Die Rolle des mitochondrialen Hsp70-Systems bei verschiedenen Prozessen der Organell-Biogenese

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dr. rer. nat. Elisabeth Schwarz
geb. am: 09. 06. 1957 in: Ingolstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl
3. Prof. Dr. Nikolaus Pfanner

Halle (Saale), den 26.09.2000

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG 1

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION 8

Die Funktion des mitochondrialen Hsp70 bei der Sortierung von Cytochrom b_2 8

1. Mutationen im intramitochondrialen Sortierungspeptid führen zu einer Fehlsortierung von Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix 8

2. Mam33p wurde durch Affinitätschromatographie mit dem Wildtyp-Sortierungspeptid von Cytochrom b_2 identifiziert 12

3. Ssc1p tritt mit fehlsortierten Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen in Wechselwirkung 13

4. Die Fehlsortierung einer Cytochrom b2-Mutante wird durch ein temperatursensitives *SSC1*-Allel unterdrückt 16

Die Rolle des mitochondrialen DnaJ-Proteins, Mdj1p, bei der Organell-Biogenese 19

1. Der offene Leserahmen von *XDJ1* kodiert für ein DnaJ-Protein unbekannter Funktion 19

2. Mdj1p ist ein mitochondriales DnaJ-Homolog 20

3. Mdj1p ist keine essentielle Komponente des mitochondrialen Proteinimportapparates 22

4. Mdj1p wird für die Faltung von in die mitochondriale Matrix importierten Proteinen benötigt 24

5. Mdj1p spielt eine protektive Rolle bei Hitzestreß 26

6. Mutationen in allen Domänen von Mdj1p führen zu Wachstums-defekten 27

7. Mdj1p ist an der Biogenese des vom mitochondrialen Genom kodierten Var1-Proteins beteiligt 30

8. Mitochondrien der *mdj1-5* Mutante besitzen bei restriktiver Temperatur eine verminderte DNA-Polymerase-Aktivität 31

9. DnaJ aus *E. coli* und eine Reihe von nicht mitochondrialen DnaJ-Proteinen aus *S. cerevisiae* komplementieren Mdj1p 34

Die Funktion des GrpE-Homologs, Mge1p, in Mitochondrien 38

1. Austausche konservierter Aminosäuren im Mge1-Protein führen zu einem konditional letalen Phänotyp 38

2. Mitochondrien, welche Mge1-Proteine mit Mutationen enthalten, zeigen bei restriktiver Temperatur einen Import-Defekt, da die Bindung von Ssc1p an translozierende Polypeptidketten beeinträchtigt ist 39

3. Mge1p moduliert die nukleotidabhängige Assoziation von Ssc1p mit der Importkomponente Tim44p 41

4. Mge1p wird für die Faltung eines in die Matrix importierten Testproteins (DHFR) benötigt 43

5. Alle Mutationen in den Mge1-Proteinen bewirken eine reduzierte Stabilität 43

RESÜMEE 47

LITERATUR 50

Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten, eigenen Veröffentlichungen 71

Eidesstattliche Erklärung 73

Curriculum Vitae 74

Danksagung 76

EINLEITUNG

Alle derzeit bekannten Organismen, sogar extrem thermophile Archebakterien, besitzen Hitzeschockproteine. Entdeckt wurde die zelluläre Antwort auf Hitzeschock bereits vor mehr als 30 Jahren an der „puff“-Bildung bei Chromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Ritossa et al., 1962). Auch Hitzeschockproteine wurden erstmals bei Fruchtfliegen beschrieben, wo bestimmte Proteine in den Fliegenlarven bei Hitzeschock überproduziert werden (Tissières et al., 1974). In den folgenden Jahren wurden Hitzeschockproteine vor allem in Prokaryonten charakterisiert. Von den ersten in der Literatur erwähnten bakteriellen Hitzeschockproteinen, GroEL und DnaK, war zum damaligen Zeitpunkt allerdings nicht bekannt, daß diese Proteine als Antwort auf Hitzestreß induziert werden. GroE und DnaK wurden zunächst als essentielle Proteine des Wirts *Escherichia coli* für die Propagierung des Bakteriophagen λ erkannt (Georgopoulos und Herskowitz, 1971; siehe Übersichtsartikel von Zylicz, 1993). Erst später ging aus zahlreichen Experimenten zur *E. coli* -Physiologie hervor, daß diese Proteine eine wichtige Rolle bei Hitzestreß spielen und daß sie, wie sehr viele Hitzeschockproteine, molekulare "Chaperone“ darstellen.

Der Begriff "chaperone" (engl. für Anstandsdame) wurde bereits von Laskey in den späten siebziger Jahren für die Rolle von Nukleoplasmin bei der Reassoziation von Nukleosomen geprägt. Das Attribut "molecular chaperone" sollte zum Ausdruck bringen, daß die Aufgabe dieses Proteins darin besteht, "unerwünschte oder schädliche Begegnungen" eines zu schützenden, labilen oder entfalteten Proteins mit unpassenden Partnern zu verhindern (Laskey et al., 1978). Die allgemeine und offensichtlich ubiquitäre Bedeutung molekularer Chaperone bei der Assoziation und Dissoziation von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten wurde dann durch Untersuchungen zur Assemblierung einer bakteriellen Ribulosebisphosphat Carboxylase durch GroEL/S und bei der Hsp70-vermittelten Auflösung von Clathrin-“coats“ bestätigt (Hemmingsen et al., 1988; Pelham, 1986; Goloubinoff et al., 1989). Als Chaperone werden Proteine dann bezeichnet, wenn sie i) die Aggregation eines "Substratproteins[1]" während der Faltung bzw. Entfaltung unterdrücken, ii) die Ausbeute an nativem Protein nach der Rückfaltung aus dem denaturierten Zustand

[1] Proteine, welche mit Chaperon-Proteinen assoziieren, werden im Folgenden, wie in der englischen Literatur üblich, als „Substratproteine“ bezeichnet.

erhöhen, oder iii) die Faltungskinetik beeinflussen. Im Gegensatz zur enzymatischen Katalyse müssen Chaperone in etwa stöchiometrischem Verhältnis zum Substratprotein vorliegen um ihre Funktion auszuüben. *Per definitionem* aber sind sie niemals selbst Bestandteil oder Untereinheit des gefalteten Proteins bzw. des assemblierten Proteinkomplexes.

Die große allgemeine Bedeutung von Hitzeschockproteinen der 70 kDa-Klasse (Hsp70) zeigt die Tatsache, daß nahezu alle Organismen Mitglieder der Hsp70-Familie besitzen. Erste biochemische Studien zur Chaperonfunktion des bakteriellen Hsp70- oder DnaK-Systems wurden anhand des rekonstituierten DNA-Replikationssystems des Bakteriophagen λ durchgeführt. Bei der Phagen-DNA-Replikation dissoziiert DnaK einen die Replikation inhibierenden Proteinkomplex (als Übersichtsartikel, siehe Zylicz, 1993). Im folgenden wurde in einer Vielzahl von *in vitro*-Unterschungen gezeigt, daß DnaK vorwiegend mit Proteinen, die nicht-native Segmente exponieren, transient in Wechselwirkung tritt. Es sollte jedoch erwähnt werden, daß DnaK auch einige native Proteine bindet. Nicht-native Proteine werden durch Wechselwirkung mit DnaK in einem löslichen, faltungskompetenten Zustand gehalten. Die beiden sogenannten "cohort-chaperones", DnaJ und GrpE, beschleunigen den von DnaK durchlaufenen ATP-abhängigen Substrat-Bindungs-Zyklus (Liberek et al., 1991a). Das an DnaK gebundene Nukleotid, ATP oder ADP, beeinflußt die Affinität von DnaK zum Substratprotein (Liberek et al., 1991b; McCarty et al., 1995). DnaK besitzt in der ADP-gebundenen Konformation eine höhere Affinität zum Substrat als in der ATP-gebundenen Konformation (Palleros et al., 1991; Schmid et al., 1994; als Übersichtsartikel siehe: Hartl, 1996; Bukau und Horwich, 1998).

DnaJ fördert die Bindung von entfalteten Proteinen an DnaK in zweierlei Hinsicht: zum einen bindet DnaJ selbst viele nicht-native Proteine und erleichtert kooperativ deren Assoziation mit DnaK (Gamer et al., 1992; Szabo et al., 1994; Wawrzynów und Zylicz, 1995; Wawrzynów et al., 1995), zum anderen stimuliert DnaJ die ATPase-Aktivität von DnaK und trägt damit zur Stabilisierung des DnaK-Substratprotein-Komplexes bei (Szabo et al., 1994; Jordan und McMacken, 1995; McCarty et al., 1995; Pierpaoli et al., 1997; Laufen et al., 1999). GrpE vermittelt die Ablösung des an DnaK gebundenen Nukleotids (Liberek et al., 1991a; McCarty et al., 1995; Pierpaoli et al., 1997; Packschies et al., 1997). Der durch DnaJ und GrpE beschleunigte, ATP-getriebene Substratbindungszyklus von DnaK wird durch das in Abb. 1

dargestellte Modell beschrieben: 1. DnaK (Hsp70) bindet in der ATP-gebundenen Konformation schnell und mit niedriger Affinität Substratprotein. 2. DnaJ stimuliert die ATPase-Aktivität von DnaK (Hsp70). Die Dissoziationsgeschwindigkeit des Substrats ist in

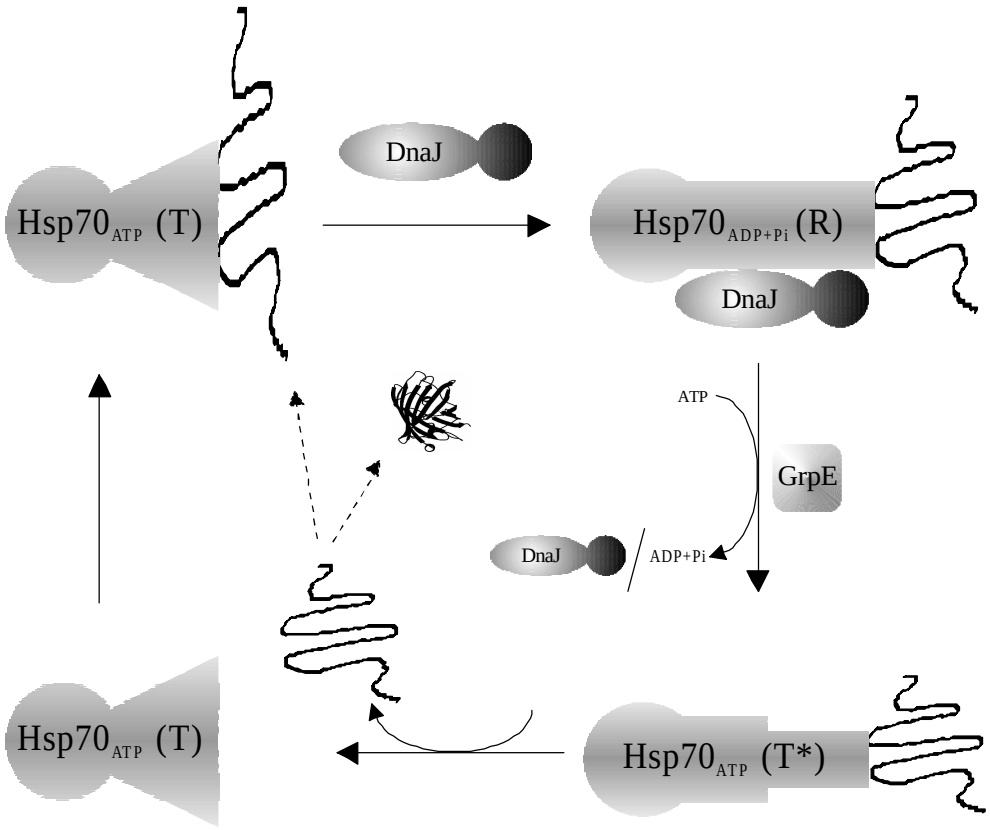

Abb. 1: Modell für den ATP getriebenen Substrat-Bindungs-Zyklus des Hsp70-, bzw. DnaK-Systems, abgewandelt nach Gisler et al., 1998. Die ATPase-Domäne von Hsp70 ist kreisförmig dargestellt, die Substrat-Bindedomäne rechteckig, bzw. trapezförmig. Die Domänenstuktur von DnaJ ist ebenfalls durch unterschiedliche Symbole angedeutet. Der Substrat-Bindungs-Zyklus des Chaperon-Systems wird kurz im Text zusammengefaßt.

der ADP-gebundenen Konformation stark herabgesetzt, und der ternäre Komplex aus DnaK, DnaJ und Substratprotein wird stabilisiert. 3. GrpE beschleunigt die Freisetzung des an DnaK gebundenen ADP. 4. Nach Bindung eines neuen Moleküls ATP an DnaK wird DnaK in eine transiente Konformation (T*) überführt, welche in einer Art „Katapult-Mechanismus“ die

Substratfreisetzung ermöglicht (Gisler et al., 1998; Szabo et al. 1994; McCarty et al., 1995; Pierpaoli et al., 1997; s. auch Übersichtsartikel von Bukau und Horwich, 1998).

