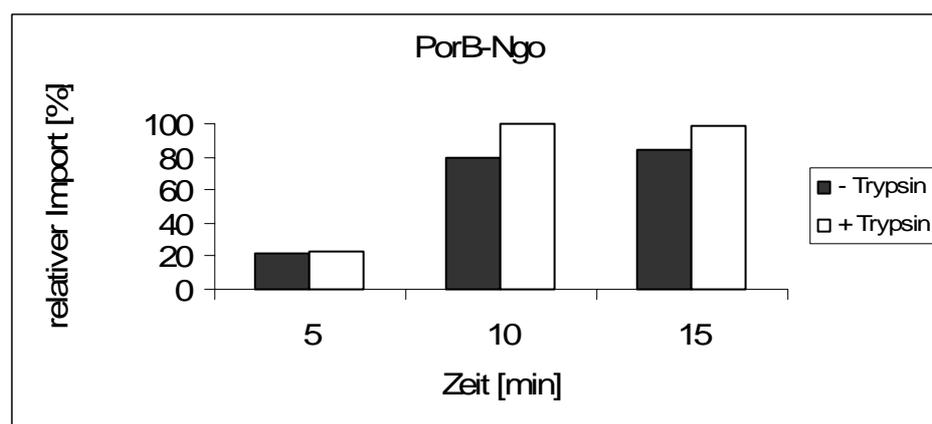


Abb. 4.40: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und PorB-Ngo (B) nach Import in Trypsin-behandelte Mitochondrien aus Jurkat-Zellen

Die Trypsin-Behandlung der Mitochondrien erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Dem Importansatz wurde Trypsin-Inhibitor zugegeben, NADH wurde durch Na-Succinat ersetzt. Der Import des VDAC wurde nach Standardimportprotokoll, der des PorB-Ngo nach dem optimierten Importprotokoll in Mitochondrien aus Jurkat-Zellen durchgeführt. Die Banden wurden nach SDS-PAGE und Autoradiographie anhand der jeweils aufgetragenen Lysatprobe quantifiziert und der relative Import berechnet.

Der Effekt der Trypsin-Behandlung auf die Importeffizienz des VDAC war deutlich ausgeprägt. PorB-Ngo wurde jedoch unabhängig von der Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien mit ähnlicher Effizienz importiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten somit, dass proteasesensitive Strukturen an der Oberfläche der Mitochondrien an einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Imports des PorB-Ngo nicht beteiligt waren. Dieser Befund ergab sich übereinstimmend für Mitochondrien der Hefe, der Rattenleberzellen und der humanen Jurkat-Zellen. Durch die stets durchgeführten Kontrollexperimente mit dem VDAC war gewährleistet, dass die Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien zu einem effizienten Abbau von relevanten Proteinen der Außenmembran geführt hatte, dass die Mitochondrien aber dabei sonst intakt geblieben waren. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass das Kontrollprotein, der VDAC und das PorB-Ngo in allen diesen Experimenten nach unterschiedlichen Protokollen importiert wurden. Der VDAC wurde mit den Mitochondrien im Retikulozytenlysat unmittelbar als lösliches Protein inkubiert. Dabei wurde dem üblichen Standardprotokoll gefolgt. Das PorB-Ngo hingegen wurde in separaten Schritten erst an die Mitochondrien gebunden und dann nach Abtrennung der Mitochondrien vom Retikulozytenlysat in einer zweiten Inkubation in die Mitochondrien importiert. In den Experimenten, die im Abschnitt 4.1.14 beschrieben wurden, hatte sich bereits gezeigt, dass die Anbindung des PorB-Ngo an die Mitochondrien wesentlich schneller erfolgt als die nachfolgende Translokation. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist somit die Translokation, die weitgehend erst in der zweiten Inkubation abläuft. Aus den vorliegenden Daten lässt sich nun schließen, dass die bei der Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien abgebauten Importrezeptoren allenfalls am ersten Schritt, also an der Anbindung des PorB-Ngo an die Mitochondrien beteiligt sind. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hingegen, nämlich die anschließende Translokation des PorB-Ngo, ist von den Protease-zugänglichen Domänen der Importrezeptoren offenbar unabhängig. Da sich allerdings auch die Menge des PorB-Ngo, die sich insgesamt +/-Trypsin importieren ließ kaum unterscheidet, bzw. in diesem Experiment sogar die Menge an importiertem Protein +Trypsin die Menge des Proteins, das -Trypsin in die Mitochondrien importiert wurde übersteigt, ist davon auszugehen, dass auch die Anbindung

des PorB-Ngo an die Mitochondrien von Importrezeptoren unabhängig ist. Um diese Schlussfolgerung zu überprüfen, wurde nun über die Verwendung verschiedener Hefestämme untersucht, welche Tom-Proteine in den Import des PorB-Ngo tatsächlich eingreifen.

2.4.22 *In vitro* Import des PorB-Ngo in Mitochondrien aus Deletions- und temperatursensitiven Hefemutanten

Deletionsmutanten zeichnen sich dadurch aus, dass das ursprünglich von dem betroffenen Gen kodierte Protein in der Zelle nicht mehr synthetisiert wird. Handelt es sich dabei um ein essentielles Protein, ist die Deletion für die Zelle letal. Um auch die Funktionen essentieller Proteine untersuchen zu können, werden oft temperatursensitive Mutanten isoliert, deren Funktion nur bei Überschreiten einer bestimmten Temperatur beeinträchtigt ist. Bei permissiven Temperaturen können die Stämme noch wachsen. So ließen sich die in der vorliegenden Studie verwendeten temperatursensitiven Mutanten bei 23 °C kultivieren. Bei höheren, restriktiven Temperaturen stellen sie ihr Wachstum ein, da die von den Mutationen betroffenen Proteine unter diesen Bedingungen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Temperatursensitive Mutanten sind meist konditional-letal, sie überleben im permissiven und sterben im restriktiven Temperaturbereich.

4.3.1.4 *In vitro* Import in $\Delta tom22$ -Mitochondrien

Tom22 (Abb. 4.41) ist innerhalb der TOM-Komplexe an mehreren Funktionen beteiligt. Unter anderem ist es gemeinsam mit dem Importrezeptor Tom20 an der Erkennung der Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine beteiligt. Zudem trägt es aber auch wesentlich zur Stabilität der TOM-Komplexe bei, die in Wildtyp-Mitochondrien eine molare Masse von etwa 400 kDa haben. In Hefemutanten, denen das Tom22 fehlt ($\Delta tom22$), ist der TOM-Komplex instabil. Durch Blaue Nativgelelektrophorese kann in den Mitochondrien der Mutanten anstelle des 400 kDa-Komplexes nur noch ein etwa 80 kDa großer Subkomplex nachgewiesen werden, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Tom40-Dimer handelt [78]. Innerhalb dieser Dimere ist das Tom40 zwar noch intakt, die Kooperation des Tom40 mit den Importrezeptoren ist aber unterbunden.

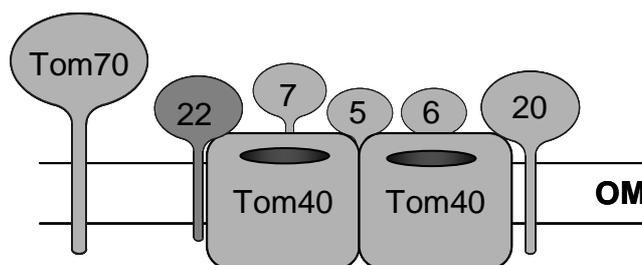


Abb. 4.41: Aufbau des TOM-Komplexes

(*translocase of the outer mitochondrial membrane*) der Außenmembran von Mitochondrien

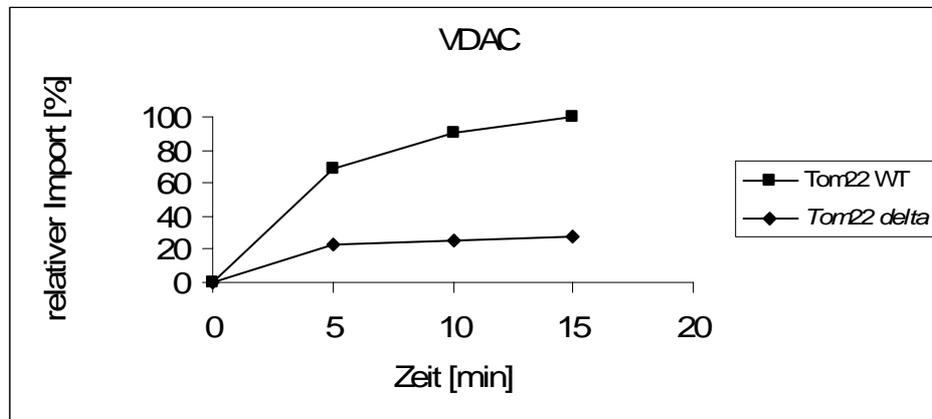
Die Komponente Tom22 des TOM-Komplexes ist dunkelgrau unterlegt.

Über den Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien eines $\Delta tom22$ Deletionsstamms kann geprüft werden, ob ein intakter TOM-Komplex für den effizienten Import der jeweiligen Proteine erforderlich ist. Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit entsprechende Mitochondrien isoliert worden waren, wurden diese zunächst durch Import geeigneter Modellproteine charakterisiert. Wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen bot sich auch in diesem Fall der VDAC als Modellprotein an. Aus früheren Studien war bekannt, dass der Import des VDAC bei Fehlen von Tom22 nur noch eingeschränkt ablaufen kann [27].

Als weiteres Modellprotein wurde Bcl-2 eingesetzt. Bcl-2 ist ein 26 kDa großes Protein, das in den Zellen höherer Organismen überwiegend in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert ist, wo es eine zentrale Rolle bei der Regulation von Apoptose spielt. Der Import von Bcl-2 in Mitochondrien wird vom Importrezeptor Tom20 vermittelt, die Insertion des Bcl-2 in die Außenmembran ist aber unabhängig von der generellen Importpore des TOM-Komplexes und deshalb auch unabhängig von einer Kooperation des Tom20 mit Tom40. Entsprechend ist der Bcl-2 Import in $\Delta tom22$ Mitochondrien nicht beeinträchtigt [163] (Abb. 4.42).

In Übereinstimmung mit den Daten der Literatur war beim Import des VDAC in Mitochondrien des $\Delta tom22$ -Stamms ein deutlicher Unterschied in der Importeffizienz im Vergleich zum Import in Wildtypmitochondrien zu sehen (Abb. 4.42 A). Der Import des Bcl-2 blieb hingegen - wie erwartet - sichtlich unbeeinflusst vom Vorhandensein oder Fehlen des Tom22 und zeigte weitgehend die gleiche Importeffizienz in Mitochondrien der Mutante und des Wildtyps (Abb. 4.42 B).

A:



B:

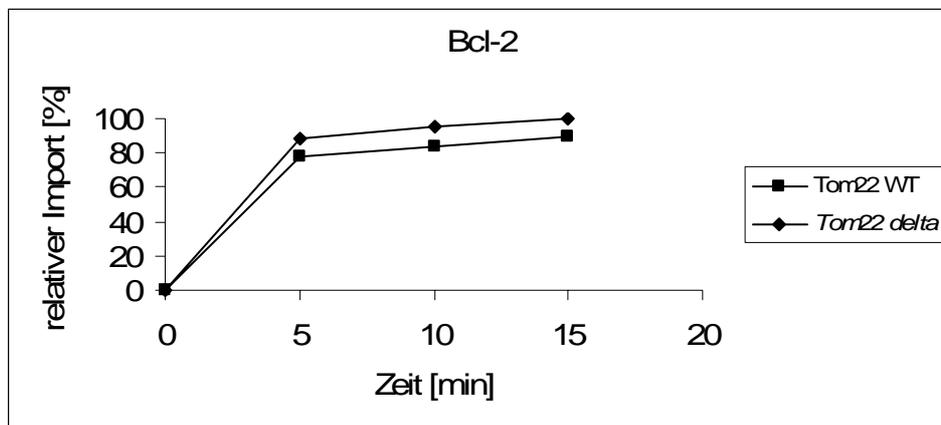


Abb. 4.42: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und Bcl-2 (B) in $\Delta tom22$ und Wildtypmitochondrien

VDAC und Bcl-2 wurden nach dem Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) in $\Delta tom22$ und in Wildtypmitochondrien importiert. Die Importreaktion des VDAC wurde mit 150 $\mu\text{g/ml}$ PK, die von Bcl-2 wegen des sehr schnellen Imports [163] durch Zugabe von kaltem SEM und anschließend 5 $\mu\text{g/ml}$ PK gestoppt. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die Banden anhand der jeweiligen mit aufgetragenen Lysatprobe quantifiziert und der relative Import bezüglich der jeweils höchsten Importeffizienz berechnet.