Obwohl der durch DnaJ und GrpE modulierte Substrat-Binde-Zyklus von DnaK gut aufgeklärt ist, sind die zellulären Funktionen des bakteriellen DnaK-Systems noch nicht im molekularen Detail bekannt. Unumstritten ist jedoch, daß das bakterielle DnaK-System neben der λ-DNA-Replikation bei vielen zentralen Prozessen in prokaryontischen Zellen beteiligt ist. Mutationen in DnaK führen z. B. zu einem verringerten proteolytischen Abbau fehlgefalteter Proteine in *E. coli* (Straus et al., 1988). *E. coli* Mutanten mit inaktivem DnaK sind temperatursensitiv und akkumulieren schnell kompensierende Mutationen (Bukau und Walker, 1990; Hesterkamp und Bukau, 1998). Ebenso wie die Inaktivierung von DnaK bewirkt die Inaktivierung des Gens für DnaJ temperatursensitives Wachstum (Sell et al., 1990). Es wird vermutet, daß DnaK und DnaJ bei erhöhter Temperatur vor hitzeinduzierter Proteinaggregation schützen. Neuere Untersuchungen zeigten, daß DnaK in Zusammenwirkung mit der ribosomenassoziierten Prolyl Peptidyl cis/trans Isomerase, „Trigger Factor“ eine Rolle bei der Faltung neu synthetisierter Proteine spielt (Teter et al., 1999; Deuerling et al., 1999). Im Gegensatz zu den vergleichsweise geringen Auswirkungen der DnaK- und DnaJ-Inaktivierung, führt die Deletion des Gens für GrpE zum Absterben der Zellen. Dies ist vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache erstaunlich, daß die bislang einzig bekannte Funktion von GrpE darin besteht, die Nukleotidablösung von DnaK zu beschleunigen. Neben der gut aufgeklärten Funktion des DnaK-Systems bei der λ-Replikation deuten Untersuchungen zur Replikation von Plasmiden der Inkompatibilitäts-Gruppe P1 und zur Replikation der chromosomalen DNA daraufhin, daß das bakterielle DnaK-System auch an der Replikations-Initiation chromosomaler und extrachromosomaler Replikons beteiligt ist (Sakakibara, 1988; Wickner et al., 1991a,b; Skowyra und Wickner, 1993; Sozhamannan und Chattoraj, 1993).

Eukaryonten besitzen eine Reihe von DnaK-Homologen, Hsp70-Proteinen, die in allen Zellkompartimenten gefunden wurden: im Cytosol, im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Kern, in Lysosomen, Chloroplasten und Mitochondrien. Einige dieser Hsp70-Proteine sind hitzeinduzierbar, andere werden konstitutiv exprimiert. In höheren Eukaryonten häuft sich beispielweise Hsp72, ein durch Hitzeschock induzierbares Hsp70-Homolog, bei Hitzestreß im

Kern an (Brown et al., 1993). Es wird diskutiert, daß Hsp72 durch Bindung an nukleoläre Strukturen eine Schutzfunktion ausübt. Kürzlich wurde durch Untersuchungen an Zellkulturen höherer Eukaryonten gezeigt, daß das Expressionsniveau von Hsp70 streng mit der Thermotoleranz der Zellen korrelierte (Nollen et al., 1999). Neben den protektiven Eigenschaften bei Hitzestreß und anderen Streßformen wie Wachstum in Gegenwart von Schwermetallen oder Aminosäureanaloga, nehmen Hsp70-Proteine in Eukaryonten auch unter physiologischen Bedingungen zentrale Aufgaben im Zellhaushalt wahr, die in der Literatur als "housekeeping functions" bezeichnet werden. So wurde gezeigt, daß in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* cytosolische Hsp70-Proteine der *SSA*-Unterfamilie eine wichtige Rolle bei der Translokation von Vorläuferproteinen über intrazelluläre Membranen spielen (Chirico et al., 1988; Deshaies et al., 1989; siehe als Übersichtsartikel: Rassow und Pfanner, 1995). Wahrscheinlich stabilisiert Hsp70 bei diesem Prozeß Vorläuferproteine in einer translokationskompetenten, also weitgehend entfalteten Konformation. Cytosolische Hsp70-Proteine der *SSB*-Unterfamilie kontrollieren in gewissem Umfang die Translation, indem sie vermutlich eine Ablösung naszierender Ketten vom Ribosom erleichtern (Nelson et al., 1992; Pfund et al., 1998). Darüber hinaus sind konstitutiv exprimierte Hsp70-Proteine an Assemblierungs- und Disassemblierungsreaktionen beteiligt, wie z. B. der Auflösung von Clathrinhüllen (Pelham, 1986; Hannan et al., 1998). Mitglieder der Hsp70-Familie, die im ER (Kar2p oder BiP) oder in Mitochondrien (Ssc1p) lokalisiert sind, üben eine zentrale Funktion bei der Proteintranslokation ins ER-Lumen bzw. in die mitochondriale Matrix aus (als Übersichtsartikel siehe: Brodsky, 1996; Schatz und Dobberstein, 1996; Pilon und Schekman, 1999).

Neben den vielen Hsp70-Homologen besitzt *S. cerevisiae* auch eine Reihe von DnaJ-Homologen (siehe Übersichtsartikel von Cyr et al., 1994; Cyr, 1997). Wie Hsp70-Proteine sind DnaJ-Proteine im Cytosol und in vielen Zellkompartimenten lokalisiert. Es wird vermutet, daß jedes Hsp70-Homolog mit einem entsprechenden DnaJ-Homolog in Wechselwirkung tritt (als Übersichtsartikel siehe: Silver und Way, 1993). Beispielsweise wurde ein funktionelles Zusammenspiel des cytosolischen Hsp70-Proteins, Ssa1p mit dem DnaJ-Protein, Ydj1p, und des im ER lokalisierten Kar2p mit dem membranintegralen DnaJ-Homolog, Sec63p, nachgewiesen (Caplan et al., 1992a; Ziegelhoffer et al., 1995; Brodsky und Schekman, 1993; Matlack et al., 1999; als Übersichtsartikel siehe: Pilon und Schekman, 1999). Diese

eukaryontischen Hsp70-DnaJ-Systeme funktionieren ohne die entsprechenden GrpE-Proteine. Experimente mit den gereinigten Hefeproteinen, Ssa1p, Ydj1p und Substratprotein belegen, daß eine effiziente Freisetzung des Substratproteins in Abwesenheit eines GrpE-Proteins erfolgen kann (Ziegelhoffer et al., 1995). Die Analyse von Hsc70 aus höheren Eukaryonten ergab, daß dieses Protein eine hohe intrinsische Nukleotidaustausch-Aktivität besitzt, die ein GrpE-Protein erübrigt (Minami et al., 1996). Offensichtlich bestehen mechanistische Unterschiede zwischen dem ATP-getriebenen Substrat-Bindungs-Zyklus eukaryontischer Hsp70-DnaJ-Paare und dem prokaryontischen Dreikomponentensystem, Hsp70, DnaJ und GrpE (Minami et al., 1996; Gisler et al., 1998). In Säugerzellen wurde neben anderen mit Hsp70 bzw. Hsc70 und Hsp40 in Wechselwirkung tretenden Proteinen auch BAG-1 entdeckt, eine Komponente, welche als funktionelles Homolog von GrpE diskutiert wird (Höhfeld und Jentsch, 1997; Bimston et al., 1998).

Neben anderen Hitzeschockproteinen wurden auch Hsp70-Proteine in Mitochondrien entdeckt. Die Existenz von Hitzeschockproteinen in den Organellen bestätigt die ubiquitäre Funktion der Streßproteine auf zellulärer Ebene. Mitochondrien kommen mit Ausnahme weniger intrazellulärer Parasiten in allen Organismen vor. Zentrale biochemische Prozesse, wie beispielsweise die oxidative Phosphorylierung oder der Citratzyklus, sind in den Organellen lokalisiert. Entsprechend komplex ist die Biogenese der Mitochondrien; unter dem Begriff „Biogenese“ sind alle Prozesse, die für den Erhalt funktioneller Mitochondrien notwendig sind, zusammengefaßt. So gehört der Import von kernkodierten und im Cytosol synthetisierten Proteinen in die Mitochondrien genauso wie die Strukturbildung der importierten Proteine zur Organell-Biogenese. Auch die Replikation des mitochondrialen Genoms so wie die Synthese mitochondrial kodierter Proteine und deren Integration in die mitochondriale Innenmembran sind Prozesse, die der Organell-Biogenese zugeordnet werden.

Welche Rolle spielen Hsp70-Proteine bei den verschiedenen Prozessen der Organellbiogenese? In Mitochondrien wurden bislang zwei Hsp70-Proteine, Ssc1p und Ssh1p, entdeckt (Kang et al., 1990; Schilke et al., 1996). Zu Beginn der Untersuchungen war allerdings nur Ssc1p als mitochondriales Hsp70-Protein bekannt. Ssc1p spielt eine essentielle Rolle bei der Membranpassage kernkodierter, im Cytosol synthetisierter Vorläuferproteine in die mitochondriale Matrix (Kang et al., 1990; Scherer et al., 1990; Manning-Krieg et al., 1991).

Eine Beteiligung von Ssc1p bei weiteren Prozessen der Organellbiogenese war zum damaligen Zeitpunkt nicht nachgewiesen und von großem Interesse. Inhalt meiner Arbeit war es, zu einem besseren Verständnis der Rolle des mitochondrialen Hsp70-Systems bei den verschiedenen Prozessen der Organellbiogenese beizutragen.

Ebenso war zu Beginn der Arbeit unklar, ob Hefemitochondrien ein komplettes Hsp70-System mit allen drei Komponenten des bakteriellen Systems besitzen. Im Vorfeld der Untersuchungen war deshalb zunächst zu klären, ob in Mitochondrien DnaJ- und GrpE-Homologe vorhanden sind, damit eine funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen Hsp70-Systems durch die Beschreibung aller beteiligter Komponenten des Chaperon-Systems durchgeführt werden konnte. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Bart Barrell, Cambridge, England, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein mitochondriales DnaJ-Homolog, Mdj1p (mitochondriales DnaJ) identifiziert und dessen Rolle bei der mitochondrialen Biogenese analysiert (Rowley et al., 1994).

Im Laufe der Arbeit wurde ein mitochondriales GrpE-Homolog, Mge1p (mitochondrial GrpE) von mehreren anderen Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich entdeckt (Bolliger et al., 1994; Ikeda et al., 1994; Laloraya et al., 1994; Nakai et al., 1994). Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Mitochondrien wie Bakterien ein Dreikomponenten-Hsp70-System besitzen, interessierte vor allem die Frage, welche Rolle das mitochondriale Hsp70-System bei den verschiedenen Prozessen der Organellbiogenese wie z. B. Proteinimport und Faltung in der mitochondrialen Matrix oder bei der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine spielt. Weiter war wichtig aufzuklären, ob die verschiedenen Ssc1p-abhängigen Prozesse der mitochondrialen Biogenese stets die Beteiligung aller drei Proteine des Hsp70-Systems oder vielleicht nur eine oder zwei Komponenten erfordern würden. Um diese Fragen zu beantworten, wurde die Rolle des mitochondrialen Hsp70-Systems bei einer Reihe von Prozessen der Organell-Biogenese untersucht. Durch die Verfügbarkeit konditional letaler Mutanten in den drei Proteinen des Hitzeschocksystems konnte eine funktionelle Charakterisierung der Proteine durch molekular- und zellbiologische Ansätze durchgeführt werden. Wir konnten mit den hier zusammengefaßten Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Rolle des mitochondrialen Hsp70-Systems bei der mitochondrialen Biogenese beitragen (als Übersichtsartikel zu dieser Thematik siehe auch Langer et al., 1997).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

UND DISKUSSION

Die Funktion des mitochondrialen Hsp70 bei der Sortierung von Cytochrom b_2

1. Mutationen im intramitochondrialen Sortierungspeptid führen zu einer Fehlsortierung von Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix

Die überwiegende Mehrheit der mitochondrialen Proteine ist kernkodiert. Diese Proteine werden im Cytosol synthetisiert und mittels mitochondrialen Sortierungspeptiden in die Organellen importiert. Eine Sortierung in die vier mitochondrialen Subkompartimente, die äußere Membran, den Intermembranraum, die innere Membran und die mitochondriale Matrix, vermitteln intramitochondriale Sortierungssequenzen. Eine besonders interessante Frage ist, wie kernkodierte Proteine in den Intermembranraum gelangen, ein Subkompartiment, welches phylogenetisch, gemäß der Endosymbiontentheorie, dem bakteriellen Periplasma entspricht.