Der Phänotyp der $\Delta tom22$ Mitochondrien war im Vergleich zum Wildtyp klar ausgeprägt, weshalb nach dem Import der Kontrollproteine VDAC und Bcl-2 das PorB-Ngo in diese Mitochondrien importiert werden konnte (Abb. 4.43).

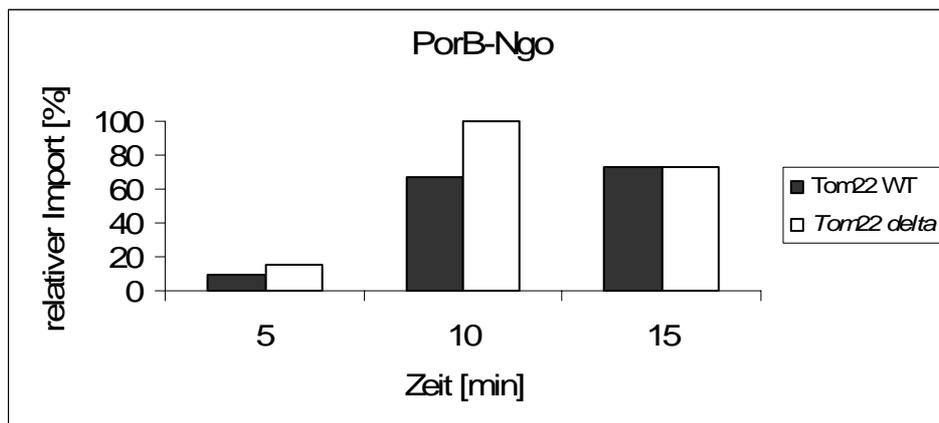


Abb. 4.43: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo in $\Delta tom22$ und Wildtypmitochondrien

Nach Import von PorB-Ngo nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) in $\Delta tom22$ und Wildtypmitochondrien wurden die Proben zusammen mit einer Probe des Retikulozytenlysats auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach Autoradiographie anhand der Lysatprobe quantifiziert. Die höchste ermittelte Importeffizienz wurde auf 100 % gesetzt, alle weiteren, sowohl des Imports in die Mutante als auch die Importeffizienz in Mitochondrien des Wildtyps, wurden relativ zu diesem Wert berechnet.

Ähnlich wie beim Import von Bcl-2 war auch beim Import von PorB-Ngo in $\Delta tom22$ Mitochondrien kein Effekt der Mutation auf die Importeffizienz zu erkennen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist der Import des PorB-Ngo offenbar von der Rezeptorfunktion des Tom22 unabhängig. Vielmehr scheint der Import direkt von den Tom40-Poren vermittelt zu werden, wobei eine Kooperation des Tom40 offenbar auch mit den übrigen Rezeptorproteinen des TOM-Komplexes nicht erforderlich ist. Diese Schlussfolgerung wird von den Experimenten zur Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien bestätigt (siehe 4.3.1). Vermutlich bindet das säureaktivierte PorB-Ngo unmittelbar an Tom40.

4.3.1.5 *In vitro* Import in *tom40-4* und Wildtypmitochondrien

Die Daten zur Kinetik der Anbindung und Translokation des PorB-Ngo hatten bereits darauf hingewiesen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Import des PorB-Ngo die Translokation durch die Importpore des TOM-Komplexes ist (Abb. 4.20). Dieser Befund wurde durch die Ergebnisse der Experimente zur Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien (Abb. 4.38 B, 4.39, 4.40 B), sowie durch den Tom22-unabhängigen Import des PorB-Ngo (Abb. 4.43) indirekt bestätigt. Um dieses Konzept direkt überprüfen zu können,

wurden Mitochondrien der temperatursensitiven Mutante *tom40-4* isoliert (Tom40: Abb. 4.44).

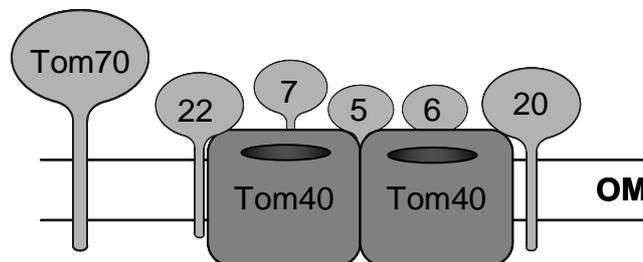


Abb. 4.44: Aufbau des TOM-Komplexes

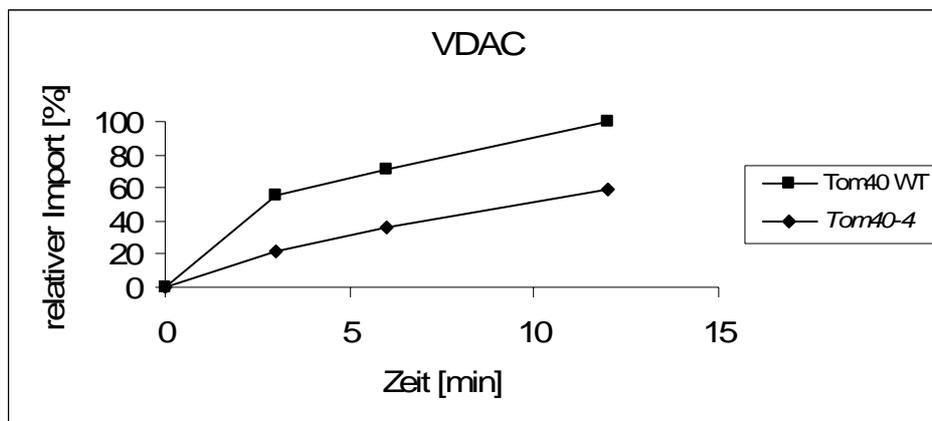
(*translocase of the outer mitochondrial membrane*) der Außenmembran von Mitochondrien

Die Komponente Tom40 des TOM-Komplexes ist dunkelgrau unterlegt.

Die Mitochondrien dieser Mutante enthalten zwar noch einen intakten TOM-Komplex, die Importpore ist jedoch aufgrund mehrerer Punktmutationen defekt und die Aufnahme der meisten Proteine erfolgt im TOM-Komplex nur noch verzögert. Dieses gilt auch für den VDAC [27]. Bcl-2 zählt hingegen zu den wenigen Proteinen für die ein Tom40-unabhängiger Importweg nachgewiesen wurde [164]. Als Kontrolle für den Phänotyp der *tom40-4* Mitochondrien wurden deshalb VDAC und Bcl-2 importiert (Abb. 4.45).

Wie erwartet wurde der VDAC bei defekter Tom40-Pore mit verminderter Effizienz in die Mitochondrien importiert. Bcl-2, das sich ohne direkte Beteiligung des Tom40 in Mitochondrien einlagern kann, wurde in *tom40-4* und in Wildtyp-Mitochondrien mit gleicher Effizienz importiert.

A:



B:

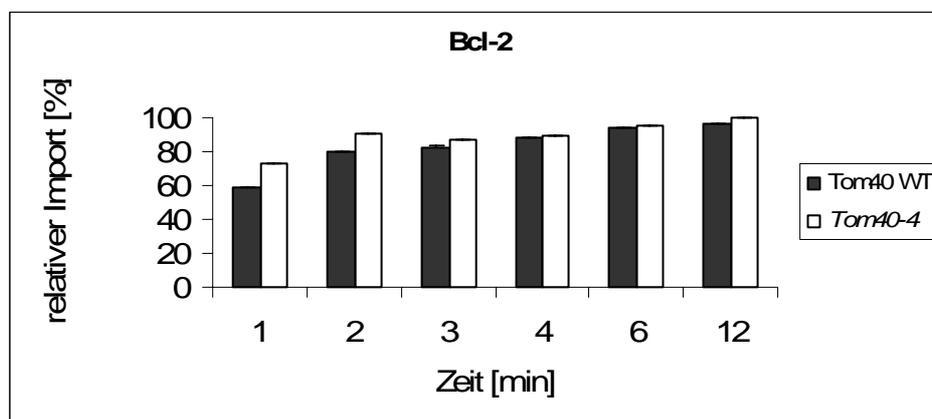


Abb. 4.45: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und Bcl-2 (B) in *tom40-4* und Wildtypmitochondrien

VDAC und Bcl-2 wurden nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) in *tom40-4* und Wildtypmitochondrien importiert. Nach Stoppen der Reaktionen des VDAC durch 150 $\mu\text{g/ml}$ PK, von Bcl-2 durch 500 μl SEM und anschließender PK-Behandlung (5 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch anhand der dazugehörigen Lysatprobe ausgewertet. [n=3]

Nachdem sichergestellt war, dass die *tom40-4* Mitochondrien den erwarteten Phänotyp zeigten, wurde PorB-Ngo nach dem optimierten Importprotokoll (siehe 3.4.10, Abb. 4.18 B) in *tom40-4* und die entsprechenden Wildtypmitochondrien importiert (Abb. 4.46). Für den Import des PorB-Ngo wurden Translokationszeiten von 2 und 4 Minuten gewählt, da in der Importkinetik (siehe Abb. 4.20) deutlich war, dass der Hauptteil des Proteins bereits in den ersten 5 Minuten in die Mitochondrien translozierte.

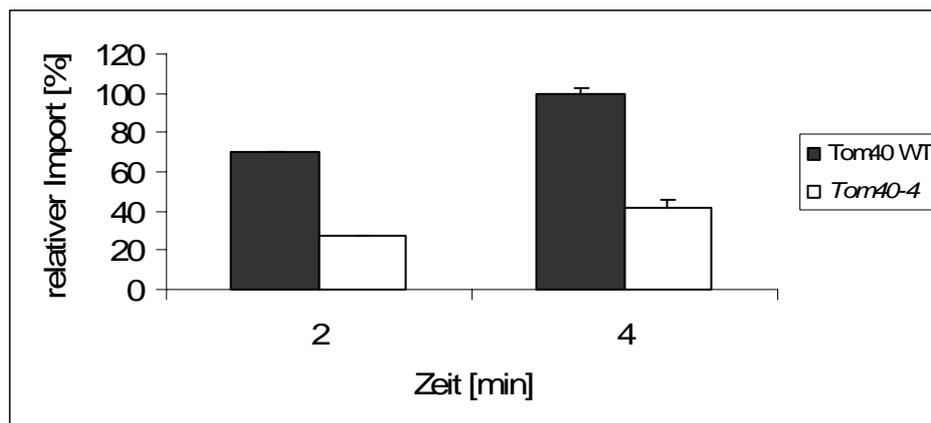


Abb. 4.46: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo in *tom40-4* und Wildtypmitochondrien

PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) in *tom40-4* und Wildtypmitochondrien importiert. Die Anbindungszeit wurde nach 5 Minuten, die Translokationsreaktion nach 2 und 4 Minuten gestoppt. Die Reaktion wurde durch 50 µg/ml PK beendet und die Proben wurden zusammen mit einer Lysatprobe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Autoradiographie konnten die Banden anhand der Lysatprobe quantifiziert werden. Die höchste Importeffizienz wurde auf 100 % gesetzt, alle weiteren Werte wurden relativ zu dieser berechnet. [n=3]

Der *in vitro* Import des PorB-Ngo in *tom40-4* und WT Mitochondrien zeigte, dass PorB-Ngo die generelle Importpore für den Import in Mitochondrien benötigt. Im Vergleich zum Import in Wildtypmitochondrien war der Import in *tom40-4* Mitochondrien um mehr als die Hälfte reduziert.

Die Daten lassen somit vermuten, (1.) dass säureaktiviertes PorB-Ngo unter Umgehung der Rezeptoren des TOM-Komplexes zunächst in unmittelbarer Nähe des Tom40-Kanals bindet (siehe 4.3.1 und 4.3.1.4), und dann (2.) durch den Tom40-Kanal hindurch in die Mitochondrien importiert wird.

Der ausgeprägte Effekt der *tom40-4* Mutation auf die Importeffizienz des PorB-Ngo demonstriert zunächst unmittelbar die Beteiligung des TOM-Komplexes am Import dieses Proteins. Damit ist aber auch bestätigt, dass es sich bei dem im Anschluss an die Importexperimente detektierten PorB-Ngo tatsächlich um importiertes Protein handelte und nicht um Mitochondrien-assoziierte Aggregate.

4.3.1.6 *In vitro* Import in *sam50-1* Mitochondrien

Für die Integration von β -barrel Proteinen in die mitochondriale Außenmembran ist der TOM-Komplex allein nicht ausreichend. Diese Proteine benötigen

zusätzlich den SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) oder auch TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins*) genannt. Der SAM-Komplex ist in die mitochondriale Außenmembran eingelagert. Seine drei Hauptbestandteile sind die zuerst identifizierte Komponente Mas37 sowie die beiden essentiellen Proteine Sam50 und Sam35 (Abb. 4.47). Als weitere Komponenten wurden die Proteine Mdm10 und Mim1 identifiziert, die eine Rolle bei der Integration von Tom40 in den TOM-Komplex spielen [162].

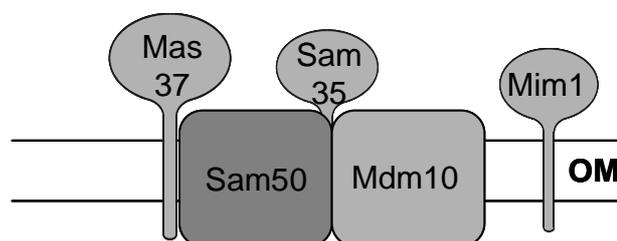


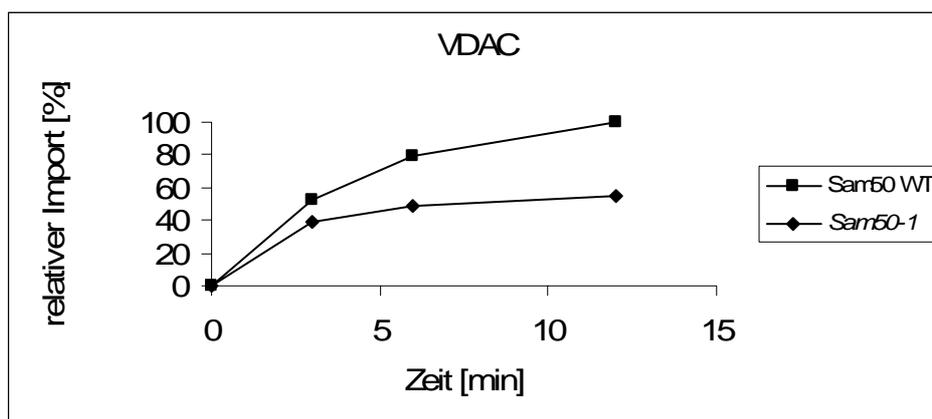
Abb. 4.47: Aufbau des SAM-Komplexes

(*sorting and assembly machinery*) der Außenmembran von Mitochondrien
Die Komponente Sam50 des SAM-Komplexes ist dunkelgrau unterlegt.

Sam50 ist über eine β -barrel Domäne in die Außenmembran integriert. Die Struktur dieser Domäne ist von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert. Temperatursensitive *sam50* Mutanten zeigen Defekte in der Assemblierung von Tom40 und VDAC, während der Import von Matrix- und Innenmembranproteinen unbeeinflusst bleibt [102].

Um zu untersuchen, ob der SAM-Komplex auch an der Biogenese des bakteriellen β -barrel Proteins PorB-Ngo beteiligt ist, wurde PorB-Ngo in Mitochondrien des temperatursensitiven Hefestamms *sam50-1* importiert. Um den Phänotyp der isolierten *sam50-1* Mitochondrien zu überprüfen, wurden zuvor der VDAC sowie der Dicarboxylattranslokator DIC (*dicarboxylate carrier*) importiert (Abb. 4.48). DIC ist mit dem ADP/ATP Translokator (AAC) verwandt und wird, ähnlich dem AAC, über den TOM-Komplex importiert und dann unter Beteiligung des TIM22-Komplexes in die Innenmembran der Mitochondrien eingebaut [165].

A:



B:

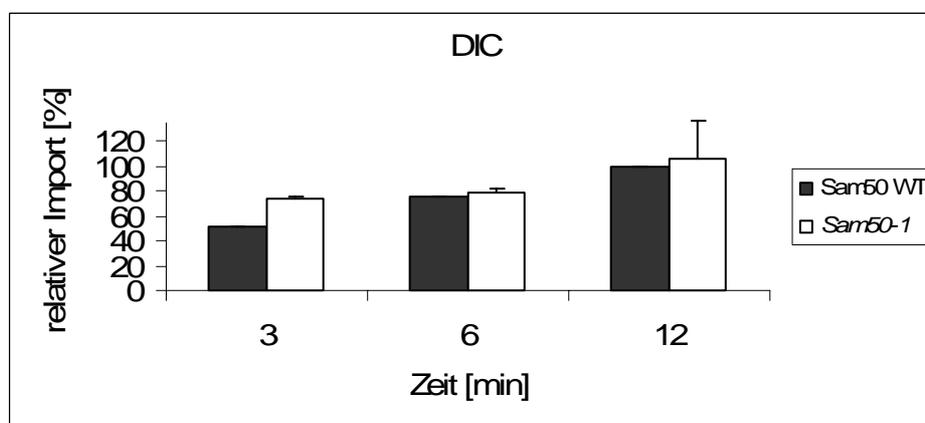


Abb. 4.48: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und DIC (B) in *sam50-1* und Wildtypmitochondrien

Zur Induktion des Phänotyps wurden die Mitochondrien 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor sie im Importexperiment eingesetzt wurden. Der Import von VDAC und DIC wurde nach dem Standardimportprotokoll durchgeführt. Die Importreaktion wurde bei VDAC mit 150 µg/ml PK, bei DIC mit 125 µg/ml PK gestoppt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE und Autoradiographie ausgewertet. [n=3]

Wie erwartet zeigte sich beim Import des VDAC in *sam50-1* Mitochondrien im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypmitochondrien ein signifikanter Unterschied in der Importeffizienz, der mit zunehmender Importzeit immer deutlicher wurde. Demnach war der VDAC als endogenes mitochondriales β -barrel Protein beim Import in Mitochondrien auf das Vorhandensein einer funktionellen Sam50-Komponente des SAM-Komplexes angewiesen. Beim Import des DIC in die *sam50-1* Mitochondrien war hingegen kein signifikanter Unterschied in der Importeffizienz festzustellen. Tendenziell war in diesem Experiment sogar die Importeffizienz in die *sam50-1* Mitochondrien besser als in Wildtypmitochondrien. Da es sich dabei um Mitochondrien der gleichen

Präparation handelte, die zuvor zum Import des VDAC verwendet worden waren, konnte somit ein Effekt der *sam50-1* Mutation auf die Importeffizienz des DIC sicher ausgeschlossen werden. Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass DIC vom TOM-Komplex direkt an den TIM22-Komplex der Innenmembran weitergegeben und durch diesen in die Innenmembran der Mitochondrien eingebaut wird [165].

Da PorB-Ngo ein typisches β -barrel Protein ist, war für den Import des PorB-Ngo eine Abhängigkeit der Importeffizienz vom SAM-Komplex zu erwarten. Bislang ist zwar nur für die beiden endogenen β -barrel Proteine VDAC und Tom40 eine Beteiligung des SAM-Komplexes am Import gezeigt, es wird allerdings davon ausgegangen, dass der SAM-Komplex generell an der Biogenese sämtlicher β -barrel Proteine beteiligt ist.

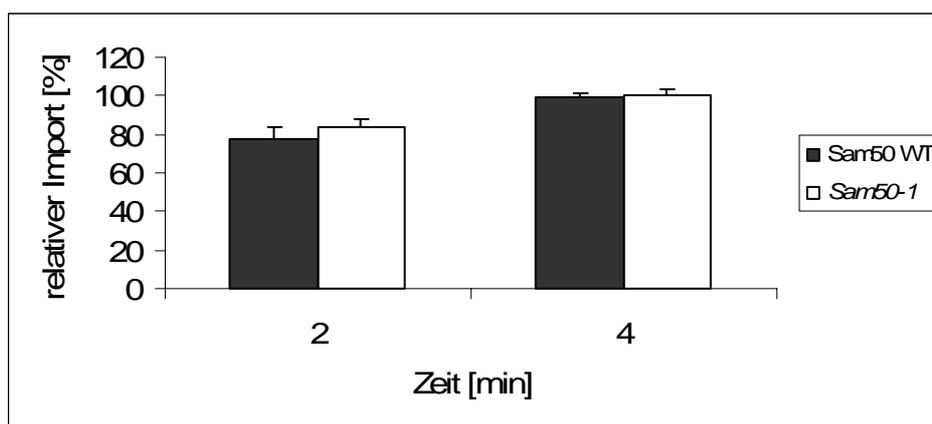


Abb. 4.49: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo in *sam50-1* und Wildtypmitochondrien

PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) in *sam50-1* und Wildtypmitochondrien importiert, deren Phänotyp zuvor durch Inkubation bei 37 °C induziert worden war. Die Anbindungszeit betrug 5 Minuten, die Translokationszeit wurde nach 2 und 4 Minuten durch Zugabe von 50 μ g/ml Proteinase K gestoppt. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, anhand einer Lysatprobe autoradiographisch ausgewertet und der relative Import berechnet. [n=4]

Überraschend verhielt sich PorB-Ngo beim Import in die *sam50-1* Mitochondrien wie der vom SAM-Komplex gänzlich unabhängige DIC. Es konnte kein Unterschied in der Importeffizienz zwischen *sam50-1* und Wildtypmitochondrien festgestellt werden (Abb. 4.49).

Diese Ergebnisse wiesen auf einen eigentümlichen Importweg des PorB-Ngo in Mitochondrien hin. PorB-Ngo schien das erste bekannte β -barrel Protein zu

sein, das nicht über den für diese Proteine üblichen Importweg über den SAM-Komplex in die mitochondriale Außenmembran importiert wird. Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde PorB-Ngo anschließend auch in Mitochondrien der Deletionsmutante $\Delta mas37$ importiert.

4.3.1.7 *In vitro* Import in $\Delta mas37$ Mitochondrien

Mas37 bildet zusammen mit Sam35 und Sam50 den funktionellen SAM-Komplex. Mas37 spielt eine wichtige Rolle beim Import von Tom40 und VDAC in die mitochondriale Außenmembran. Sam50 und Sam35 können auch in Abwesenheit von Mas37 assoziieren. In $\Delta mas37$ Deletionsmutanten bilden sie einen rudimentären SAM-Komplex. Neu importierte β -barrel Proteine interagieren in einem frühen Schritt der Translokation zunächst mit Sam50 und Sam35, bevor sie anschließend Mas37 für ihre Assemblierung in der Membran benötigen [104].

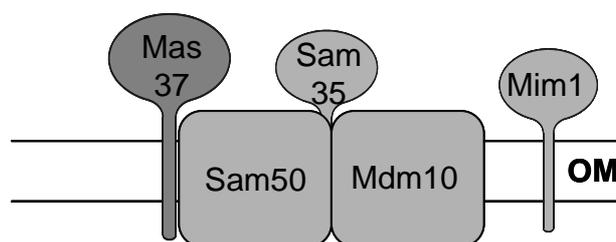


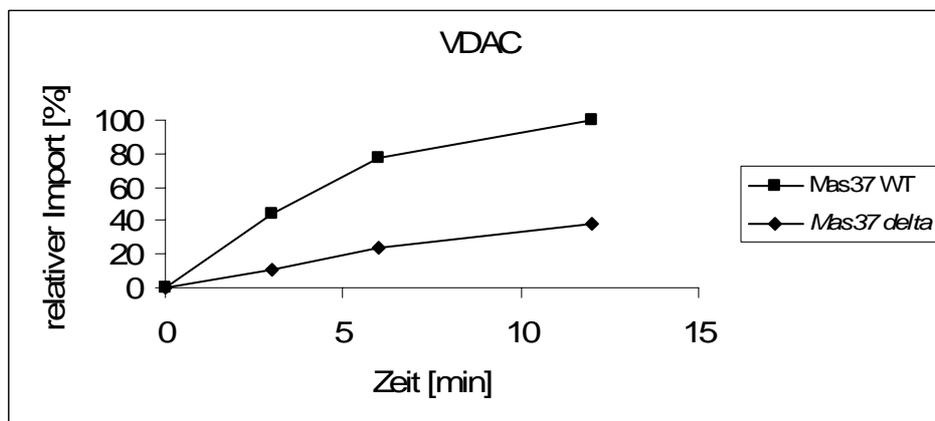
Abb. 4.50: Aufbau des SAM-Komplexes

(*sorting and assembly machinery*) der Außenmembran von Mitochondrien
Die Komponente Mas37 des SAM-Komplexes ist dunkelgrau unterlegt.

Wie bereits beim Import des PorB-Ngo in *sam50-1* Mitochondrien, wurden auch beim Import in $\Delta mas37$ Mitochondrien VDAC und DIC als Kontrollproteine verwendet (Abb. 4.51).

VDAC zeigte beim Import in die $\Delta mas37$ Mitochondrien die erwartete verzögerte Translokation (Abb. 4.51 A). Der Import des DIC war hingegen von Mas37 unabhängig (Abb. 4.51 B).