Während einige Proteine wie Cytochrom c, Cytochrom Hämlyasen oder Cytochrom c_1 ohne Beteiligung von Komponenten der Matrix in den Intermembranraum gelangen, erfolgt die Sortierung von beispielsweise Cytochrom b_2 in den Intermembranraum nur unter ATP verbrauchenden Reaktionen in der Matrix. Cytochrom b_2 oder (L+)-Laktatdehydrogenase, ist eine lösliche Komponente der mitochondrialen Atmungskette. Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae* benötigen Cytochrom b_2 für die Verwertung von Laktat als Kohlenstoffquelle. Cytochrom b_2 wird in *S. cerevisiae* von einem im Kern lokalisierten Gen kodiert und als Vorstufenprotein mit einer zweigeteilten Signalsequenz im Cytosol synthetisiert (Abb. 2) (Gasser et al., 1982; Guiard, 1985). Nach Import in die Mitochondrien und Abspaltung des ersten Teils der Signalsequenz in der mitochondrialen Matrix wird Cytochrom b_2 in das Zielkompartiment, den Intermembranraum sortiert. Der molekulare Mechanismus der Sortierung in den Intermembranraum ist trotz intensiver Untersuchungen (Hartl et al., 1987; Glick et al., 1992a; Koll et al., 1992; Glick et al., 1993; Stuart et al., 1994; Gruhler et al., 1995) im Detail unaufgeklärt. Ziel unserer Untersuchungen war es deshalb, durch eine Kombination

von molekular- und zellbiologischen Ansätzen zum Verständnis des intramitochondrialen Sortierungsweges von Cytochrom b_2 beizutragen.

Die ersten 30 Aminosäuren der Signalsequenz stellen ein Matriximportsignal dar und werden von einem in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Enzymkomplex MPP (für matrix processing peptidase) abgespalten (Abb. 2) (als Übersichtsartikel siehe: Arretz et al., 1991). Die Prozessierung des zweiten Teils der Sortierungssequenz erfolgt während oder nach der Translokation in den Intermembranraum durch eine in der inneren Membran lokalisierte Signalpeptidase (Imp1/Imp2) (Ohashi et al., 1982; Behrens et al., 1991; Schneider et al., 1991; Nunnari et al., 1993). Der zweite Teil der Sortierungssequenz, bestehend aus 50 Aminosäureresten, vermittelt die Sortierung in den Intermembranraum und weist hinsichtlich des Aufbaus Ähnlichkeit zu bakteriellen Signalpeptiden auf: An einen aminoterminalen Bereich mit positiv geladenen Aminosäuren schließt sich ein hydrophober Abschnitt an, der wiederum carboxyterminal von einem Segment mit polaren Resten flankiert wird. Für Cytochrom c_1, einem Protein mit einem ähnlich aufgebauten intramitochondrialen Sortierungspeptid konnte gezeigt werden, daß Mutationen in dem hydrophoben Abschnitt des Sortierungspeptides zu einer Fehlsortierung in die mitochondriale Matrix führen (Jensen et al., 1992). Durch Untersuchungen an Cytochrom b_2-Mutanten mit Austauschen in verschiedenen Bereichen des intramitochondrialen Sortierungspeptids gelang es uns zu zeigen, daß alle drei Teilsegmente, also der positiv geladene, der hydrophobe und der polare Abschnitt des intramitochondrialen Sortierungspeptides für die Translokation von Cytochrom b_2 in den Intermembranraum wichtig sind (Koll et al., 1992; Beasley et al., 1993; Schwarz et al., 1993).

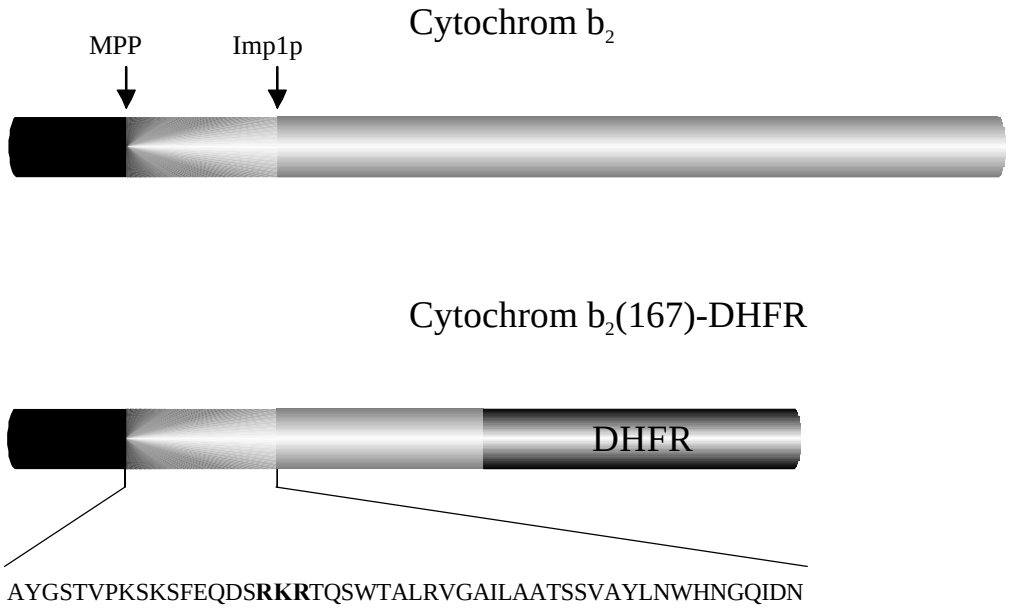

Abb. 2: Struktur der Vorläuferproteine von Cytochrom b_2 und Cytochrom b_2 (167)-DHFR, Sequenz des Sortierungssignals für den Intermembranraum

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden Austausche im Sortierungspeptid im Kontext des gesamten Cytochrom b_2-Vorläuferproteins wie auch in einem Fusionsprotein untersucht, welches aus den ersten 167 Resten des Cytochrom b_2-Vorläufers und DHFR (Dihydrofolatreduktase aus Maus) als carboxyterminaler Fusion besteht (Abb. 2). Zunächst wurden durch gerichtete Mutagenese die positiv geladenen Aminosäuren RKR in Position 47 bis 49 (in Abb. 2 fett gedruckt) ausgetauscht. Die Auswirkung dieser Austausche auf die submitochondriale Sortierung wurde nach *in vitro* Translation der Polypeptide in Gegenwart von ^{35}S-Methionin im Retikulozyten-Lysat und anschließendem Import in isolierte Mitochondrien untersucht (Schwarz et al., 1993).

Der Austausch von Lysin in Position 48 oder von Arginin in Position 49 zu Histidin (K48H, R49H) hatte keine Auswirkung auf die Sortierung der mutierten Vorläuferproteine. Bei *in vitro* Importversuchen wurden diese Vorläuferproteine zur reifen Form prozessiert, ein Kriterium, welches für die Translokation in den Intermembranraum herangezogen werden kann. Auch die Austausche R49D oder R49C, welche die Nettoladung des "RKR"-Motifs von +3 zu +1 bzw. +2 herabsetzen, führten zu keiner Fehlsortierung in die Matrix. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da eine Verminderung der positiven Nettoladung am Aminoterminus bakterieller Signalpeptide einen Translokationsdefekt bewirkt. Allerdings hatte der vollständige Ersatz der basischen Reste RKR durch hydrophobe Aminosäuren (R47I, K48I, R49L) die fast vollständige Fehlsortierung in die Matrix zur Folge. Auch Vorläuferproteine, bei denen zwei oder drei Ladungen in den Positionen 47 bis 49 durch hydrophobe Reste ersetzt waren, wurden ausschließlich zum Intermediat prozessiert und befanden sich in der Matrix. Im Kontext des DHFR-Fusionsproteins führten die Austausche zum proteolytischen Abbau der fehlsortierten Intermediate in der Matrix zu einem Fragment von 21 kDa (Schwarz et al., 1993). Wir vermuten, daß dieses Proteolysefragment den DHFR-Teil enthält.

Die Deletion der Reste RKR und der folgenden 16 Aminosäuren hatte ebenfalls eine Fehlsortierung in die Matrix zur Folge (Koll et al., 1992). Auch die Deletion von 13 Aminosäureresten (Aminosäure 34 bis 46 im Vorläuferprotein), welche aminoterminal des "RKR"-Bereichs liegen, führte zu einem Sortierungsdefekt (Ono et al., 1995). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die topogene Funktion im Bereich der drei basischen Aminosäuren RKR nicht allein auf der positiven Nettoladung aminoterminal des hydrophoben Abschnitts beruht. Vermutlich spielen bei der Sortierung des Vorläuferproteins neben den Ladungen auch andere Eigenschaften der Aminosäureseitenketten wie Größe oder Hydrophilie eine Rolle.

Welche Aussagen lassen sich durch unsere Ergebnisse über den Sortierungsmechanismus machen? Die Tatsache, daß alle von uns getesteten Positionen der Sortierungssequenz sich als relevant für die intramitochondriale Sortierung erwiesen hatten, spricht gegen eine Sortierung in den Intermembranraum nach einem „einfachen“ Stop-Transfer-Mechanismus (Blobel, 1980). Dieser Sortierungsmechanismus würde implizieren, daß das Vorläuferprotein über den hydrophoben Abschnitt des Sortierungspeptides in der Lipidschicht der inneren Membran transient verankert wird bis das Protein durch laterale Verschiebungen der inneren und äußeren Membranen in den Intermembranraum gezogen wird. Nach diesem Modell wird das intramitochondriale Sortierungspeptid erst nach vollständiger Translokation in den Intermembranraum proteolytisch abgespalten und reifes Protein freigesetzt (siehe auch Modelle in dem Übersichtsartikel von Glick et al., 1992b). Da allerdings, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, neben dem hydrophoben Abschnitt des Sortierungspeptides auch die flankierenden, amino- und carboxyterminalen Segmente für die korrekte Sortierung in den Intermembranraum benötigt werden, ist ein wesentlich komplexerer Sortierungsmechanismus als eine Arretierung durch hydrophobe Segmente in der Lipidschicht wahrscheinlich: Wir nehmen an, daß das Sortierungspeptid für die Erkennung durch eine bislang nicht identifizierte Sortierungskomponente eine spezifische Konformation ausbilden muß. Diese Wechselwirkung des Sortierungspeptids mit der von uns postulierten Sortierungskomponente ist offensichtlich essentiell für die Translokation in den Intermembranraum. Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Nikolaus Pfanner zeigten, daß Translokations-Intermediate von Cytochrom b_2 mit Tim23, einer Importkortkomponente der inneren Membran, assoziiert sind (Bömer et al., 1997). Die Autoren folgern, daß Tim23 in enger Nachbarschaft zu der Sortierungskomponente liegt.

Neben Punktmutationen und Deletionen im "RKR"-Bereich und dem davon aminoterminal liegenden Abschnitt führten auch Mutationen im hydrophoben Bereich der Signalsequenz zu Sortierungsdefekten. Die Austausche L62Q, A63P oder A64D hatten nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*[2] eine Fehlsortierung zur Folge. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Mutationen im "RKR"-Bereich *in vivo* als nicht stringent, da nur Zellen mit Austauschen im hydrophoben Bereich, nicht aber mit Austauschen im "RKR"-Bereich Laktat als Kohlenstoffquelle zu verwerten (im Folgenden als Lak^--Phänotyp bezeichnet, s. u.).

[2] Die Bezeichnungen *in vivo* und *in vitro* dienen hier zur Unterscheidung von Experimenten mit Hefezellen bzw. isolierten Mitochondrien.

2. Mam33p wurde durch Affinitätschromatographie mit dem Wildtyp-Sortierungspeptid von Cytochrom b_2 identifiziert

Um den Sortierungsweg von Cytochrom b_2 in den Intermembranraum zu verstehen, sollte eine Sortierungskomponente für Cytochrom b_2 durch Affinitätschromatographie mit dem Sortierungspeptid identifiziert und isoliert werden. Hierfür wurden Wildtyp-Sortierungspeptid und als Negativkontrolle Sortierungspeptide mit Mutationen, die zu einer Fehlsortierung der Cytochrom b_2-Vorläuferproteine führten, mit einem carboxyterminalen Histidinanker in *Escherichia coli* exprimiert. Die Sortierungspeptide wurden durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und anschließend mit mitochondrialem Proteinextrakt inkubiert. Ein Protein von 33 kDa reagierte bevorzugt mit dem Wildtyp-Sortierungspeptid und wesentlich schwächer mit den Mutanten-Peptiden. Dieses Protein wurde durch Gelelektrophorese angereichert, so daß die aminoterminale und interne Peptidsequenzen bestimmt werden konnten. Nach Ermittlung der Sequenz von drei Peptiden wurden degenerierte Primer hergestellt, welche für die Amplifikation von Genfragmenten in PCR-Ansätzen verwendet wurden. Die derart erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einer Koloniehybridisierung mit einer genomischen Bank von *S. cerevisisae* als Sonden eingesetzt. Auf diese Weise wurde das korrespondierende Gen aus der DNA-Bank isoliert.

Für die Herstellung von *in vitro* synthetisiertem Protein wurde der offene Leserahmen in den Transkriptionsvektor pGEM3 kloniert. Das nach Translation im Retikulocytenlysat erhaltene, radioaktiv markierte Polypeptid wurde in Abhängigkeit eines Membranpotentials der inneren Membran in isolierte Mitochondrien importiert. Da der Import aller in die mitochondriale Matrix translozierten und in die innere Membran integrierten Proteine ein Membranpotential voraussetzt, kann ein potentialabhängiger Import als ein (möglicher) Nachweis für die Lokalisierung eines Proteins in Mitochondrien dienen. Die Lokalisierung in Mitochondrien wurde außerdem immunologisch nachgewiesen, nachdem Antiseren aus Kaninchen gegen das gereinigte Protein zur Verfügung standen. Das von uns identifizierte Protein besitzt einen isoelektrischen Punkt bei pH 4.0 und liegt in der Matrix als Homotrimer oder Homotetramer vor. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde das Protein Mam33p bezeichnet (Mam33p für mitochondrial acidic matrix protein von 33 kDa) (Seytter et al., 1998). Eine Funktion des Proteins bei der Sortierung in den Intermembranraum konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Die Geninaktivierung führte nur unter bestimmten Kultivierungsbedingungen - Minimalmedium mit Laktat als Kohlenstoffquelle, 37°C Kultivierungstemperatur - zu einer geringfügigen Verlangsamung der Wachstumsrate. Eine Datenbanksuche ergab, daß Mam33p Homologie zum postulierten Rezeptor des Komplementfaktors C1q bzw. des Kininogen-Bindeproteins, p33, des Menschen besitzt (Krainer et al., 1991; Honoré et al., 1993; Ghebrehiwet et al., 1994; Herwald et al., 1996; Lim et

al., 1996). Wir gehen davon aus, daß Mam33p das Hefehomolog des vermuteten Rezeptors für C1q darstellt. Diese Annahme wird durch jüngere Arbeiten bestätigt, in denen gezeigt wurde, daß der mutmaßliche C1q-Rezeptor in Säugerzellen in Mitochondrien lokalisiert ist (Dedio und Müller-Esterl, 1996; Muta et al., 1997; Dedio et al., 1998). Da sowohl das Protein aus Säugerzellen wie auch Mam33p einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich aufweisen, ist anzunehmen, daß die Proteine häufig unspezifisch basische Proteinen binden. Damit könnte erklärt werden, daß Mam33p vorwiegend das positiv geladene Wildtyp-Sortierungspeptid und nicht Mutantenpeptide, die das "RKR"-Motiv nicht mehr besaßen, gebunden hat.

3. Ssc1p tritt mit fehlsortierten Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen in Wechselwirkung

In der Hefe *S. cerevisiae* ist mitochondriales Hsp70, Ssc1p, eine essentielle Komponente des Translokationsapparates der inneren Membran. Ssc1p interagiert in einer ATP-abhängigen Reaktion mit in die Matrix eintretenden Vorläuferproteinen (Scherer et al., 1990; Manning-Krieg et al., 1991; Cyr et al., 1993; Ungermann et al., 1994; Horst et al. 1997). Für die vollständige Translokation der Vorläuferproteine in die Matrix sind zumeist mehrere ATP-getriebene Assoziations- und Dissoziationszyklen von Ssc1p mit translozierenden Vorläuferketten erforderlich (Ungermann et al., 1996). Eine Absenkung der intramitochondrialen ATP-Konzentration und damit eine weitgehende Inhibierung von Ssc1p oder konditionale Mutationen in Ssc1p führt zu einer Hemmung des Proteinimports in die Matrix (Hwang et al., 1991; Rassow und Pfanner, 1991; Jascur et al., 1992; Gambill et al., 1993; Voos et al., 1993; Voisine et al., 1999). Auch die Translokation von Cytochrom b_2 in den Intermembranraum erfolgt ATP-abhängig, wird also durch Ssc1p vermittelt. Allerdings können chimäre Proteine mit einem aminoterminalen Cytochrom b_2-Segment von bis zu 180 Aminosäuren und DHFR als carboxyterminaler Fusion unabhängig von Ssc1p und nach Absenkung des Matrix-ATP-Spiegels in isolierte Mitochondrien importiert werden. Fusionsproteine, welche mehr als die 180 aminoterminalen Reste des Cytochrom b_2 besitzen, benötigen für den Import Ssc1p. Als Erklärung für die unterschiedliche Ssc1p-Abhängigkeit der Fusionsproteine wird die Ausbildung einer den Transport inhibierenden, gefalteten Hämbinde-Domäne angegeben, welche am Aminoterminus des reifen Proteins liegt (Glick et al., 1993; Stuart et al., 1994; Gärtner et al., 1995). Man nimmt an, daß die Importaktivität von Ssc1p für die Entfaltung dieser translokationsinkompetenten Struktur erforderlich ist. Dadurch werden Fusionsproteine, welche die Hämbinde-Domäne nicht oder nur teilweise besitzen, unabhängig von Ssc1p importiert.

Um den Sortierungsmechanismus von Cytochrom b_2 besser zu verstehen, wurde die Beteiligung von Ssc1p beim intramitochondrialen Transport der Cytochrom b_2-Vorläuferproteine mit Mutationen im Sortierungspeptid untersucht. Hierfür wurden die Vorläuferproteine mit Austauschen im basischen Aminosäurebereich "RKR" als DHFR-Fusionskonstrukte (pb_2(167)DHFR) in isolierte Mitochondrien mit entweder hoher oder niedriger mitochondrialer (Matrix-) ATP-Konzentration importiert. Wie bei anderen matrixbestimmten Vorläuferproteinen bewirkte eine Absenkung des Matrix-ATP-Spiegels einen unvollständigen Import der mutierten Polypeptide, also den Transport in den Intermembranraum. Bei physiologischer ATP-Konzentration wurden, wie erwartet, die mutierten Vorläuferproteine in die Matrix importiert. Dagegen wurde das Fusionsprotein mit der intakten Sortierungssequenz unabhängig von Ssc1p in den Intermembranraum importiert. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, daß Ssc1p für den Import der fehlsortierten Cytochrom b_2-Mutanten in die Matrix benötigt wird.

Um zu bestätigen, daß Ssc1p am Import der mutierten Cytochrom b_2-Polypeptide beteiligt ist, wurden Cytochrom b_2-DHFR-Fusionsproteine mit intakten und defekten Sortierungspeptiden in Gegenwart des Folat-Antagonisten Methotrexat (MTX) in Mitochondrien importiert. Auf diese Weise lassen sich Translokations-Intermediate herstellen, die beide Membranen überspannen: Durch die Komplexierung mit MTX wird der stabilisierte DHFR-Teil nicht importiert (Eilers und Schatz, 1986). Allerdings ist das aminoterminale, 167 Reste umfassende Cytochrom b_2-Segment lang genug, um auch Matrixkomponenten zu binden. Wurden derartige Translokations-Intermediate des Fusionsproteins mit dem Wildtyp-Sortierungspeptid hergestellt, so konnte der nicht importierte DHFR-Anteil proteolytisch abgespalten werden. Es stellte sich heraus, daß die proteolytische Abtrennung der DHFR-Domäne bei Fusionsproteinen mit Mutationen im Sortierungspeptid abhängig vom Matrix-ATP-Spiegel erfolgte (Schwarz et al., 1993). Diese ATP-Abhängigkeit der Proteolyse wurde auf die starke Bindung der Translokations-Intermediate an Ssc1p zurückgeführt: Wir nehmen an, daß ein hoher Matrix-ATP-Spiegel eine effiziente Wechselwirkung von Ssc1p mit in die Matrix eintretenden Vorläuferproteinen begünstigt. Durch diese Fixierung des Translokations-Intermediates in der Matrix ist wahrscheinlich eine enge Assoziation der DHFR-Domäne mit der mitochondrialen Oberfläche gegeben. Dadurch sollten keine proteasesensitiven Abschnitte auf der mitochondrialen Oberfläche exponiert und eine proteolytische Abspaltung des DHFR-Anteils verhindert sein. Bei niedrigem ATP-Spiegel dagegen, einhergehend mit einer weitgehenden Inaktivierung von Ssc1p, ist diese enge Assoziation der DHFR-Domäne mit der mitochondrialen Oberfläche nicht vorhanden und eine proteolytische Abtrennung der DHFR-Fusion kann erfolgen. In der Tat wurde in darauffolgenden Untersuchungen gezeigt, daß Translokations-Intermediate, die nicht durch Ssc1p in der Matrix fixiert werden, aus dem Translokationskanal wieder herausgleiten (Ungermann et al., 1994). Da die Matrix-ATP-

abhängige, proteolytische Abspaltung der DHFR-Domäne nur mit Mutantenproteinen mit einem eindeutigen Sortierungsphänotyp erfolgte, gehen wir davon aus, daß Ssc1p mit fehlsortierten Vorläuferproteinen sehr viel effizienter in Wechselwirkung tritt als mit dem Wildtyp-Protein. Diese effizientere Wechselwirkung könnte in einer Fehlfaltung des Sortierungspeptides begründet sein.

Die Bindung von Ssc1p an arretierte Translokations-Intermediate der Mutante "RIC" (Austausche im "RKR"-Motiv, K48I, R49C) wurde durch Co-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Ssc1p bestätigt. Da keine Co-Immunpräzipitation des entsprechenden Wildtyp-Proteins erhalten wurde, gehen wir davon aus, daß Ssc1p spezifisch mit fehlsortierten Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen interagiert und nicht mit dem Wildtyp-Protein. Zusammenfassend belegen unsere Experimente, daß Ssc1p am Import fehlsortierter Cytochrom b_2-Vorläuferproteine in die mitochondriale Matrix beteiligt ist. Die Unterdrückung der Fehlsortierung bei einem abgesenkten Matrix-ATP-Spiegel könnte durch den Import der mutierten Vorläuferproteine in den Intermembranraum als sogenannte "ATP-Depletions-Intermediate" erfolgen[3] (Hwang et al., 1991; Rassow und Pfanner, 1991; Jascur et al., 1992). Eine komplexere, von uns favorisierte Interpretation postuliert die Anwesenheit einer Sortierungskomponente, welche mit Ssc1p um die Bindung des mutierten Sortierungssignal konkurriert: Da die Mutation die Erkennung und/oder Bindung durch die Sortierungskomponente schwächt, kann Ssc1p mit den Mutanten-Vorläuferproteinen in Wechselwirkung treten. Erst nach Unterdrückung der Bindung an Ssc1p, beispielsweise durch Matrix-ATP-Absenkung, kann das mutierte Sortierungssignal von der Sortierungskomponente erkannt und/oder gebunden werden und eine Translokation des mutierten Polypeptids in den Intermembranraum erfolgen (Schwarz et al., 1993). Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Nikolaus Pfanner weisen daraufhin, daß eine Erkennung des Sortierungspeptids in enger Nachbarschaft zur Importkomponente Tim23 erfolgt (Bömer et al., 1997).