A:



B:

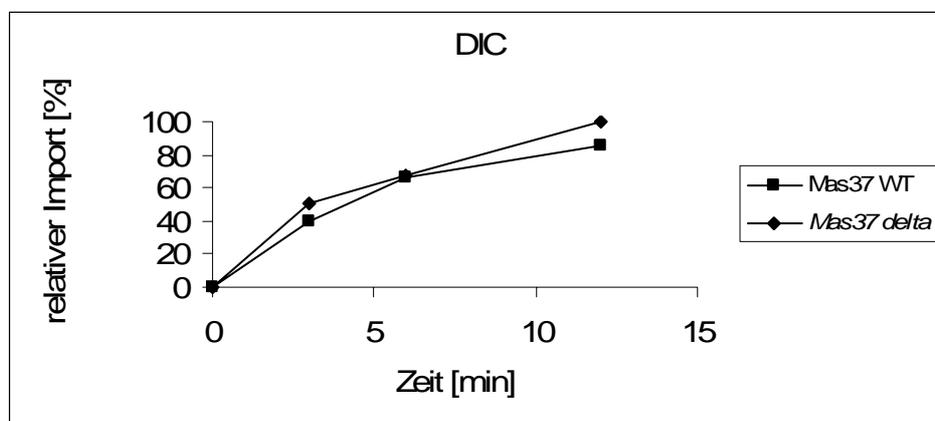


Abb. 4.51: Quantifizierung der Importeffizienz von VDAC (A) und DIC (B) in $\Delta mas37$ und Wildtypmitochondrien

VDAC und DIC wurden nach Standardimportprotokoll (siehe 3.4.10) in $\Delta mas37$ und Wildtypmitochondrien importiert. Die Importreaktion wurde durch Zugabe von 150 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (VDAC) bzw. 125 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (DIC) gestoppt und die Proben anschließend für 10 Minuten mit PMSF inkubiert. Die Mitochondrien wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und autoradiographisch quantifiziert.

Die Experimente bestätigten damit den erwarteten Phänotyp der verwendeten Mitochondrien. Daraufhin wurde nun auch PorB-Ngo in die Mitochondrien dieser Präparation importiert (Abb. 4.52).

PorB-Ngo zeigte beim Import in $\Delta mas37$ Mitochondrien, wie auch schon beim Import in *sam50-1* Mitochondrien, im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp keinerlei Einbußen der Importeffizienz.

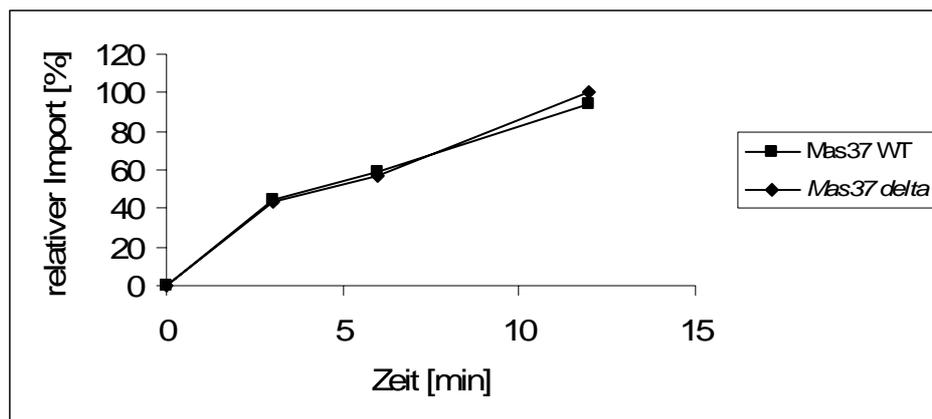


Abb. 4.52: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo in $\Delta mas37$ und Wildtypmitochondrien

Nach dem optimierten Importprotokoll wurde PorB-Ngo in $\Delta mas37$ und Wildtypmitochondrien importiert. Die Anbindung wurde nach 5 Minuten durch Reisolierung der Mitochondrien, die Translokation nach 3, 6 und 12 Minuten durch 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K gestoppt. Die Proteinbanden wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert, anhand einer 2 μl Lysatprobe quantifiziert und die relative Importeffizienz berechnet.

In der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Vorexperimente zur Kinetik der Anbindung und zur Kinetik der Translokation gezeigt hatten, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Translokation in die Mitochondrien der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Import des PorB-Ngo ist. Anders als im Fall der SAM-Komplex-abhängigen Proteine VDAC und Tom40 greift der SAM-Komplex offenbar nicht in diesen Schritt ein. Der direkte Vergleich mit dem VDAC als Modellprotein zeigte vielmehr, dass weder Sam50 noch Mas37 bei der Translokation des PorB-Ngo in nennenswertem Maße involviert sind. PorB-Ngo wird offenbar als erstes bekanntes β -barrel Protein unabhängig vom SAM-Komplex in Mitochondrien importiert.

Dieser Befund wirft die Frage auf, ob PorB-Ngo unter diesen Voraussetzungen überhaupt in die mitochondriale Außenmembran eingebaut werden kann. Sofern PorB-Ngo vom SAM-Komplex weder über Sam50 noch über Mas37 als β -barrel Protein erkannt wird, wäre zu erwarten, dass PorB-Ngo nach Translokation durch die TOM-Pore im Intermembranraum verbleibt oder möglicherweise sogar in der Innenmembran assembliert. In einer parallel durchgeführten unabhängigen Studie wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dipl. Biol. Elke Dian in einer Subfraktionierung der Mitochondrien eine Lokalisation

des PorB-Ngo in oder an der Innenmembran tatsächlich bestätigt [166]. Die Ergebnisse zum SAM-Komplex-unabhängigen Import des PorB-Ngo wurden damit auf überraschende Weise bestätigt.

2.4.23 Selektive Öffnung der mitochondrialen Außenmembran nach *in vitro* Import von PorB-Ngo in Hefemitochondrien

Das Testsystem zur Charakterisierung des PorB-Ngo Imports in Mitochondrien beruhte wesentlich auf dem Schutz des importierten PorB-Ngo vor der von außen zugesetzten Proteinase K. Nachdem sich gezeigt hatte, dass PorB-Ngo durch den Tom40-Kanal hindurch in den Intermembranraum gelangte, war es von Interesse die Lokalisation des PorB-Ngo in diesem Kompartiment über die Zugänglichkeit für Proteinase K zu überprüfen. Es war zu erwarten, dass das importierte PorB-Ngo im Intermembranraum durch Aufbrechen der Außenmembran zugänglich werden würde.

Um den Intermembranraum der Mitochondrien zu öffnen, werden diese durch osmotisches Schwellen in Mitoplasten umgewandelt. Zu diesem Zweck werden die Mitochondrien in EM-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7.2) resuspendiert, der keine Saccharose zur osmotischen Stabilisierung der Mitochondrien enthält. Unter diesen Bedingungen schwellen die Mitochondrien, die Außenmembran wird aufgesprengt wobei die Innenmembran intakt bleibt.

Diese Technik wurde nun auch zur Lokalisation des PorB-Ngo eingesetzt (Abb. 4.53 und Abb. 4.54). Das radioaktiv markierte PorB-Ngo wurde säureaktiviert, an isolierte Hefemitochondrien angebunden und dann in Gegenwart von MgATP importiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und durch Inkubation in EM-Puffer zum Schwellen gebracht und somit in Mitoplasten überführt. Diese wurden mit Proteinase K inkubiert, um das beim Schwellen der Mitochondrien zugänglich gewordene PorB-Ngo abzubauen. Die Mitoplasten wurden schließlich durch Zentrifugation reisoliert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Um das Verfahren anschließend anhand endogener Markerproteine kontrollieren zu können, wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit Hilfe entsprechender Antiseren wurden auf der Membran die Markerproteine Tim23 und Mge1 nachgewiesen.

Der antigene Anteil des Tim23 ragt in den Intermembranraum der

Mitochondrien und wird beim Öffnen der Außenmembran für Proteasen zugänglich. Aus diesem Grund war die Antikörperdekoration mit Tim23 eine Kontrolle, ob bzw. in welchem Umfang die Außenmembranen der Mitochondrien tatsächlich geöffnet waren. Mge1 ist ein Matrix-Protein, das auch in Mitoplasten vor Proteasen geschützt ist. Es wird erst bei einem Aufbrechen der Innenmembran zugänglich.

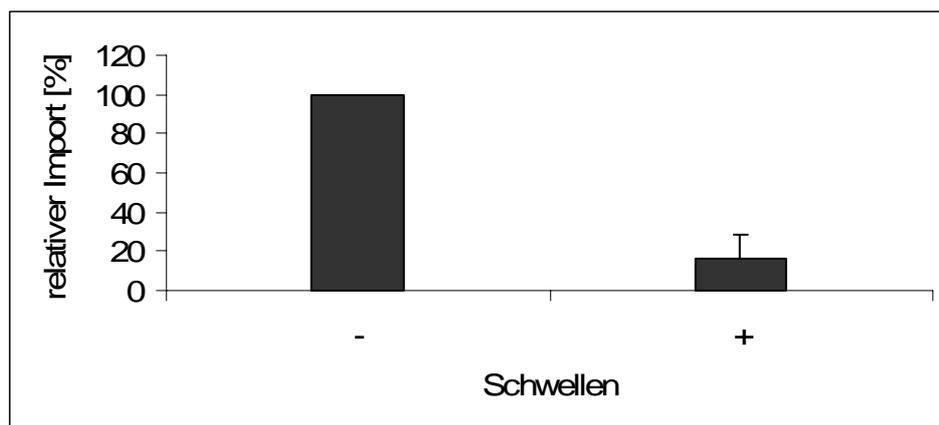


Abb. 4.53: Quantifizierung der Importeffizienz von PorB-Ngo mit und ohne selektiver Öffnung der mitochondrialen Außenmembran

PorB-Ngo wurde nach dem optimierten Importprotokoll (Abb. 4.18 B) in Mitochondrien des Hefestamms YPH499 importiert. Nach der Translokationsreaktion wurde die Reaktion nicht durch PK-Behandlung, sondern durch Überführen der Ansätze auf Eis gestoppt. Die Mitochondrien wurden abzentrifugiert, in EM- bzw. SEM-Puffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben PK behandelt und durch SDS-PAGE und Autoradiographie die Proteinbanden analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer 2 µl Lysatprobe, wonach der relative Import berechnet wurde.

Die Auswertung des Experiments am Phosphorimager ergab, dass der größte Teil des importierten PorB-Ngo, der in den intakten Mitochondrien noch vor der Proteinase K geschützt war, durch das Öffnen des Intermembranraums zugänglich wurde (Abb. 4.53). Bei der Proteinase K-Behandlung der Mitoplasten blieben nur ca. 20% des importierten PorB-Ngo erhalten.

Die Effizienz mit der die Außenmembran aufgesprengt worden war, zeigte sich bei der Quantifizierung der Markerproteine Tim23 und Mge1 (Abb. 4.54).

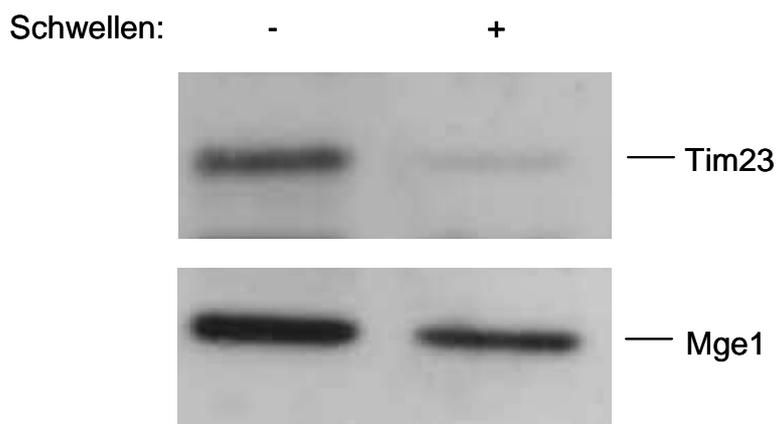


Abb. 4.54: Röntgenfilm, belichtet durch Chemilumineszenzreaktion nach immunologischem Antigennachweis von Tim23 und Mge1

Nach Western-Blot des SDS-Polyacrylamidgels wurde die Nitrozellulosemembran mit Anti-Tim23 und -Mge1 Serum dekoriert. Nach Inkubation mit anti-rabbit Antikörper und verstärkter Chemilumineszenzreaktion wurde das Signal von Tim23 und Mge1 der Mitochondrien auf einen Röntgenfilm übertragen.

Die Tim23-Signale zeigten, dass die Öffnung des Intermembranraumes nahezu vollständig war. Nach Schwellen der Mitochondrien war kaum noch Tim23 nachweisbar. Andererseits zeigten die Mge1-Signale, dass teilweise auch bereits die Matrix der Mitochondrien für die Proteinase K zugänglich geworden war. Die Mitoplasten enthielten im Vergleich zu den Mitochondrien ca. 30% weniger Mge1. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass der Rest an etwa 20% PorB-Ngo, der in den Mitoplasten noch nachgewiesen wurde, nicht einem unvollständigen Schwellen der Mitochondrien zugeschrieben werden kann. Vielmehr lässt sich vermuten, dass PorB-Ngo im Intermembranraum in zwei unterschiedlichen Formen vorliegt, nämlich zu etwa 70-80% in einer Form, in der es nach Öffnen des Intermembranraums uneingeschränkt für Proteinase K zugänglich ist, zu 20-30% aber in einer Form, in der es auch nach Schwellen der Mitochondrien vor Proteinase K geschützt bleibt. Unter Berücksichtigung der bereits genannten Daten aus der Subfraktionierung der Mitochondrien von Frau Elke Dian lässt sich vermuten, dass der uneingeschränkt proteasegeschützte Anteil in die Innenmembran eingebettet ist, während der übrige, größere Anteil des PorB-Ngo mit der Innenmembran lediglich assoziiert bleibt.