Nachtrag: Neue Arbeiten zeigten, daß die Hydrophobizität der Sortierungspeptide ausschlaggebend für eine Stabilisierung von membranspannenden Translokations-Intermediaten von Cytochrom b_2-Konstrukten in der inneren Membran sind (Gruhler et al.,

[3] ATP-Depletions-Intermediate entstehen, wenn Vorläuferproteine in Mitochondrien importiert werden, deren Matrix-ATP-Konzentration vorher reduziert wurde. Die Intermediate sind proteasegeschützt und demnach nicht auf der mitochondrialen Oberfläche exponiert. Es wird angenommen, daß es sich bei ATP-Depletions-Intermediaten um unvollständig in die Matrix importierte Spezies handelt, deren Aminoterminus in einer membranspannenden Konformation in der Matrix exponiert und deren carboxyterminaler Teil im Intermembranraum lokalisiert ist. Die Translokations-Intermediate können nach Wiederherstellung des physiologischen Matrix-ATP-Spiegels in die Matrix importiert werden.

1997). Die Stabilisierung durch hydrophobe Segmente im Bereich des Sortierungspeptids bewirkte eine Ssc1p-unabhängige Translokation über die äußere Membran.

4. Die Fehlsortierung einer Cytochrom b_2-Mutante wird durch ein temperatursensitives *SSC1*-Allel unterdrückt

S. cerevisiae benötigt Cytochrom b_2 für das Wachstum auf Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle. Cytochrom b_2-Null-Mutanten und Mutanten mit Austauschen in der intramitochondrialen Sortierungssequenz, die *in vivo* zu einem Sortierungsdefekt führen, besitzen demnach einen Lak^--Phänotyp, d.h. sie können mit Laktat als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr wachsen. Nachdem eine phänotypische Selektion von Cytochrom b_2-Sortierungsmutanten möglich war, wurde untersucht, ob durch einen genetischen Ansatz Komponenten der Cytochrom b_2-Sortierung identifiziert werden können. Gene dieser Komponenten sollten als spontane Suppressoren einer Fehlsortierung von mutierten Cytochrom b_2-Vorläuferproteinen isoliert werden.

Für diese Experimente wurde das chromosomale Gen für Cytochrom b_2 durch Insertion des Marker-Gens *TRP1* inaktiviert. Die resultierenden Null-Mutanten wurden mit Allelen von Cytochrom b_2 transformiert, welche Austausche im hydrophoben Abschnitt der Sortierungssequenz besaßen (L62Q, A63P, A64D). Zellen mit diesen Cytochrom b_2-Allelen besaßen wie die Null-Mutante einen Lak^--Phänotyp. Transformanten mit den Austauschen L62Q und A63P zeigten hohe Reversionsraten zum Lak^+-Phänotyp und konnten deshalb nicht für die Selektion spontaner Suppressoren verwendet werden. Dagegen besaßen Zellen mit dem Cytochrom b_2-Allel A64D, „A64D-Zellen“, einen stabilen Lak^--Phänotyp und waren deshalb für die Selektion spontaner Suppressoren geeignet. Eine Suppressormutante, Sup-D, wurde mit „A64D-Zellen“ nach Selektion auf den ursprünglichen Lak^+-Phänotyp isoliert. Das Suppressor-Allel verursachte temperatursensitives Wachstum. Nach Kreuzung des Suppressorstammes mit der Cytochrom b_2-Null-Mutante wurden diploide Lak^--Zellen erhalten. Das Suppressor-Allel verhält sich also rezessiv gegenüber dem Wildtyp-Gen.

Um das entsprechende Wildtyp-Gen zu erhalten, wurde der Suppressorstamm, Sup-D, mit einer Genbank des Wildtyps transformiert. Komplementierte Klone mit dem korrespondierenden Wildtyp-Allel sollten an ihrem temperaturresistenten Wachstum und dem ursprünglichen Lak^--Phänotyp erkannt werden. Von insgesamt 30,000 untersuchten Transformanten zeigten 145 Klone temperaturresistentes Wachstum. 17 dieser Klone besaßen einen Lak^--Phänotyp. Nach Kultivierung unter restriktiven Bedingungen (37°C) besaßen drei

der 17 Klone genauso wie die ursprüngliche Sortierungsmutante ausschließlich zum Intermediat prozessiertes Cytochrom b_2. Aus diesen Stämmen wurde Plasmid-DNA isoliert und in Sup-D retransformiert. Da Sup-D nach Transformation wieder temperatursensitives Wachstum und eine Fehlsortierung von Cytochrom b_2 zeigte, war bewiesen, daß die Unterdrückung des Suppressorphänotyps durch die entsprechenden Plasmide hervorgerufen wurde. Eine molekularbiologische Analyse der Plasmide zeigte, daß identische DNA-Insertionen von etwa 13 kb Länge vorhanden waren.

Die Sequenzanalyse und ein Datenbankabgleich ergab, daß es sich um ein 13.8 kb Fragment des Chromosoms X handelte, auf welchem neben anderen offenen Leserahmen die kodierende Sequenz für mitochondriales Hsp70, also das Gen *SSC1* lag. Damit war naheliegend, daß *SSC1* das Wildtypgen des Suppressor-Allels war. Um dies zu beweisen, wurde das Gen *SSC1* aus dem 13.8 kb Insert subkloniert und in den Suppressor-Stamm zurücktransformiert. Die resultierenden Transformanten zeigten den erwarteten Lak$^-$-Phänotyp. Damit war bewiesen, daß Ssc1p die phänotypische Reversion der Suppressor-Mutante verursachte. Das entsprechende, den Suppressor-Phänotyp verursachende, mutierte Allel wurde sequenziert, damit die Suppressor-Mutation kartiert werden konnte. Eine Punktmutation an Stelle 1345 des offenen Leserahmens führt in der Peptidbindedomäne von Ssc1p zum Austausch von Phenylalanin zu Leucin (F426L, dieses Allel wurde in Fortsetzung der Nomenklatur von E. Craig als *ssc1-4* bezeichnet). In allen bekannten Hsp70-Homologen ist dieses Phenylalanin konserviert. F426 liegt in enger Nachbarschaft zu Prolin 419, dessen Austausch zu Serin den temperatursensitiven Phänotyp der *ssc1-2* Mutante hervorruft (Gambill et al., 1993).

Interessanterweise unterdrückte das Allel *ssc1-4* nicht nur die Fehlsortierung der Mutante A64D, sondern auch den der Mutanten L62Q und A63P. Die Suppressor-Mutante wirkte also nicht allelspezifisch. Als nächstes interessierte uns die Frage, ob die Mutation F426L Import und Sortierung von Cytochrom b_2 und anderen Vorstufenproteinen in isolierten Mitochondrien beeinträchtigen würde. Nach Kultivierung des Suppressor-Stamms unter permissiven Bedingungen wurden Mitochondrien präpariert. Die Mitochondrien wurden vor den Importexperimenten bei permissiver (24°C) oder restriktiver (37°C) Temperatur vorinkubiert, um den Phänotyp des defekten Ssc1p-Proteins zu induzieren. Allerdings unterschieden sich diese Mitochondrien weder bei permissiver Temperatur noch nach Induktion des Phänotyps bezüglich des Imports und der Sortierung von Cytochrom b_2 von Wildtyp-Mitochondrien. Auch eine Reihe anderer in die Matrix sortierte Vorstufenproteine wurden mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Effizienz in die Mitochondrien der Suppressor-Mutante importiert. Offensichtlich bewirkt der Austausch F426L einen sich nur geringfügig vom Wildtyp unterscheidenden Phänotyp, der *in vitro* nicht beobachtet werden kann. Durch

weitere Untersuchungen muß geklärt werden, wie und warum sich das aus dem Suppressor-Stamm isolierte *ssc1-4*-Allel auf die Sortierung der Cytochrom b_2-Mutanten auswirkt und ob Ssc1p eine spezifische Funktion bei der Sortierung von Cytochrom b_2 erfüllt.

Auf den ersten Blick wirkt der Phänotyp der Suppressormutante paradox: Einerseits wird eine Fehlsortierung von Cytochrom b_2 in die Matrix unterdrückt, andererseits werden matrixbestimmte Vorläuferproteine effizient über die innere Membran transportiert. Dennoch ist der Phänotyp dieser *ssc1-4*-Mutante mit der Interpretation einer Kompetition zwischen Ssc1p und einer Cytochrom b_2-Sortierungskomponente in Einklang. Wie oben diskutiert, könnte die Unterdrückung der Fehlsortierung von Cytochrom b_2-Mutanten durch Absenken des Matrix-ATP-Spiegels die Bindung an die postulierte Sortierungskomponente begünstigen. In gleicher Weise könnte die Mutation F426L die Bindung von Ssc1p an die Cytochrom b_2-Mutanten derart schwächen, daß das Gleichgewicht in die Richtung einer Bindung an die - postulierte - Sortierungskomponente verschoben wird. So könnte erklärt werden, daß eine Translokation in den Intermembranraum stattfinden kann. Die Tatsache, daß das Allel *ssc1-4* nicht allelspezifisch wirkt, ist mit dieser Interpretation in guter Übereinstimmung.

Wir nehmen an, daß die Mutation F426L bei permissiver Temperatur die Wechselwirkung des mutierten Ssc1p mit in die Matrix eintretenden Vorläuferproteinen nicht wesentlich beeinträchtigt, da die Zellen unter diesen Bedingungen lebensfähig sind. Eine vollständige Inaktivierung von Ssc1p würde die Translokation von Vorläuferproteinen über die innere Membran gänzlich verhindern. Wahrscheinlich würden in diesem Fall *in vivo* die "ATP-Depletions-Intermediate" entstehen, die nach Matrix-ATP-Absenkung *in vitro* beobachtet werden (s. o.). Möglicherweise entstehen diese "ATP-Depletions-Intermediate" sogar bei Kultivierung der Zellen bei restriktiver Temperatur. Die Tatsache, daß restriktive Kultivierungsbedingungen lediglich zu einer Wachstumsinhibierung und nicht zum Absterben der Zellen führen, könnte ebenfalls mit der Bildung von unvollständig über die innere Membran translozierten "ATP-Depletions-Intermediaten" erklärt werden. Vermutlich werden diese *in vivo* entstandenen Translokations-Intermediate nach Wiederherstellung von aktivem Ssc1p durch permissive Temperatur in die Matrix importiert, genauso wie in isolierten Mitochondrien die "ATP-Depletions-Intermediate" nach ATP-Zugabe in die Matrix transloziert werden (Jascur et al., 1992).

Die Rolle des mitochondrialen DnaJ-Proteins, Mdj1p, bei der Organell-Biogenese

1. Der offene Leserahmen von *XDJ1* kodiert für ein DnaJ-Protein unbekannter Funktion

Wie in der Einleitung erwähnt, war zu Beginn der Arbeit unbekannt, ob Mitochondrien DnaJ-Proteine besitzen. Um Gene für weitere DnaJ-Proteine zu identifizieren und damit auch ein Gen für ein mitochondriales DnaJ Protein zu erhalten, wurden degenerierte Primer entworfen, die gegen die konservierte J-Domäne und die ebenfalls konservierte cysteinreiche Domäne gerichtet waren. Mittels DNA-Amplifikation durch die PCR-Technik wurde ein 400 bp DNA-Fragment aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* vervielfältigt. Das auf diese Weise erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert. Nach Sequenzierung und Ableitung der entsprechenden Aminosäuresequenz war klar, daß das Genfragment eines bislang unbekannten DnaJ-Proteins isoliert worden war. Das gereinigte DNA-Fragment wurde als Sonde in Kolonie-Hybridisierungen mit einer DNA-Bank eingesetzt. Es wurden zwei Klone identifiziert, deren DNA mit dem Fragment hybridisierte. Aus den Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert, die DNA-Inserts kartiert und subkloniert. Die Sequenzierung der Insert-DNA ergab, daß das hybridisierende Fragment in einem offenen Leserahmen von 1380 bp lokalisiert war (Schwarz et al., 1994). Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 459 Aminosäuren, welches alle charakteristischen Merkmale eines DnaJ-Proteins aufweist: Auf die etwa 70 Reste umfassende, aminoterminale J-Domäne folgt ein glycin- und phenylalaninreiches Segment. Carboxyterminal davon liegen die für die meisten DnaJ-Proteine typischen "Cystein-Motive" (als Übersichtsartikel siehe: Silver und Way, 1993; Cyr, 1997). Wie in anderen DnaJ-Proteinen weist die J-Domäne mit 59, 53 und 49% Aminosäure-Identität zu den entsprechenden J-Domänen von Ydj1p, Sis1p und Scj1p die höchste Konservierung auf (Sadler et al., 1989; Caplan und Douglas, 1991; Luke et al., 1991; Schwarz et al., 1994). Die vier carboxyterminalen Aminosäurereste mit der Sequenz CCIQ könnten ein Farnesylierungssignal darstellen. Auch für das cytosolische Ydj1p wurde eine carboxyterminale Farnesylierung nachgewiesen. Die Farnesylgruppe ist offensichtlich für die Funktion des Proteins bei erhöhter Temperatur von Bedeutung (Caplan et al., 1992a, b).

Von zentralem Interesse war für uns zu klären, ob das Genprodukt in Mitochondrien lokalisiert ist. Hierfür wurde der offene Leserahmen in den Vektor pGEM3 kloniert. Das Gen wurde transkribiert, und Translationsprodukt durch Translation im Retikulocytenextrakt in Gegenwart von ^{35}S-Methionin in radioaktiv markierter Form hergestellt. Während der

Importstudien stellte sich heraus, daß das Protein nicht in isolierte Mitochondrien importiert werden kann. Darüber hinaus wurde in der abgeleiteten Aminosäuresequenz kein Segment identifiziert, welches ein mitochondriales Importsignal darstellen könnte. Wir gehen deshalb davon aus, daß das von uns identifizierte Gen nicht für ein in Mitochondrien lokalisiertes Protein kodiert. Für eine weitere funktionelle Untersuchung des Genproduktes wurde das Gen durch Insertion des *URA3*-Markers in einem haploiden Hefestamm inaktiviert. Die resultierenden Nullmutanten zeigten unter den getesteten Bedingungen wie z. B. Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen keinen Wachstumsdefekt. Auch bezüglich der Thermotoleranz unterschied sich die Nullmutante nicht von Wildtypzellen. Eine Doppelnullmutante, in welcher neben dem von uns identifizierten Gen auch das Gen für das cytosolische Ydj1p inaktiviert war, besaß lediglich den Phänotyp der *YDJ1*-Nullmutante (Caplan und Douglas, 1991; Atencio und Yaffe, 1992). Mit diesem Experiment konnten wir ausschließen, daß Ydj1p und das von uns identifizierte potentielle Genprodukt bei bestimmten biologischen Prozessen überlappende Funktionen erfüllen. Obwohl unter den von uns getesteten, verschiedenen Wachstumsbedingungen weder eine Expression des Gens auf RNA-Ebene noch das Protein immunologisch nachgewiesen werden konnte, geht aus neueren Analysen des *S. cerevisiae* „Transcriptoms“ hervor, daß *XDJ1* in RNA transkribiert wird (Velculescu et al., 1999). Um zum Ausdruck zu bringen, daß es sich bei dem von uns identifizierten offenen Leserahmen um ein Gen für ein DnaJ-Protein kodiert, dessen Funktion bislang nicht geklärt ist, wurde das Gen mit *XDJ1* bezeichnet (Schwarz et al., 1994).

Da zeitgleich mit der Charakterisierung des *XDJ1*-Gens das Gen für Mdj1p, ein mitochondriales DnaJ-Protein entdeckt wurde, wurde auf eine weitere Suche nach Genen für DnaJ-Proteine mittels PCR-Ansätzen verzichtet.

2. Mdj1p ist ein mitochondriales DnaJ-Homolog

Das Gen für Mdj1p wurde von Neil Rowley im Labor von Bart Barrell während Sequenzierung des Chromosoms VI entdeckt. Das Gen kodiert für ein Protein von 511 Aminosäureresten. Insgesamt weist die Sequenz 33 % Identität zu DnaJ aus *E. coli* auf. Aus der abgeleiteten Primärsequenz war ersichtlich, daß das Protein eine aminoterminale Extension von 55 Aminosäureresten besitzt, welche als mitochondriale Importsignal fungieren könnte. Abgesehen von dieser aminoterminalen Extension zeigte die Primärsequenz, daß es sich um ein Gen für ein typisches DnaJ-Protein handelte: Gleich anschließend an die aminoterminale Extension liegt eine konservierte, etwa 70 Aminosäurereste umfassende J-Domäne. Darauf folgt ein glycin- und phenylalaninreiches

Segment. Die vier "Cystein-Motive" (CxxCxGxG, wobei x für polare oder geladene Aminosäuren steht) liegen im mittleren Bereich des Polypeptids. Wie bei anderen DnaJ-Proteinen ist das C-terminale Drittel am wenigsten stark konserviert (Rowley et al., 1994).

Das Gen für Mdj1p ist ein typisches Hitzeschockgen, da ein Überführen der Zellen von 24°C auf 37°C Wachstumstemperatur die Genexpression von *MDJ1* transient um einen Faktor von etwa drei erhöhte. Um die Funktion von Mdj1p zu untersuchen, wurde das kodierende Gen durch Insertion des *URA3*-Markers in einem diploiden Stamm inaktiviert. Nach Gendisruption wurden die Zellen sporuliert und der Effekt der Geninaktivierung durch eine Tetradenanalyse analysiert. Alle 39 analysierten Tetraden spalteten in einem 2:2 Muster mit zwei kleinen und zwei großen Kolonien auf. Der *URA3*-Marker co-segregierte mit den kleinen Kolonien, die temperatursensitives Wachstum zeigten. Diese "*petite*"-Zellen der Nullmutante waren nicht in der Lage, nicht fermentierbare Kohlenstoffquellen zu verwerten, besaßen also keine respiratorische Aktivität (Rowley et al., 1994). In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß Mitochondrien der *MDJ1*-Nullmutante umfangreiche Deletionen im mitochondrialen Genom besaßen (s. u.). Da ein intaktes mitochondriales Genom die Voraussetzung für respiratorisches Wachstum ist, ist der Verlust der respiratorischen Aktivität auf die Deletionen im Genom zurückzuführen.

Das Auftreten von *petite*-Zellen nach Gendisruption war neben dem Vorhandensein der aminoterminalen Extension ein weiterer Hinweis, daß Mdj1p in Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Um die mitochondriale Lokalisierung von Mdj1p zu überprüfen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung der Hefezellen durchgeführt. Die durch differentielle Zentrifugation erhaltenen, subzellulären Proteinfraktionen wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen Markerproteine der entsprechenden Zellkompartimente analysiert. Antikörper gegen Mdj1p reagierten ausschließlich mit der mitochondrialen Fraktion und weder mit dem löslichen, cytosolischen Proteinanteil noch mit der Fraktion, die sich aus dem nicht mitochondrialen Vesikelprotein zusammensetzte (Rowley et al., 1994). In einem zweiten Ansatz zum Nachweis von Mdj1p in Mitochondrien sollte getestet werden, ob *in vitro* translatiertes Protein in isolierte Mitochondrien importiert werden kann. Hierfür wurde der offene Leserahmen von *MDJ1* zunächst in den Vektor pGEM3 kloniert. Nach Transkription des Gens wurde das Protein durch Translation im Retikulocytenextrakt in Gegenwart von ^{35}S-Methionin in radioaktiv markierter Form hergestellt. In Importstudien stellte sich heraus, daß Mdj1p in Abhängigkeit eines mitochondrialen Membranpotentials in die Organellen importiert wurde. Nach Translokation über die mitochondrialen Membranen wurde die Vorläuferform mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa zu einer 6 kDa kleineren Form prozessiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens weist zwischen den Resten 54 bis 57 mit der Primärsequenz IRN / N ein typisches Prozessierungssignal für die matrixlokalisierte

Prozessierungs-Peptidase MPP auf (als Übersichtsartikel siehe: Arretz et al., 1991). Eine proteolytische Abspaltung der Präsequenz nach N55 ist mit der Entstehung der beobachteten 6 kDa kleineren, reifen Form nach Import in die Mitochondrien in guter Übereinstimmung.

Die submitochondriale Lokalisierung von Mdj1p wurde nach Überführung der Mitochondrien in Mitoplasten[4] analysiert. Mdj1p ist in Mitoplasten proteasegeschützt und wird erst nach Solubilisierung der inneren Membran von Proteasen gespalten. Durch diese Experimente war die Lokalisierung von Mdj1p in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob Mdj1p als lösliches oder membrangebundenes Protein in der Matrix vorliegt, wurden die Mitoplasten einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach Zentrifugation ist Mdj1p im Niederschlag zu finden, eine Beobachtung, die auf eine Membranassoziation von Mdj1p hindeutet. Allerdings kann Mdj1p durch eine alkalische Carbonat-Extraktion von den Membranen abgelöst werden. Mit diesen Experimenten konnten wir zeigen, daß Mdj1p in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und offensichtlich peripher mit der Innenmembran assoziiert ist. Wahrscheinlich ist die Membranassoziation von Mdj1p unspezifisch, da auch DnaJ aus *E. coli* mit der Membranfraktion co-sedimentiert und sowohl gereinigtes DnaJ wie Ydj1p stark mit hydrophoben Oberflächen interagieren (persönl. Mitteilung, Johannes Buchner und Douglas Cyr).

Nachtrag: Inzwischen wurden zwei weitere mitochondriale DnaJ-Homologe, Mdj2p und Jac1p entdeckt und charakterisiert (Westermann und Neupert, 1997; Strain et al., 1998). Durch genetische Versuche wurde gezeigt, daß Mdj2p teilweise mit Mdj1p überlappende Funktionen erfüllt (Westermann und Neupert, 1997). Ein Deletionsallel von *JAC1* wurde als Suppressorallel eines Hefestammes mit defekter Superoxid-Dismutase entdeckt. Die Autoren vermuten, daß Jac1p an der Reifung bzw. Assemblierung mitochondrialer Eisen-Schwefel-Proteine beteiligt ist (Strain et al., 1998).

3. Mdj1p ist keine essentielle Komponente des mitochondrialen Proteinimportapparates

Mitochondriales Hsp70, Ssc1p, spielt eine essentielle Rolle beim Proteinimport über die mitochondriale Innenmembran (siehe folgende aktuelle Übersichtartikel: Langer et al., 1997; Neupert, 1997; Rassow et al., 1999). Wir vermuteten deshalb, daß Ssc1p mit Mdj1p die

[4] Mitoplasten sind Mitochondrien, deren äußere Membran weitgehend entfernt wurde. Sie bestehen aus der mitochondrialen Matrix, die von der inneren Membran umschlossen ist, und Resten der äußeren Membran, die durch Protein-Proteinwechselwirkung mit der inneren Membran assoziiert sind.

Proteintranslokation in die mitochondriale Matrix vermittelt, ähnlich wie das Hsp70-Homolog im ER, Kar2p, zusammen mit dem teilweise in diesem Kompartiment lokalisierten Sec63p, einem DnaJ-Homolog, den Proteinimport ins ER katalysiert (Vogel et al., 1990; Sanders et al., 1992; Lyman und Schekman, 1995; Matlack et al., 1999; als aktuellen Übersichtsartikel siehe: Pilon und Schekman, 1999). Um dies zu untersuchen, wurde der Proteinimport in isolierte Mitochondrien der *MDJ1*-Deletionsmutante analysiert. Wie oben erwähnt, bewirkt die Gendisruption von *MDJ1* den weitgehenden Verlust des mitochondrialen Genoms (rho$^-$-Genotyp). Mitochondrien aus rho$^-$-Zellen besitzen ein Energiedefizit, da kein ATP über die Atmungskette entsteht. Dadurch ist generell der Proteinimport in isolierte rho$^-$-Mitochondrien beeinträchtigt und ohne entsprechende Kontrollen kann die Importeffizienz von rho$^-$-Mitochondrien nicht mit Mitochondrien, welche ein intaktes (Wildtyp-) Genom (rho$^+$-Mitochondrien) besitzen, verglichen werden. Aus diesem Grund wurden Mitochondrien der *MDJ1*-Nullmutante (rho$^-$, *DMDJ1*) stets nicht nur mit Mitochondrien des isogenen Wildtyp-Stammes (rho$^+$, *MDJ1*$^+$), sondern auch mit Kontroll-Mitochondrien des isogenen Stammes, der zwar *MDJ1* enthält, aber keine intakte mitochondriale DNA (rho$^-$, *MDJ1*$^+$) verglichen.