5. DISKUSSION

Das Hauptaußenmembranprotein PorB-Ngo von *Neisseria gonorrhoeae* ist bei einer Infektion ein wichtiger Virulenzfaktor. Auf bislang noch unbekanntem Wege verlässt PorB-Ngo die bakterielle Außenmembran, wird von Wirtszellen aufgenommen und akkumuliert schließlich in den Mitochondrien [15]. Die Mitochondrien verlieren dann sehr schnell ihr Membranpotential und über eine Ausschüttung von Cytochrom c kann es zur Apoptose der Wirtszelle kommen [6]. Über die molekularen Mechanismen der Translokation und der PorB-induzierten Apoptose ist bislang kaum etwas bekannt. Nicht zuletzt aus Mangel an geeigneten *in vitro*-Systemen sind Untersuchungen zum PorB mit erheblichen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Tatsächlich sind seit der ersten Publikation zur PorB-induzierten Apoptose im Jahr 2002 bislang keine weiteren Studien veröffentlicht worden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde nun ein geeignetes Protokoll zum mitochondrialen Import des PorB *in vitro* entwickelt. Auf dieser Basis ließen sich erstmals einzelne Schritte der Translokation des PorB definieren und es konnten die jeweiligen Interaktionen des PorB mit den Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie charakterisiert werden. Es stellte sich heraus, dass das PorB bei seinem Import in die Mitochondrien einen ganz anderen Weg nimmt, als zunächst erwartet worden war. Der bislang unerklärliche Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ist offenbar die Konsequenz eines Importwegs, der zumindest einem Teil des PorB die Insertion in die mitochondriale Innenmembran erlaubt.

In der vorliegenden Studie wurde das PorB von *Neisseria gonorrhoeae*, PorB-Ngo, in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin synthetisiert. Es wurde ein Protokoll entwickelt, das den Import des radioaktiv markierten PorB-Ngo in drei Schritten ermöglicht: (I) Säureaktivierung des PorB-Ngo, (II) Anbindung an die Mitochondrien, (III) Import.

Im ersten Schritt (I) wird das PorB-Ngo durch kurzzeitige Inkubation mit HCl bei einem pH-Wert von ca. 5 und einer Temperatur von 20 °C aktiviert und dann durch Zugabe zusätzlichen Retikulozytenlysats in Gegenwart von 1 mM EDTA in einem importkompetenten Zustand stabilisiert. Die Säureaktivierung beruht

vermutlich auf einem Aufbrechen der β -Faltblattstrukturen des Proteins. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass stabil gefaltete Proteine nur mit sehr geringer Effizienz in Mitochondrien importiert werden können. Durch die enge Importpore der mitochondrialen Außenmembran können nur entfaltete Proteine importiert werden, bereits gefaltete Proteindomänen müssen spätestens an der Importpore wieder entfaltet werden [20]. Im Fall des PorB-Ngo wird die säureinduzierte Entfaltung offenbar durch Komponenten des Retikulozytenlysats stabilisiert. Da ATP sowohl auf die Importkompetenz als auch auf die Aggregationsneigung des PorB-Ngo einen ausgeprägten Einfluss hat, kann davon ausgegangen werden, dass ATP-abhängige Chaperonproteine des Retikulozytenlysats an das PorB-Ngo binden und an der Importkompetenz des PorB-Ngo einen wesentlichen Anteil haben. Durch die Zugabe des EDTA werden vermutlich die freien Magnesiumionen gebunden, die zusammen mit dem ATP eine frühzeitige Ablösung des PorB-Ngo von den ATP-abhängigen Chaperonproteinen auslösen könnten. Unter den Bedingungen der üblichen Standardprotokolle zum Import mitochondrialer Proteine aggregiert das PorB-Ngo sehr leicht, offenbar aufgrund einer ineffektiven Interaktion mit den Chaperonproteinen des Importansatzes.

Erst im zweiten Schritt (II) des neuen Protokolls wird das importkompetente PorB-Ngo mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Dabei kommt es zu einer schnellen Anbindung des PorB-Ngo an die Oberfläche der Mitochondrien. Da der Import mitochondrialer Vorstufenproteine generell durch ATP erleichtert wird, die für die Aktivität des ATP wichtigen Magnesiumionen aber weiterhin durch das zugesetzte EDTA inaktiviert sind, wird zunächst nur ein geringer Anteil des PorB-Ngo importiert. Die Experimente zeigen, dass die Anbindung des importkompetenten PorB-Ngo bereits nach ca. 2 Minuten weitgehend abgeschlossen ist. Die Proben werden in diesem Schritt zwar bei 25 °C inkubiert, Messungen ergaben aber, dass die Temperatur während dieser kurzen Zeit in den Ansätzen nur auf etwa 12 °C steigt. Die Mitochondrien lassen sich dann durch eine Zentrifugation reisolieren und damit von der Fraktion des PorB-Ngo abtrennen, die eine Neigung zur Aggregation und eine nur geringe Importkompetenz hat.

Im dritten Schritt (III) werden die reisolierten Mitochondrien dann in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM ATP resuspendiert und für mehrere Minuten bei

25 °C inkubiert. In diesem Schritt kommt es zu einer vergleichsweise langsamen, aber effizienten Translokation des zunächst nur gebundenen PorB-Ngo über die Außenmembran in den Intermembranraum der Mitochondrien. Die Zugabe des MgATP ist nicht essentiell, führt aber zu einer etwa doppelten Importeffizienz. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass ein Teil des PorB-Ngo in Form von Chaperon-Komplexen gebunden ist, aus denen das PorB-Ngo erst freigesetzt werden muss, bevor es durch den Importkanal in die Mitochondrien gelangen kann. Die Freisetzung von den Chaperonproteinen sollte durch die Zugabe des MgATP erleichtert werden. Ein erheblicher Teil des PorB-Ngo könnte aber auch bereits direkt an die Importpore gebunden sein und lediglich zeit- und temperaturabhängig importiert werden.

Der Nachweis der Translokation folgte dem üblichen Verfahren, d.h. die Mitochondrien wurden bei 0 °C für 10 Minuten mit Proteinase K inkubiert und dann erneut reisoliert. Durch entsprechende Titrations wurde sichergestellt, dass eine Inkubation mit 50 µg/ml Proteinase K ausreichend war, um das nicht importierte PorB-Ngo vollständig abzubauen. Das Protease-geschützte PorB-Ngo wurde als importiertes Protein definiert. In den meisten Experimenten wurden etwa 10-30 % des insgesamt eingesetzten PorB-Ngo in die Mitochondrien importiert.

In allen Versuchen, das PorB-Ngo nach den üblichen Standardprotokollen zu importieren, waren stets zwei Probleme aufgetreten. Zum einen war die Importeffizienz sehr gering (< 5 %), zum anderen aggregierte ein großer Teil des PorB-Ngo im Importansatz, sodass die Experimente in vielen Fällen kaum auswertbar waren. Die Aggregation des PorB-Ngo ließ sich auch mit dem neuen Importprotokoll nicht immer ganz vermeiden. In allen Importexperimenten wurden deshalb stets auch Proben inkubiert, zu denen zwar das PorB-Ngo pipettiert wurde, die aber keine Mitochondrien enthielten. Gegebenenfalls ließ sich eine Aggregation des PorB-Ngo mit Hilfe dieser Proben nachweisen.

Das neue Verfahren zum Import des PorB-Ngo über die Schritte I – III erlaubte nun, den Import des PorB-Ngo näher zu untersuchen. Die meisten Experimente wurden dabei mit Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

durchgeführt. Die Hefe hat als Modellsystem viele Vorteile, nicht zuletzt ist die mitochondriale Proteinimportmaschinerie in keinem Organismus derart umfassend charakterisiert worden wie in der Hefe [59]. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden aber auch Mitochondrien der Rattenleber und humane Mitochondrien aus Jurkat-Zellen in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass PorB-Ngo auf eine sehr ähnliche Weise in humane Mitochondrien importiert wird wie in Hefemitochondrien.

So wurden die homologen PorB-Proteine von *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* und *Neisseria mucosae* nach dem neuen Importprotokoll mit Mitochondrien sowohl der Hefe, als auch der Ratte und der Jurkat-Zellen inkubiert. Übereinstimmend wurde das PorB-Ngo in alle Mitochondrien sehr effizient importiert. Etwa 10-30 % des eingesetzten PorB-Ngo ließen sich nach Behandlung mit Proteinase K in den Mitochondrien nachweisen. Das homologe PorB von *Neisseria meningitidis* ließ sich ebenfalls importieren. Die Importeffizienz war aber in allen Mitochondrien wesentlich geringer, es wurden nur 2-3 % des Proteins importiert. Das PorB von *Neisseria mucosae* ließ sich in keine der Mitochondrien importieren. Interessanterweise waren nicht nur die relativen Importeffizienzen der PorB-Homologe in den Mitochondrien der drei Organismen vergleichbar, die unterschiedlichen Importeffizienzen korrelieren auch mit unterschiedlichen Effekten *in vivo*. Während PorB-Ngo Apoptose auslösen kann, ließ sich eine Auslösung von Apoptose durch das PorB von *N. meningitidis* bislang nicht nachweisen und *N. mucosae* ist gänzlich apathogen. Das PorB von *N. mucosae* wird auch in intakten Säugerzellen nicht in Mitochondrien importiert.

Da die Anbindung des PorB-Ngo an die Mitochondrien wesentlich schneller erfolgt als die Translokation in ein Protease-geschütztes Kompartiment, ist die Translokation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Imports. Diese Beobachtung gilt allerdings zunächst nur für die Bedingungen des im Rahmen dieser Studie erarbeiteten Protokolls. Insbesondere ist zu berücksichtigen, dass die schnelle Anbindung des PorB-Ngo in diesem Fall durch die Säureaktivierung des Proteins erleichtert sein könnte. Interessanterweise hatte

weder eine Trypsin-Vorbehandlung der Mitochondrien, noch eine Dissoziation des TOM-Komplexes (in den Mitochondrien der Mutante $\Delta tom22$) einen Einfluss auf die Importgeschwindigkeit. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen übereinstimmend, dass die Importgeschwindigkeit unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen von Rezeptorproteinen der mitochondrialen Außenmembran unabhängig ist. Sofern derartige Proteine überhaupt am Import des PorB-Ngo beteiligt sein sollten, so sind sie zumindest an keinem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt. Da Rezeptorproteine allenfalls an der Anbindung des PorB-Ngo beteiligt sein könnten, wird damit indirekt bestätigt, dass die Anbindung des PorB-Ngo kein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist.

In den meisten Experimenten dieser Studie wurde das mitochondriale Außenmembranprotein VDAC als endogenes Modellprotein importiert. Der VDAC (= das mitochondriale Porin) ist ähnlich dem PorB-Ngo ein typisches β -barrel-Protein und bot sich deshalb für einen Vergleich mit dem PorB-Ngo an [1]. Wenn der VDAC unter den üblichen Standardbedingungen in Mitochondrien importiert wurde, also ohne vorherige Säureaktivierung, zeigte der VDAC eine ausgeprägte Abhängigkeit von den mitochondrialen Importrezeptoren. Diese Beobachtung wird von älteren Daten bestätigt [27] [102]. Es ist denkbar, dass das PorB-Ngo unter anderen Importbedingungen ähnlich reagieren könnte wie der VDAC.

Gleichwohl war mit der Translokation als dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Imports die Möglichkeit gegeben, nach Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie zu suchen, die in diesen Schritt eingreifen. So ließ sich über die Verwendung der temperatursensitiven Mutante *tom40-4* nachweisen, dass Tom40 am Import des PorB-Ngo beteiligt ist. PorB-Ngo zeigte weitgehend die gleiche Abhängigkeit von Tom40 wie das Kontrollprotein VDAC. Tom40 bildet in der mitochondrialen Außenmembran die generelle Importpore für nahezu sämtliche mitochondrialen Proteine. Offensichtlich wird auch das bakterielle PorB-Ngo über diese Importpore in die Mitochondrien aufgenommen. In der Studie von Müller et al. (2002) war bereits für ein Derivat des PorB-Ngo ein Tom40-abhängiger Import nachgewiesen worden [6]. Es konnte aber noch nicht gezeigt werden, dass dieser Weg auch für das authentische PorB-Ngo relevant ist.