Die Beteiligung von Mdj1p beim mitochondrialen Proteinimport wurde mit einer Reihe radioaktiv markierter Vorläuferproteine untersucht. In keinem der Experimente unterschieden sich *Dmdj1*-Mitochondrien von den Kontroll-Mitochondrien und zwar waren weder Kinetik noch Effizienz des Imports durch die Abwesenheit von Mdj1p beeinträchtigt (Rowley et al., 1994). Allerdings konnten wir beobachten, daß das Prozessierungsmuster des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins (Fe-S-Protein) in *Dmdj1*-Mitochondrien von dem der Kontrollen abwich. Dieses Protein wurde zwar effizient in Mitochondrien des *Dmdj1*-Stammes importiert, jedoch war der zweite Prozessierungs-Schritt, vermittelt durch die mitochondriale Intermediat-Prozessierungs-Peptidase, im Vergleich zu den Kontrollen stark reduziert (Rowley et al., 1994). Das Fehlen der reifen Form des endogenen Proteins wurde auch nach Dekoration mitochondrialer Proteine der *Dmdj1*-Mutante mit Antiserum gegen Fe-S-Protein beobachtet. Wir nehmen an, daß Mdj1p für die Prozessierung zur reifen Form und/oder vielleicht auch für die Assemblierung des Fe-S-Proteins in den bc_1-Komplex der Atmungskette benötigt wird.

4. Mdj1p wird für die Faltung von in die mitochondriale Matrix importierten Proteinen benötigt

Nachdem wir zeigen konnten, daß Mdj1p keine maßgebliche Rolle bei der Proteintranslokation in die mitochondriale Matrix spielt, wurde untersucht, ob Mdj1p Chaperonaktivität besitzt und an der Faltung von Proteinen beteiligt ist, die in die mitochondriale Matrix importiert wurden. Für diese Untersuchungen wurden zwei Testproteine verwendet: das Fusionsprotein Su9(1-69)DHFR, das aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der F_O-ATPase von *Neurospora crassa* und der Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus besteht (Pfanner et al., 1987) und Luciferase aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis)*, ein Protein, welches ebenfalls als Fusion mit der Präsequenz der Untereinheit 9 der F_O-ATPase in Mitochondrien importiert werden kann (Rowley et al., 1994). Mit Hilfe des sehr sensitiven Luciferase-Enzym-Tests kann das native Enzym gut in Mitochondrien nachgewiesen werden. Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante besaßen nur etwa 30% der Luciferase-Aktivität, die mit den Kontroll-Mitochondrien erhalten wurde, ein Befund, der darauf hindeutete, daß Mdj1p eine Rolle bei der Faltung neu importierter Proteine spielt. Diese Interpretation wurde nach Import des Fusionsproteins Su9(1-69)DHFR und Untersuchung der Faltung des prozessierten Proteins bestätigt. Nach Solubilisierung der Mitochondrien kann die native Struktur der DHFR anhand der Löslichkeit und der intrinsischen Proteaseresistenz des Enzyms überprüft werden (Ostermann et al., 1989). Mitochondrien des *Dmdj1*-Stammes besaßen wesentlich mehr proteasesensitive DHFR-Aggregate als die Vergleichs-Mitochondrien. Mdj1p scheint also für die Faltung neu importierter Vorstufenproteine benötigt zu werden (Rowley et al., 1994).

Die Beobachtung, daß Mdj1p die Proteinfaltung von neu in die mitochondriale Matrix importierten Vorläuferproteinen stimuliert, war unerwartet. Zum damaligen Zeitpunkt wurde von einer klaren Aufgabenteilung der mitochondrialen Haupt-Chaperons, Hsp70 (Ssc1p) und Hsp60, ausgegangen. So war bekannt, daß Ssc1p eine essentielle Rolle beim Import von Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix spielt, ATP-abhängig in die Matrix eintretende Vorläuferproteine bindet und transloziert (Kang et al., 1990; Voos et al., 1993; Gambill et al., 1993; Ungermann et al., 1994). Des weiteren war gezeigt, daß für die Faltung bestimmter, in die Matrix importierter Proteine das mitochondriale Chaperonin Hsp60 und das Co-Chaperon Hsp10, ein GroES-Homolog, wichtig sind (Cheng et al., 1989; Ostermann et al., 1989; Reading et al., 1989; Höhfeld und Hartl, 1994). Die sequentielle Bindung von Vorläuferproteinen an Ssc1p und Hsp60 war durch Experimente der Arbeitsgruppe von Gottfried Schatz bekannt (Manning-Krieg et al., 1991). Dennoch gab es bereits durch die Analyse von Mitochondrien der temperatursensitiven *ssc1-2* Mutante einen ersten Hinweis, daß vielleicht doch keine strikte Aufgabentrennung zwischen beiden Chaperon-Proteinen

bestehen würde: DHFR-Fusionsproteine, die vor der Importreaktion mit Harnstoff entfaltet wurden, konnten zwar in Mitochondrien dieser Mutante importiert werden, anschließend allerdings nicht zur nativen Struktur falten (Kang et al., 1990). Diese Beobachtung war ein erster Anhaltspunkt, daß Ssc1p auch bei der Faltung von in die mitochondriale Matrix importierten Proteinen beteiligt sein könnte.

An welcher Stelle kommt bei dem Faltungsprozeß Mdj1p ins Spiel? Wir wußten einerseits, daß der Proteinimport, ein Ssc1p-abhängiger Prozeß, auch ohne Mdj1p erfolgen kann, andererseits ging aus unseren Ergebnissen hervor, daß Mdj1p für die Faltung neu importierter Proteine benötigt wird. Laufen diese Prozesse getrennt voneinander ab? Werden Vorstufenproteine zuerst vollständig importiert und falten dann erst zur nativen Struktur oder kann die Faltung einzelner Domänen eines translozierenden Proteins bereits vor vollständiger Translokation über die Innenmembran erfolgen? Es stellte sich auch die Frage, ob Mdj1p allein oder in Wechselwirkung mit Ssc1p die Faltung neu importierter Proteine beeinflußt. Es war deshalb naheliegend zu untersuchen, ob Mdj1p schon während des Imports an Vorstufenproteine bindet oder ob diese Proteine zuerst vollständig transloziert werden müssen, damit eine Wechselwirkung mit Mdj1p stattfinden kann. Um dies zu analysieren, wurde pSu9(1-79)DHFR in Gegenwart von MTX in Mitochondrien importiert. pSu9(1-79)DHFR besteht aus der 66 Aminosäurereste umfassenden mitochondrialen Importsequenz und den anschließenden 13 Resten der reifen ATPase-Untereinheit 9, fusioniert an DHFR. Nach Arretierung der Translokation durch Zugabe von MTX sind unter der Annahme, daß ein Segment von ca. 50 Aminosäureresten die Membranen überspannt (Rassow et al., 1990), etwa 30 Aminosäuren in der Matrix exponiert. Wie erwartet, wurde nach Co-Immunpräzipitation dieses "kurze" Translokations-Intermediat nicht in Assoziation mit Mdj1p gefunden. Dagegen wurde ein vollständig importiertes Vorläuferprotein, Su9(1-69)-$DHFR_{mut}$, welches durch Mutationen im DHFR-Teil nicht in der Lage ist, zur nativen Struktur zu falten, im Komplex mit Mdj1p nachgewiesen (Westermann et al., 1996). Wie bei Co-Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen Ssc1p wurde eine effiziente Co-Immunpräzipitation von Su9(1-69)-$DHFR_{mut}$ mit Mdj1p-Antikörpern nur bei einem niedrigen Matrix-ATP-Spiegel erreicht. Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, belegen viele *in vitro*-Versuche, daß Substratprotein durch Bindung von ATP an Hsp70 freigesetzt wird. Ternäre Komplexe bestehend aus Hsp70, DnaJ und Substratprotein sind nur in Abwesenheit von ATP stabil. Wir nehmen an, daß bei einer Absenkung des intramitochondrialen ATP-Spiegels ein ternärer Komplex von Ssc1p mit Mdj1p und Substratprotein vorliegt.

Um nun zu testen, ob Mdj1p mit Translokations-Intermediaten in Wechselwirkung tritt, die längere Segmente in der Matrix exponieren, wurden neben dem "kurzen" Vorläuferprotein, pSu9(1-79)DHFR auch die "langen" Vorläuferproteine, $pb_2(167)^{RIC}$-DHFR

und pFeS(1-125)-DHFR in Gegenwart von MTX in Mitochondrien importiert. Tatsächlich konnten die Translokations-Intermediate $pb_2(167)^{RIC}$-DHFR und pFeS(1-125)-DHFR durch Co-Immunpräzipitation im Komplex mit Mdj1p nachgewiesen werden (Westermann et al., 1996). Wir schließen aus diesen Experimenten, daß Mdj1p durch Bindung an translozierende Ketten, die bereits längere Segmente in der Matrix exponieren, deren Faltung kontrolliert. Da nach Absenkung des Matrix-ATP-Spiegels auch Ssc1p mit den Translokations-Intermediaten assoziiert ist, nehmen wir an, daß Mdj1p in Zusammenspiel mit Ssc1p die Faltung der getesteten Vorläuferproteine stimuliert. In einer jüngeren Arbeit wurde bestätigt, daß tatsächlich zwei unterschiedliche Ssc1p-Komplexe in der mitochondrialen Matrix vorhanden sind: ein sogenannter "Importkomplex", bestehend aus Ssc1p, der Importkomponente, Tim44p und Mge1p, und ein "Faltungskomplex" mit Ssc1p, Mdj1p und Mge1p (Horst et al., 1997). Weiterhin wurde von Rospert et al. (1996) gezeigt, daß nach Absenkung des Matrix-ATP-Spiegels importiertes, aber noch nicht gefaltetes DHFR-Protein transient an Ssc1p gebunden ist.

5. Mdj1p spielt eine protektive Rolle bei Hitzestreß

In *E. coli* bewirkt die Inaktivierung von DnaJ temperatursensitives Wachstum. Der molekulare Zusammenhang dieses Phänotyps und der Chaperonaktivität von DnaJ konnte von Bernd Bukau und Mitarbeitern aufgeklärt werden: Die Arbeitsgruppe zeigte, daß *E. coli* DnaJ die thermolabile Luciferase aus *Photinus pyralis in vitro* vor thermischer Denaturierung schützt (Schröder et al., 1993). Da auch die Gendisruption von *MDJ1* temperatursensitives Wachstum zur Folge hat, ist anzunehmen, daß die Funktion von Mdj1p gerade bei erhöhter Temperatur essentiell wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Rolle von Mdj1p bei Hitzestreß mit DHFR als Testprotein analysiert. Als Kriterium für den gefalteten Zustand der DHFR wurde die intrinsische Proteaseresistenz des Proteins herangezogen. Nach Import von Su9(1-69)-DHFR in isolierte Mitochondrien und Entfernung nicht importierter Proteine durch Proteolyse wurde die Proteaseresistenz der DHFR in Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante und in Vergleichs-Mitochondrien untersucht. Tatsächlich besaßen Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante nach Inkubation bei 37°C oder 40°C mehr proteasesensitive, also entfaltete DHFR-Moleküle als die Kontroll-Mitochondrien (Rowley et al., 1994). Dies bedeutet, daß Mdj1p bei Hitzestreß entweder die native Struktur dieses thermolabilen Proteins stabilisiert oder Mdj1p eine Rückfaltung hitzedenaturierter DHFR fördert. Dieses Ergebnis wurde durch Versuche mit Luciferase als zweitem, thermolabilen Testprotein bestätigt. Wird dieses Protein als Fusion mit der mitochondrialen Präsequenz der ATPase-Untereinheit 9 (s. o.) in Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante und der Kontrollen importiert, so ist nach Inkubation der Mitochondrien bei

40°C die Aggregationskinetik des Proteins in *Dmdj1*-Mitochondrien gegenüber den Vergleichs-Mitochondrien erhöht (Prip-Buus et al., 1996).