In der Studie von Müller et al. (2002) war postuliert worden, dass PorB-Ngo letztlich in die mitochondriale Außenmembran inserieren sollte [6]. Diese Annahme bezog ihre Plausibilität nicht zuletzt aus der Tatsache, dass PorB-Ngo auch in den Neisserien ein Außenmembranprotein ist. Inzwischen wurde mit dem SAM-Komplex (=TOB-Komplex) ein Proteinkomplex in der Außenmembran identifiziert, der für die Insertion endogener mitochondrialer β -barrel-Proteine in die Außenmembran verantwortlich ist. Zu den wichtigsten Komponenten dieses Komplexes gehören die beiden Membranproteine Mas37 und Sam50. Mit der Entdeckung dieses Komplexes ließ sich erneut eindrucksvoll der Bezug der Mitochondrien zu den Bakterien belegen, denn Neisserien enthalten in ihrer Außenmembran das Protein Omp85, das zum Sam50 eine deutliche Sequenzähnlichkeit aufweist und auch eine entsprechende Funktion wie das Sam50 hat. Omp85 ist in den Neisserien unmittelbar an der Insertion des PorB in die bakterielle Außenmembran beteiligt. In den Mitochondrien greifen Mas37 und Sam50 nicht nur in die Insertion der β -barrel-Proteine in die Membran ein, sondern sie sind auch bereits an der Translokation der Proteine durch die TOM-Pore beteiligt. In der vorliegenden Studie konnte dieser Effekt für den VDAC bestätigt werden. Nachdem die Translokation im Import des PorB-Ngo der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, war zu erwarten, dass bereits geringfügige Effekte des Mas37 und des Sam50 leicht nachweisbar sein sollten. In den eigenen Untersuchungen wurde eine Deletionsmutante des *MAS37* ($\Delta mas37$), sowie eine temperatursensitive Mutante des *SAM50* (*sam50-1*) verwendet. Die Mitochondrien dieser Mutanten zeigten für den VDAC ausgeprägte Importdefekte. Überraschend zeigte der Import des PorB-Ngo hingegen in den Mitochondrien beider Mutanten die gleiche Kinetik wie in den Mitochondrien des entsprechenden Wildtyps. Der Import des PorB-Ngo ist offenbar vom SAM-Komplex gänzlich unabhängig.

Die SAM-Unabhängigkeit des PorB-Ngo-Imports in Hefemitochondrien wirft drei nahe liegende Fragen auf: (1.) Ist eine SAM-Unabhängigkeit auch in den Mitochondrien humaner Zellen gegeben, oder nur in den Mitochondrien der Hefe? (2.) Wie kann das PorB-Ngo in die Außenmembran inserieren, wenn es nicht vom SAM-Komplex erkannt wird? (3.) Wo akkumuliert das PorB-Ngo,

wenn es nicht in der Außenmembran akkumulieren kann?

Im Anschluss an die Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente wurden inzwischen in der Arbeitsgruppe in Hohenheim, sowie bei Kooperationspartnern in Berlin Untersuchungen durchgeführt, die es erlauben, diese Fragen zu beantworten:

(1.) In der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Rudel am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, wurden inzwischen Mitochondrien aus HeLa-Zellen isoliert, in denen zuvor die Expression der Komponenten des humanen SAM-Komplexes unterdrückt wurde. Importexperimente mit diesen Mitochondrien bestätigten, dass PorB-Ngo auch vom humanen SAM-Komplex nicht erkannt wird [167].

(2.) In Hohenheim wurde das PorB-Ngo nach dem hier etablierten Importprotokoll in Hefemitochondrien importiert, und anschließend über eine Auftrennung von Membranvesikeln in Saccharose-Dichtegradienten lokalisiert. Dabei kolokalisierte das PorB-Ngo eindeutig nicht mit der Außenmembran, sondern mit der Innenmembran der Mitochondrien [166].

(3.) In der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Rudel wurde durch Immuno-Gold-Markierung nachgewiesen, dass PorB-Ngo in den Mitochondrien humaner Zellen bevorzugt im Inneren der Mitochondrien, überwiegend in oder an der Innenmembran akkumuliert.

Die eigenen Daten zur Lokalisation des PorB-Ngo lassen vermuten, dass das Protein bei Import in die Hefemitochondrien nur teilweise in die Innenmembran inseriert und überwiegend im Intermembranraum akkumuliert. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Carbonatextraktionen überein, die in der Arbeitsgruppe in Hohenheim durchgeführt wurden [166]. Die Carbonatextraktionen zeigen, dass nur etwa 10-20% des importierten PorB-Ngo in die Innenmembran eingebaut werden. Mit den Mitteln der Elektrophysiologie wurde allerdings kürzlich in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Richard Wagner vom Institut für Biophysik der Universität Osnabrück nachgewiesen, dass das PorB-Ngo in Membranen vergleichsweise große Poren bildet. Die Daten zeigen, dass bereits eine einzige PorB-Ngo-Pore hinreichend sein sollte, das Membranpotential eines Mitochondriums vollständig aufzuheben [168].

So ergibt sich für den Import des PorB-Ngo in die Mitochondrien ein gänzlich

neues Bild. Die vorhandenen Daten lassen sich in nunmehr vier Schritten zusammenfassen:

- (I) Für den Import des PorB-Ngo in die Mitochondrien ist zunächst eine importkompetente Konformation erforderlich. Spätestens an der Oberfläche der Mitochondrien ist der Schritt zur importkompetenten Konformation essentiell.
- (II) Die Anbindung des PorB-Ngo an die Oberfläche der Mitochondrien ließ sich in der vorliegenden Studie *in vitro* als zweiter Schritt des Imports rekonstruieren.
- (III) Die Translokation des PorB-Ngo erfolgt über Tom40 und damit über die generelle Importpore der mitochondrialen Außenmembran. In diesem dritten Schritt des Imports gelangt das PorB-Ngo unabhängig vom SAM-Komplex in den mitochondrialen Intermembranraum.
- (IV) Als vierter Schritt des Imports lässt sich nunmehr die Insertion zumindest einer Fraktion des importierten PorB-Ngo in die mitochondriale Innenmembran definieren. Hier bildet das PorB-Ngo eine Pore, die zu einer sofortigen Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials führt.

Da in der Literatur bislang vom Import eines β -barrel-Proteins in die mitochondriale Innenmembran nicht berichtet wurde, ist das PorB-Ngo das erste bekannte β -barrel Protein, das in diesem Kompartiment der Mitochondrien lokalisiert wurde.

Die Funktion des PorB-Ngo als Virulenzfaktor von *Neisseria gonorrhoeae* scheint somit primär in der Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials zu bestehen. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Quervernetzungsexperimente lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, dass PorB-Ngo mit bestimmten mitochondrialen Proteinen definierte Komplexe bilden könnte. Vielmehr scheint PorB-Ngo seine Funktion im Wesentlichen ohne eine Beteiligung endogener Partnerproteine auszuüben. Diese Vermutung wird von den elektrophysiologischen Daten unterstützt, die zeigen, dass reines PorB-Ngo allein eine große Pore bilden kann. Zudem gaben auch Untersuchungen mit der Methode der Blauen Nativgelelektrophorese keinerlei Hinweise auf einen

essentiellen Interaktionspartner des PorB-Ngo in den Mitochondrien [166].

Es stellt sich nun abschließend die Frage nach dem Bezug dieser Aktivität des PorB-Ngo zur Auslösung von Apoptose. Interessanterweise zeigen verschiedene Daten, dass ein vollständiger Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zumindest bei bestimmten Formen der Apoptose zu den ersten nachweisbaren Effekten zählt. In Folge der Aufhebung des Membranpotentials kommt es innerhalb der Mitochondrien zu einer erheblichen Umorganisation der Membranstrukturen. Diese Prozesse scheinen eine wesentliche Voraussetzung für die nachfolgende Freisetzung mitochondrialer Mediatoren zu sein, die dann im Zytosol für die Auslösung der Apoptose verantwortlich sind. Möglicherweise kann die weitere Charakterisierung der Aktivitäten des PorB-Ngo zu einer Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Vorgänge beitragen. Es ist auffällig, dass etwa das VacA-Toxin von *Helicobacter pylori* ebenfalls in Mitochondrien importiert wird und auch eine Apoptose von Wirtszellen auslösen kann [57]. Es ist nahe liegend, weitere funktionelle Ähnlichkeiten zwischen dem VacA-Toxin und dem PorB-Ngo zu vermuten. Dieser Möglichkeit wird derzeit in der Arbeitsgruppe in Hohenheim durch entsprechende Untersuchungen nachgegangen.

Unabhängig von den infektionsbiologischen Aspekten ergeben sich aus der Lokalisation des PorB-Ngo auch bemerkenswerte Perspektiven im Blick auf die generellen Mechanismen der Apoptose. Trotz intensiver Forschungen sind die Mechanismen der Freisetzung des Cytochrom c und anderer Mediatoren der Apoptose bislang nicht befriedigend geklärt. So ist auch weiterhin umstritten, welche Proteine unmittelbar an der Bildung der Pore beteiligt sind, durch die die Mediatoren aus den Mitochondrien in das Zytosol entlassen werden. Denkbar wäre etwa ein Schwellen der Mitochondrien aufgrund von Hyperpolarisation, was zur Ruptur der mitochondrialen Außenmembran führen könnte [169]. Diskutiert wurde aber auch die Möglichkeit einer Bildung großer Poren durch Mitglieder der proapoptotischen Bcl-2 Familie [170]. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der in einem noch nicht genau verstandenen Zusammenhang mit der Bildung der Pore steht, die den Export der Mediatoren in das Zytosol vermittelt, wird unter dem Namen *Permeability*

transition (PT) diskutiert [171].

Eine der Schlüsselfragen der Apoptose-Forschung ist somit die Frage nach der Struktur und Funktion der entsprechenden *Permeability transition pore*. Ein Problem hat sich in der Forschung in den vergangenen 10 Jahren daraus ergeben, dass fast alle Proteine, die an der Bildung oder an der Regulation dieser Pore beteiligt zu sein schienen, Proteine der mitochondrialen Außenmembran sind. Dieses gilt etwa für den VDAC, dem wiederholt eine Schlüsselfunktion in der Bildung der *Permeability transition pore* zugeschrieben wurde [172], sowie für sämtliche Mitglieder der Bcl-2 Familie [115] [116]. Damit ist aber unerklärlich, warum in einem sehr frühen Stadium der Apoptose das mitochondriale Membranpotential verloren geht, welches ein Potential der Innenmembran ist. Vielleicht kann die weitere Erforschung der Funktionen des PorB-Ngo dazu beitragen, die Rolle der mitochondrialen Innenmembran bei der Auslösung von Apoptose aufzuklären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptaußenmembranprotein PorB von *Neisseria gonorrhoeae* ist in der Lage, ausgehend von der Außenmembran der Bakterien sich in die Plasmamembran und anschließend in die Mitochondrien der Wirtszelle einzulagern und Apoptose der Zelle auszulösen. Zum besseren Verständnis der Pathogenese sollte in der vorliegenden Arbeit der Importweg und die intramitochondriale Lokalisierung dieses toxischen β -barrel-Proteins aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck musste zunächst ein geeignetes *in vitro* System für den Import in Mitochondrien etabliert werden, wobei als Modellsystem die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* diente. Bei Importexperimenten des radioaktiv markierten PorB in isolierte Hefemitochondrien konnte gezeigt werden, dass sich PorB in einer zweistufigen Reaktion in die Mitochondrien einlagert. Zunächst erfolgte eine Anbindung des Proteins an die Oberfläche der Mitochondrien, die durch Anwesenheit zytosolischer Komponenten in Form von Retikulozytenlysat verbessert werden konnte. Anschließend translozierte das Protein in einem zweiten Schritt ATP-abhängig über die mitochondriale Membran. Zur Aufklärung des Importwegs und der Lokalisierung in Mitochondrien wurde das Protein in Mitochondrien, isoliert aus bestimmten Mutanten der Hefe, importiert. Es zeigte sich, dass PorB sich nicht nur den für endogene mitochondriale β -barrel-Proteine etablierten Importweg zu Nutze macht, sondern zum Teil neue Importwege aufweist. So war die Erkennung des PorB an der Oberfläche der Mitochondrien unabhängig von Importrezeptoren des TOM-Komplexes. Lediglich die Komponente Tom40 des TOM-Komplexes war für die Translokation des PorB über die Außenmembran der Mitochondrien entscheidend. Anschließend wurde PorB nicht, wie für diese Proteine üblich, über den SAM-Komplex in die Außenmembran eingebaut. Vermutlich wird das PorB über einen anderen, noch unbekanntem Weg in die mitochondriale Innenmembran eingebaut, wo es in der Lage ist das Membranpotential der Mitochondrien zu zerstören und Apoptose der Wirtszelle auszulösen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Mechanismen des endogenen mitochondrialen Proteintransports zumindest teilweise auch für pathologische Prozesse von Bedeutung sind.

7. SUMMARY

The major outer membrane protein PorB of *Neisseria gonorrhoeae* has the unusual feature of translocating from the outer membrane of bacteria into target cell membranes. In target cells, the protein is targeted to mitochondria and induces host cell apoptosis. For a better understanding of the pathogenesis of this infection, the goal of the present doctoral thesis was to clarify the import pathway of PorB, thus to investigate the intramitochondrial localisation of this β -barrel protein. On this account, an adequate *in vitro* system had to be established whereas the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model system. *In vitro* experiments, where radioactive labelled PorB was imported in isolated yeast mitochondria, showed that the protein is incorporated into mitochondria by a reaction consisting of two steps: first PorB is bound to the mitochondrial surface, which is facilitated by cytosolic components, achieved by adding reticulocyte lysate to the import onset. The subsequent translocation across the mitochondrial membrane is ATP-dependant. To elucidate the import pathway and the intramitochondrial localisation of PorB, the protein was imported in certain yeast mutants. It was discovered that PorB did not only use established import pathways of endogenous mitochondrial proteins, but also partly follows new import pathways. The recognition of PorB on the mitochondrial surface is independent of the import receptors of the TOM-complex. The only component of the TOM-complex, which is important for PorB translocation across the mitochondrial outer membrane is Tom40. Subsequent import steps are different from other β -barrel proteins, because PorB is not integrated in the outer mitochondrial membrane by the SAM-complex.

Further experiments lead to the conclusion that PorB is localized in the inner mitochondrial membrane which might explain the reported loss of membrane potential and subsequent host cell apoptosis is induced.

These investigations support the hypothesis that mechanisms of endogenous mitochondrial protein transport are at least partly important for pathological processes.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Muller, A., et al., *Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases*. *Embo J*, 1999. **18**(2): p. 339-52.
2. Bernardi, P., et al., *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. *Eur J Biochem*, 1999. **264**(3): p. 687-701.
3. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, *Overview of cell death signaling pathways*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(2): p. 139-63.
4. Muller, A. and T. Rudel, *Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens*. *Int J Med Microbiol*, 2001. **291**(3): p. 197-207.
5. Dehio, C., S.D. Gray-Owen, and T.F. Meyer, *Host cell invasion by pathogenic Neisseriae*. *Subcell Biochem*, 2000. **33**: p. 61-96.
6. Muller, A., et al., *Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of Neisseria gonorrhoeae to mitochondria of infected cells*. *Embo J*, 2000. **19**(20): p. 5332-43.
7. Enders, M., A. Turnwald-Maschler, and T. Regnath, *Antimicrobial resistance of Neisseria gonorrhoeae isolates from the Stuttgart and Heidelberg areas of southern Germany*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006. **25**(5): p. 318-22.
8. Lang, A., *Diplomarbeit: Untersuchungen zur Spezifität des mitochondrialen Imports bakterieller und endogener β -barrel Proteine*, in *Institut für Zelluläre Mikrobiologie*. 2005, Universität Hohenheim: Stuttgart.
9. Wiedemann, N., et al., *Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane*. *Nature*, 2003. **424**(6948): p. 565-71.
10. Mihara, K., *Cell biology: moving inside membranes*. *Nature*, 2003. **424**(6948): p. 505-6.
11. Rudel, T., et al., *Interaction of two variable proteins (PilE and PilC) required for pilus-mediated adherence of Neisseria gonorrhoeae to human epithelial cells*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(22): p. 3439-50.
12. Makino, S., J.P. van Putten, and T.F. Meyer, *Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by Neisseria gonorrhoeae into human epithelial cells*. *Embo J*, 1991. **10**(6): p. 1307-15.
13. Dehio, M., et al., *Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by Neisseria gonorrhoeae involves alpha(v) integrin receptors*. *FEBS Lett*, 1998. **424**(1-2): p. 84-8.
14. Massari, P., et al., *The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity*. *Trends Microbiol*, 2003. **11**(2): p. 87-93.
15. Weel, J.F. and J.P. van Putten, *Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells*. *Res Microbiol*, 1991. **142**(9): p. 985-93.
16. Rudel, T., et al., *Modulation of Neisseria porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis*. *Cell*, 1996. **85**(3): p. 391-402.
17. Rapaport, D., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(4): p. 191-7.
18. Schleiff, E., et al., *Prediction of the plant beta-barrel proteome: a case*

- study of the chloroplast outer envelope*. Protein Sci, 2003. **12**(4): p. 748-59.
19. Blachly-Dyson, E. and M. Forte, *VDAC channels*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 113-8.
 20. Ahting, U., et al., *Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1151-60.
 21. Sogo, L.F. and M.P. Yaffe, *Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1361-73.
 22. Schulz, G.E., *The structure of bacterial outer membrane proteins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(2): p. 308-17.
 23. Subbarao, G.V. and B. van den Berg, *Crystal Structure of the Monomeric Porin OmpG*. J Mol Biol, 2006. **360**(4): p. 750-9.
 24. Massari, P., Y. Ho, and L.M. Wetzler, *Neisseria meningitidis porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9070-5.
 25. van der Ley, P., et al., *Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp.* Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 2963-71.
 26. Judd, R.C., *Protein I: structure, function, and genetics*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2 Suppl**: p. S41-8.
 27. Krimmer, T., et al., *Biogenesis of Porin of the Outer Mitochondrial Membrane Involves an Import Pathway via Receptors and the General Import Pore of the TOM Complex*. J. Cell Biol., 2001. **152**(2): p. 289-300.
 28. Boya, P., B. Roques, and G. Kroemer, *New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level*. Embo J, 2001. **20**(16): p. 4325-31.
 29. Posada, D., et al., *Population genetics of the porB gene of Neisseria gonorrhoeae: different dynamics in different homology groups*. Mol Biol Evol, 2000. **17**(3): p. 423-36.
 30. Sandstrom, E.G., K.C. Chen, and T.M. Buchanan, *Serology of Neisseria gonorrhoeae: coagglutination serogroups WI and WII/III correspond to different outer membrane protein I molecules*. Infect Immun, 1982. **38**(2): p. 462-70.
 31. Hachiya, N., et al., *A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins*. Embo J, 1993. **12**(4): p. 1579-86.
 32. Goder, V., T. Junne, and M. Spiess, *Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1470-8.
 33. White, S.H. and G. von Heijne, *The machinery of membrane protein assembly*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(4): p. 397-404.
 34. Bowie, J.U., *Solving the membrane protein folding problem*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 581-9.
 35. Soti, C., et al., *Heat shock proteins as emerging therapeutic targets*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(6): p. 769-80.
 36. Lee, S. and F.T. Tsai, *Molecular chaperones in protein quality control*. J Biochem Mol Biol, 2005. **38**(3): p. 259-65.
 37. Bukau, B., T. Hesterkamp, and J. Luirink, *Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(12): p.

- 480-6.
38. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl, *The role of molecular chaperones in protein folding*. *Faseb J*, 1995. **9**(15): p. 1559-69.
 39. Nelson, R.J., et al., *The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis*. *Cell*, 1992. **71**(1): p. 97-105.
 40. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. *Science*, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
 41. McCarty, J.S., et al., *The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system*. *J Mol Biol*, 1995. **249**(1): p. 126-37.
 42. Greene, M.K., K. Maskos, and S.J. Landry, *Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6108-13.
 43. Young, J.C., J.M. Barral, and F. Ulrich Hartl, *More than folding: localized functions of cytosolic chaperones*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(10): p. 541-7.
 44. Craig, E.A. and C.A. Gross, *Is hsp70 the cellular thermometer?* *Trends Biochem Sci*, 1991. **16**(4): p. 135-40.
 45. Schatz, G., *The protein import machinery of mitochondria*. *Protein Sci*, 1993. **2**(2): p. 141-6.
 46. Wiedmann, B., et al., *A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation*. *Nature*, 1994. **370**(6489): p. 434-40.
 47. Lithgow, T., et al., *Yeast mitochondria lacking the two import receptors Mas20p and Mas70p can efficiently and specifically import precursor proteins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(21): p. 15325-30.
 48. Lithgow, T., et al., *A constitutive form of heat-shock protein 70 is located in the outer membranes of mitochondria from rat liver*. *FEBS Lett*, 1993. **332**(3): p. 277-81.
 49. Young, J.C., N.J. Hoogenraad, and F.U. Hartl, *Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70*. *Cell*, 2003. **112**(1): p. 41-50.
 50. Sickmann, A., et al., *The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13207-12.
 51. Schatz, G. and B. Dobberstein, *Common principles of protein translocation across membranes*. *Science*, 1996. **271**(5255): p. 1519-26.
 52. Neupert, W., *Protein import into mitochondria*. *Annu Rev Biochem*, 1997. **66**: p. 863-917.
 53. Alberts, B., Lewis, Raff, Roberts, Watson, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Dr. Michael G. Weller ed. Vol. 1. 1986, Weinheim: WILEY-VCH, Essential Cell Biology Interactive. 1282.
 54. Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner, *Mitochondrial import and the twin-pore translocase*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(7): p. 519-30.
 55. Koehler, C.M., *New developments in mitochondrial assembly*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 309-35.
 56. Dalbey, R.E. and A. Kuhn, *YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(6): p. 769-74.
 57. Galmiche, A., et al., *The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release*. *Embo J*, 2000. **19**(23): p. 6361-70.
 58. Papatheodorou, P., et al., *The enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)*

- Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology.* Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 677-89.
59. Schatz, G., *The Isolation Of Possible Mitochondrial Precursor Structures From Aerobically Grown Baker's Yeast.* Biochem Biophys Res Commun, 1963. **12**: p. 448-51.
60. Rapaport, D., *Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins.* EMBO Rep, 2003. **4**(10): p. 948-52.
61. Kunkele, K.P., et al., *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.* Cell, 1998. **93**(6): p. 1009-19.
62. Model, K., et al., *Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(4): p. 361-70.
63. Lutz, T., W. Neupert, and J.M. Herrmann, *Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space.* Embo J, 2003. **22**(17): p. 4400-8.
64. Chacinska, A., et al., *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins.* Embo J, 2004. **23**(19): p. 3735-46.
65. Rissler, M., et al., *The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins.* J Mol Biol, 2005. **353**(3): p. 485-92.
66. Rehling, P., et al., *Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase.* Science, 2003. **299**(5613): p. 1747-51.
67. Koehler, C.M., *The small Tim proteins and the twin Cx3C motif.* Trends Biochem Sci, 2004. **29**(1): p. 1-4.
68. Wiedemann, N., A.E. Frazier, and N. Pfanner, *The protein import machinery of mitochondria.* J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14473-6.
69. Truscott, K.N., et al., *A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1074-82.
70. Geissler, A., et al., *The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel.* Cell, 2002. **111**(4): p. 507-18.
71. Glick, B.S., et al., *Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism.* Cell, 1992. **69**(5): p. 809-22.
72. Neupert, W. and M. Brunner, *The protein import motor of mitochondria.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 555-65.
73. Matouschek, A., N. Pfanner, and W. Voos, *Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor.* EMBO Rep, 2000. **1**(5): p. 404-10.
74. Taylor, A.B., et al., *Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences.* Structure, 2001. **9**(7): p. 615-25.
75. van Wilpe, S., et al., *Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase.* Nature, 1999. **401**(6752): p. 485-9.
76. Hill, K., et al., *Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment].* Nature, 1998. **395**(6701): p. 516-21.

77. Ahting, U., et al., *The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 959-68.
78. Model, K., et al., *Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex*. J Mol Biol, 2002. **316**(3): p. 657-66.
79. Ryan, M.T., R. Wagner, and N. Pfanner, *The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(1): p. 13-21.
80. Endo, T. and D. Kohda, *Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 3-14.
81. Meisinger, C., et al., *Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2337-48.
82. Herrmann, J.M. and W. Neupert, *What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 331-8.
83. Gaume, B., et al., *Unfolding of preproteins upon import into mitochondria*. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6497-507.
84. Matouschek, A., et al., *Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein import*. Embo J, 1997. **16**(22): p. 6727-36.
85. Voos, W., et al., *Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins*. Embo J, 1996. **15**(11): p. 2668-77.
86. De Los Rios, P., et al., *Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6166-71.
87. Brix, J., K. Dietmeier, and N. Pfanner, *Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20730-5.
88. Dietmeier, K., et al., *Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 195-200.
89. Komiya, T., et al., *Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis*. Embo J, 1998. **17**(14): p. 3886-98.
90. Brix, J., et al., *Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16522-30.
91. Endres, M., W. Neupert, and M. Brunner, *Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex*. Embo J, 1999. **18**(12): p. 3214-21.
92. Wiedemann, N., N. Pfanner, and M.T. Ryan, *The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria*. Embo J, 2001. **20**(5): p. 951-60.
93. Pfanner, N. and A. Geissler, *Versatility of the mitochondrial protein import machinery*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 339-49.

94. Ramage, L., et al., *Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast*. *Embo J*, 1993. **12**(11): p. 4115-23.
95. Gabriel, K., S.K. Buchanan, and T. Lithgow, *The alpha and the beta: protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(1): p. 36-40.
96. Matouschek, A. and B.S. Glick, *Barreling through the outer membrane*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(4): p. 284-6.
97. Johnson, A.E. and R.E. Jensen, *Barreling through the membrane*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(2): p. 113-4.
98. Hoppins, S.C. and F.E. Nargang, *The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12396-405.
99. Wiedemann, N., et al., *Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18188-94.
100. Voulhoux, R., et al., *Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly*. *Science*, 2003. **299**(5604): p. 262-5.
101. Milenkovic, D., et al., *Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 22781-5.
102. Kozjak, V., et al., *An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 48520-3.
103. Meisinger, C., et al., *The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane*. *Dev Cell*, 2004. **7**(1): p. 61-71.
104. Habib, S.J., et al., *Assembly of the TOB complex of mitochondria*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6434-40.
105. Waizenegger, T., et al., *Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(1): p. 57-62.
106. Schleiff, E., J.R. Silvius, and G.C. Shore, *Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20*. *J Cell Biol*, 1999. **145**(5): p. 973-8.
107. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(6): p. 663-9.
108. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(8): p. 589-98.
109. Cline, A.M. and M.Z. Radic, *Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity*. *Clin Immunol*, 2004. **112**(2): p. 175-82.
110. de Almeida, C.J. and R. Linden, *Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(14): p. 1532-46.
111. Mitchell, J.E., et al., *The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5718-25.
112. Sanges, D. and V. Marigo, *Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF*. *Apoptosis*, 2006.
113. Reed, J.C., *Double identity for proteins of the Bcl-2 family*. *Nature*, 1997. **387**(6635): p. 773-6.
114. Wang, H.G., U.R. Rapp, and J.C. Reed, *Bcl-2 targets the protein kinase*

- Raf-1 to mitochondria*. Cell, 1996. **87**(4): p. 629-38.
115. Susin, S.A., et al., *Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1331-41.
 116. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
 117. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.
 118. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 468-77.
 119. Di Lisa, F. and P. Bernardi, *Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury*. Mol Cell Biochem, 1998. **184**(1-2): p. 379-91.
 120. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
 121. Cai, J., J. Yang, and D.P. Jones, *Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 139-49.
 122. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
 123. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
 124. Jacobs, E.E. and D.R. Sanadi, *The reversible removal of cytochrome c from mitochondria*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. 531-4.
 125. Jeremy E. Moss, I.I.-H., Arturo Zychlinsky, *Induction of Apoptosis by Microbial Pathogens*. Cellular Microbiology, ed. P.B. Pascale Cossart, Staffan Normark, Rino Rappuoli. 2000, Washington DC: ASM Press.
 126. Zychlinsky, A. and P. Sansonetti, *Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis*. J Clin Invest, 1997. **100**(3): p. 493-5.
 127. Zychlinsky, A., M.C. Prevost, and P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 167-9.
 128. Zychlinsky, A., et al., *IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri*. Mol Microbiol, 1994. **11**(4): p. 619-27.
 129. Chen, L.M., K. Kaniga, and J.E. Galan, *Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages*. Mol Microbiol, 1996. **21**(5): p. 1101-15.
 130. Monack, D.M., et al., *Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9833-8.
 131. Guzman, C.A., et al., *Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol, 1996. **20**(1): p. 119-26.
 132. Rogers, H.W., et al., *Listeria monocytogenes induces apoptosis of infected hepatocytes*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 679-84.
 133. Chen, G., et al., *Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by Helicobacter pylori and accompanied by increased expression of BAK*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(2): p. 626-32.

134. Kuck, D., et al., *Vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5080-7.
135. Boyd, A.P., et al., *Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 730-8.
136. Jonas, D., et al., *Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation*. Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1304-12.
137. Bantel, H., et al., *alpha-Toxin is a mediator of Staphylococcus aureus-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling*. J Cell Biol, 2001. **155**(4): p. 637-48.
138. Sirrenberg, C., et al., *Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 912-5.
139. **Sambrook**, J.e.a., *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
140. von A. Galmiche, M.B.z.V.g.
141. von T. Krimmer, U.F.z.V.g.
142. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**(1): p. 19-27.
143. Gambill, B.D., et al., *A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins*. J Cell Biol, 1993. **123**(1): p. 109-17.
144. von Prof. Dr. A. Heinisch, U.O.z.V.g.
145. Krimmer, T., et al., *Mitochondrial Protein Import Motor: the ATPase Domain of Matrix Hsp70 Is Crucial for Binding to Tim44, while the Peptide Binding Domain and the Carboxy-Terminal Segment Play a Stimulatory Role*. Mol. Cell. Biol., 2000. **20**(16): p. 5879-5887.
146. Truscott, K.N. and N. Pfanner, *Import of carrier proteins into mitochondria*. Biol Chem, 1999. **380**(10): p. 1151-6.
147. Daum, G., P.C. Bohni, and G. Schatz, *Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria*. J Biol Chem, 1982. **257**(21): p. 13028-33.
148. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int J Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-6.
149. von AG Pfizenmaier, I.f.Z.u.I., Universität Vaihingen zur Verfügung gestellt.
150. von AG Rösner, I.f.Z., Universität Hohenheim angezüchtet.
151. Pelham, H.R. and R.J. Jackson, *An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates*. Eur J Biochem, 1976. **67**(1): p. 247-56.
152. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye*

- binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
153. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
154. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
155. Grazyna Domanska, U.H., *unveröffentlichte Daten*. 2006.
156. Rassow, P.D.J., *Protein folding and import into organelles*. Post-translational Processing, A Practical Approach, ed. B.D. Hames. Vol. 203. 1999, Oxford: The Practical Approach Series.
157. Massari, P., et al., *Neisserial PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with Neisseria meningitidis and protects cells from apoptosis*. Cell Microbiol, 2003. **5**(2): p. 99-109.
158. Muller, A., et al., *VDAC and the bacterial porin PorB of Neisseria gonorrhoeae share mitochondrial import pathways*. Embo J, 2002. **21**(8): p. 1916-29.
159. Pfanner, N., et al., *Assembling the mitochondrial outer membrane*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1044-8.
160. Rassow, J. and N. Pfanner, *The protein import machinery of the mitochondrial membranes*. Traffic, 2000. **1**(6): p. 457-64.
161. Vasiljev, A., et al., *Reconstituted TOM Core Complex and Tim9/Tim10 Complex of Mitochondria Are Sufficient for Translocation of the ADP/ATP Carrier across Membranes*. Mol. Biol. Cell, 2004. **15**(3): p. 1445-1458.
162. Stojanovski, D., et al., *Mitochondrial morphology and protein import-A tight connection?* Biochim Biophys Acta, 2006.
163. Motz, C., et al., *Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane*. J Mol Biol, 2002. **323**(4): p. 729-38.
164. Ahting, U., et al., *Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 48-53.
165. Zara, V., et al., *Biogenesis of the dicarboxylate carrier (DIC): translocation across the mitochondrial outer membrane and subsequent release from the TOM channel are membrane potential-independent*. J Mol Biol, 2001. **310**(5): p. 965-71.
166. Elke Dian, U.H., *unveröffentlichte Daten*. 2006.
167. al., V.K.-P.e., *unveröffentlichte Daten*. 2006.
168. Meinecke, A.H.u.M., *unveröffentlichte Daten*. 2006.
169. Vander Heiden, M.G., et al., *Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. Cell, 1997. **91**(5): p. 627-37.
170. Antonsson, B., et al., *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. Biochem J, 2000. **345 Pt 2**: p. 271-8.
171. Kroemer, G., N. Zamzami, and S.A. Susin, *Mitochondrial control of apoptosis*. Immunol Today, 1997. **18**(1): p. 44-51.
172. Krauskopf, A., et al., *Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 590-5.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. J. Rassow danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die guten Arbeitsbedingungen, seine nette Betreuung und stete Unterstützung.

Bei Prof. Dr. A. Kuhn bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Zelluläre Mikrobiologie der Universität Hohenheim.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer möchte ich für die freundliche Annahme der Arbeit und deren Vertretung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danken.

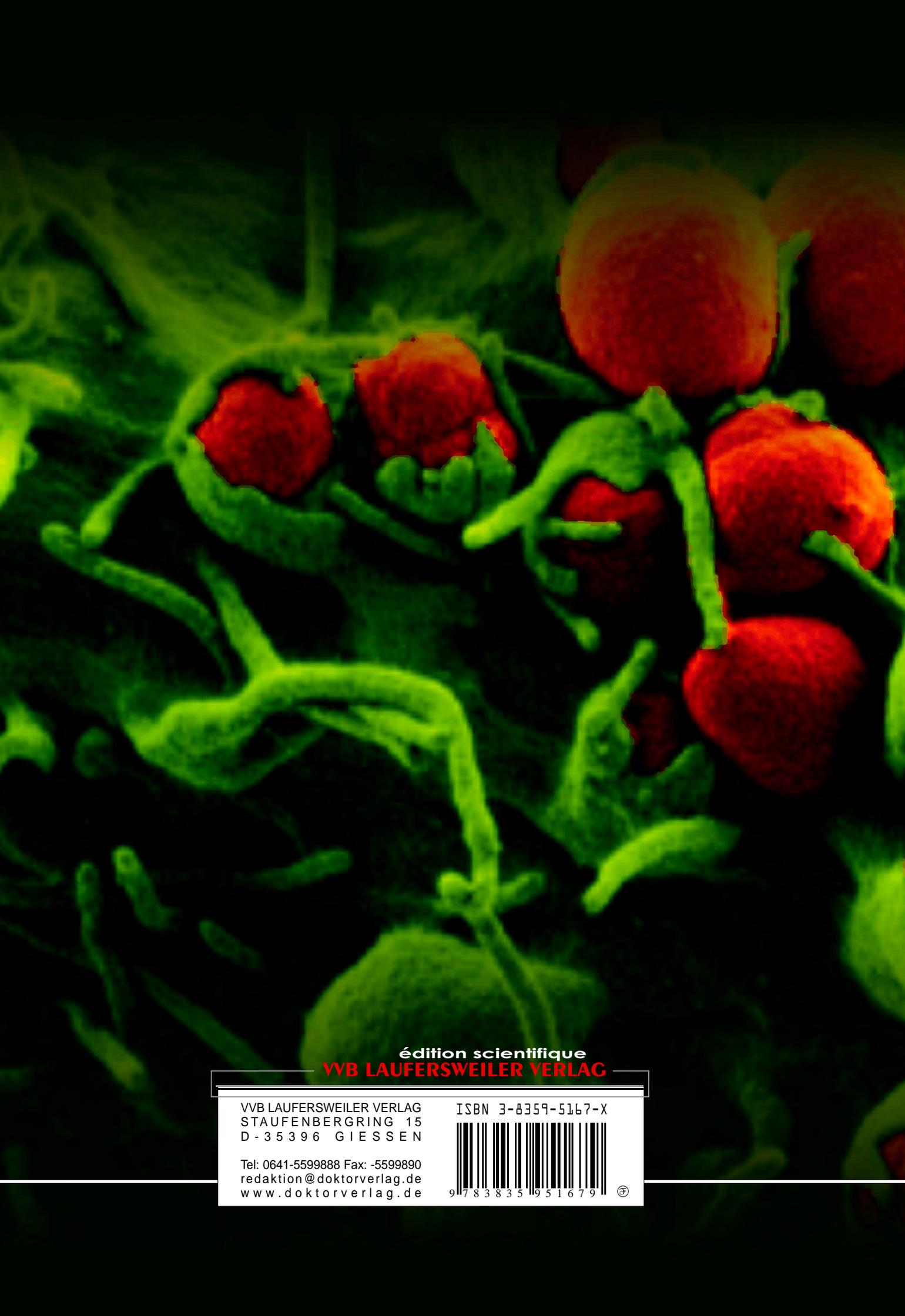
Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl.Biol. Elke Dian für die hervorragende Einführung und Einarbeitung in das Arbeitsgebiet und die erforderlichen Methoden. Sie hat mich während der gesamten Zeit nicht nur stets gut betreut und fachlich beraten, sondern mich auch immer wieder von den Vorzügen Stuttgarts überzeugen können.

Herrn Dipl. Biol. P. Papatheodorou und Herrn Dr. C. Motz danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und ihre fachliche Unterstützung, Frau E. Seibel gilt mein Dank für Hilfestellungen jeglicher Art und ihre wertvollen Ratschläge.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die freundliche Aufnahme, die erwiesene Hilfsbereitschaft und besonders für das gute Arbeitsklima, das mir den Aufenthalt am Institut so angenehm wie möglich gestaltete.

Von Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Freund Christopher für ihre Geduld und ihren Beistand in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5167-X



9 783835 951679