In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle von Ssc1p und Mge1p bei der Vermittlung des löslichen Zustandes der Luciferase bei erhöhter Temperatur untersucht: Su9(1-69)-Luciferase wurde in Mitochondrien mit temperatursensitiven Ssc1- und Mge1-Proteinen importiert und die Aggregation der Luciferase durch anschließende Inkubation bei 40°C induziert. Überraschenderweise war die Kinetik der Aggregatbildung in Mitochondrien dieser temperatursensitiven Mutanten unverändert gegenüber Wildtyp-Mitochondrien (Prip-Buus et al., 1996). Offensichtlich hat also allein Mdj1p eine zentrale Funktion bei Hitzestreß, indem die Aggregation thermolabiler Proteine zumindest verzögert wird. Dennoch vermittelt sowohl Mdj1p wie auch Mge1p bei Hitzestreß die transiente Assoziation der Luciferase mit Ssc1p. So war nur in Wildtyp-Mitochondrien ein transienter Komplex der Luciferase mit Ssc1p durch Co-Immunpräzipitation nachweisbar. In Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante oder Mitochondrien mit temperatursensitivem Mge1p war diese transiente Assoziation nicht zu beobachten. Die Stimulierung der Substratbindung an Ssc1p durch Mdj1p wurde in unabhängigen Experimenten zum mitochondrialen Proteinabbau von Wagner et al. (1994) bestätigt. Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß unter Hitzestreß sowohl Mdj1p wie auch Mge1p die Bindung entfalteter Proteine an Ssc1p stimulieren. Damit übernehmen alle drei Komponenten des mitochondrialen Hsp70-Systems eine protektive Rolle bei Hitzestreß. Dennoch scheint allein Mdj1p eine zentrale Rolle bei Hitzeeinwirkung zuzukommen, da nur in Abwesenheit von Mdj1p eine beschleunigte Aggregation der Luciferase zu beobachten war.

Inzwischen gelang Kubo et al. (1999) die Rekonstitution des gesamten mitochondrialen Hsp70-Chaperon-Systems. Die Arbeitsgruppe bestätigte unsere Befunde, daß Mdj1p entfaltete Luciferase vor Aggregation schützt. Die Autoren zeigten allerdings, daß *in vitro* Ssc1p für eine Aggregationsunterdrückung dieses Modellproteins ausreichend ist. Diese Diskrepanz zeigt die Problematik der Übertragung von Ergebnissen aus *in vitro*-Systemen auf Testsysteme, isolierte Mitochondrien, die eher physiologische Bedingungen reflektieren, und umgekehrt.

6. Mutationen in allen Domänen von Mdj1p führen zu Wachstumsdefekten

Wie erwähnt, führt die Gendisruption von *MDJ1* zum weitgehenden Verlust der mitochondrialen DNA. Eine Beteiligung von Mdj1p bei der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine kann aus diesem Grund nicht mit Mitochondrien der *Dmdj1*-Mutante untersucht

werden. Deshalb wurde durch gerichtete und ungerichtete Mutagenese eine Reihe von Punkt- und Deletionsmutanten des *MDJ1*-Allels erzeugt. Mit diesen Mutanten sollten neben der funktionellen Charakterisierung von Mdj1p auch Struktur-Funktions-Beziehungen untersucht werden.

Durch gerichtete Mutagenese wurden zwei Punktmutationen in der konservierten J-Domäne erzeugt: Entsprechend der gut charakterisierten Mutation *dnaJ259* in *E. coli* DnaJ wurde ein in allen DnaJ-Proteinen konserviertes Histidin in Position 89 (in Mdj1p) gegen Glutamin (H89Q) ausgetauscht. Diese Mutation im *E. coli* Protein bewirkt die vollständige Blockade der Bakteriophagen λ DNA-Replikation. Weiterhin kann dieses mutierte Protein nicht mehr die ATPase-Aktivität von DnaK stimulieren (Wall et al., 1994). Einen ähnlich stark ausgeprägten Phänotyp bewirkt die entsprechende Mutation in Mdj1p. Hefe-Zellen mit diesem Austausch in Mdj1p besaßen den Phänotyp der *Dmdj1*-Mutante; mitochondriale DNA war nicht mehr nachweisbar und die Zellen zeigten temperatursensitives Wachstum (Westermann et al., 1996).

Ein weiterer Austausch, A108T, in der J-Domäne, entspricht einer gut charakterisierten Mutation (A179T) eines teilweise im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten DnaJ-Proteins von *S. cerevisiae*, Sec63p. Diese Mutation in Sec63p verursacht temperatursensitives Wachstum (Rothblatt et al., 1989; Nelson et al., 1993). Allerdings bewirkt die entsprechende Mutation in Mdj1p nur eine geringfügige Wachstumsverzögerung. Die Mutanten zeigten nur auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen temperatursensitives Wachstum. Interessanterweise ist die Mutation A108T auch in der durch ungerichtete Mutagenese erhaltenen Dreifachmutante, *mdj1-4*, vorhanden. Diese Tripelmutante besitzt zwei weitere Punktmutationen, davon eine in der J-Domäne und eine weitere im glycin-phenylalaninreichen Segment. Die Arbeitsgruppen von Costa Georgopoulos und Maciej Zylicz konnten zeigen, daß das glycin-phenylalaninreiche Segment für die Aktivierung der Substratprotein-Bindeeigenschaften von DnaK wichtig ist (Wall et al., 1995).

Der Effekt der Punktmutationen in der J-Domäne ist vor allem vor dem Hintergrund der durch NMR ermittelten Struktur der J-Domäne und des anschließenden glycin- und phenlyalaninreichen Segments interessant (Szyperski et al., 1994; Hill et al., 1995; Pellecchia et al., 1996): Die J-Domäne besteht aus vier α-helikalen Abschnitten. Dabei sind die antiparallel zueinander liegenden Helices II und III durch ein kurzes, flexibles Segment verbunden. Dieses Verbindungs-Segment enthält das in allen DnaJ-Proteinen konservierte Aminosäure-Motiv "HPD". Dieser „loop“ vermittelt zusammen mit der Helix II die Wechselwirkung mit dem entsprechenden Hsp70 (Szyperski et al., 1994; Wall et al., 1994; Pellecchia et al., 1996; Greene et al., 1998). Offensichtlich führen Mutationen in diesem konservierten Segment zu einer

weitgehenden Inaktivierung der DnaJ-Proteine: Wie der Austausch des konservierten Histidinrestes an Stelle 34 gegen Glutamin (H34Q; die Mutation *dnaJ259*) im *E. coli* Protein bewirkte die entsprechende Mutation in Mdj1p (H89Q) den gleichen Phänotyp wie die vollständige Deletion des Gens. Diese Mutation beeinträchtigt vermutlich nicht die Faltung oder Stabilität des Proteins, da die konservierten Reste ja in der exponierten Schlaufe liegen (s. o.). Es wird angenommen, daß Austausche im „HPD"-Motiv die Wechselwirkung mit dem Hsp70-Partner-Protein eliminieren oder zumindest reduzieren (Pellecchia et al., 1996). Einen wesentlich weniger drastischen Effekt hatte dagegen der Austausch A108T in Mdj1p, der zu temperatursensitivem Wachstum führte. Der entsprechende Rest (A53) liegt im *E. coli* Protein nach den NMR-Daten in der Helix III und trägt vermutlich zur Stabilisierung des Helixbündels über hydrophobe Wechselwirkungen bei.

Neben den Punktmutationen in der J-Domäne wurden durch gerichtete Mutagenese Deletionen in alle Segmenten des Proteins eingeführt, die für DnaJ-Proteine charakteristisch sind: in das glycin- und phenylalaninreiche Segment, das Cystein-Motiv und in den wenig konservierten carboxyterminalen Teil. Mit Ausnahme der zwölf Aminosäuren umfassenden Deletion im glycin- und phenylalaninreichen Segment und einer vier Reste umfassenden Deletion im Carboxyterminus des Moleküls, die beide keinen Phänotyp hervorriefen, bewirkten alle anderen Deletionen einen temperatursensitiven Phänotyp (Westermann et al., 1996; unpublizierte Ergebnisse). Alle temperatursensitiven Mutanten waren bei Kultivierung unter permissiven Bedingungen respiratorisch aktiv.

Der durch die *MDJ1*-Allele verursachte Mutanten-Phänotyp konnte in isolierten Mitochondrien induziert werden: So waren Mitochondrien der konditionalen Mutanten, die nach Kultivierung der Zellen unter permissiven Bedingungen präpariert worden waren, vergleichbar mit den entsprechenden Wildtyp-Mitochondrien. Erst nach Inkubation der Mutanten bei restriktiver Temperatur besaßen die Mitochondrien hinsichtlich einer beschleunigten Aggregation des thermolabilen Testproteins, Luciferase, Ähnlichkeit mit Mitochondrien der Null-Mutante (Westermann et al., 1996). Dabei wies die Mutante *mdj1-7* mit der 41 Reste umfassenden Deletion im Carboxyterminus den stärksten Phänotyp auf. Unerwartet war, daß in *mdj1-3* und *mdj1-4* Mitochondrien mit Austauschen in der J-Domäne und dem glycin- und phenylalaninreichen Segment die Aggregation der Luciferase beschleunigt war, da Ulrich Hartl und Mitarbeiter zeigen konnten, daß *in vitro* der carboxyterminale Bereich des *E. coli* DnaJ-Proteins allein die Aggregation thermolabiler Substrate zu unterdrücken vermag (Szabo et al., 1996). Möglicherweise ist der entsprechende Bereich im mitochondrialen Protein für die Unterdrückung der Aggregation nicht ausreichend. Eine andere Interpretation wäre, daß Mutationen in der J-Domäne bei erhöhter Temperatur die Funktion der carboxyterminalen Domäne beeinträchtigen.

Alle Mutanten-Allele wurden vergleichbar gut wie das Wildtyp-Allel exprimiert. Wir folgern dies daraus, daß die Proteinkonzentrationen der mutierten Proteine etwa dem Wildtyp-Niveau entsprach. Durch Abtrennung intramitochondrialer Aggregate wurde gezeigt, daß alle mutierten Proteine auch unter restriktiven Bedingungen das Löslichkeitsverhalten des Wildtyp-Proteins besaßen. Wir gehen also davon aus, daß die mutierten Mdj1-Proteine weitgehend in der nativen Konformation vorliegen und die Austausche und Deletionen kaum eine Auswirkung auf die Proteinfaltung haben. Eine exakte Analyse der Faltung und Stabilität der Mdj1p-Mutanten kann allerdings erst nach Reinigung und anschließender *in vitro*-Charakterisierung der Proteine erfolgen.

7. Mdj1p ist an der Biogenese des vom mitochondrialen Genom kodierten Var1-Proteins beteiligt

Da die Gendisruption von *MDJ1* zum weitgehenden Verlust der mitochondrialen DNA führt, sollte durch die Charakterisierung der konditionalen Mdj1p-Mutanten analysiert werden, ob dieses DnaJ-Protein auch Funktionen erfüllt, die das Vorhandensein der mitochondrialen DNA voraussetzen. So wurde überprüft, ob Mdj1p eine Rolle bei der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine spielt. Für diese Untersuchungen wurde das Protein Var1 gewählt. Während alle anderen vom mitochondrialen Genom kodierten Proteine membranintegrale Atmungskettenkomponenten sind, ist Var1 das einzige lösliche mitochondrial kodierte Protein, dessen native Konformation leicht anhand seiner löslichen Eigenschaften getestet werden kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß nach einer *in organello*-Proteinsynthese bei restriktiver Temperatur Var1 in Mitochondrien mit mutiertem Mdj1p aggregiert vorlag (Westermann et al., 1996).

Als nächstes wurde untersucht, bei welchem Schritt der Var1-Biogenese Mdj1p beteiligt ist. Nachdem bekannt war, daß Ssc1p an naszierende Ketten bindet und dadurch die Aggregation bestimmter, von der mitochondrialen DNA kodierter Proteine unterdrückt (Herrmann et al., 1994), wurde getestet, ob auch Mdj1p während der Translation mit unvollständig synthetisierten Polypeptiden assoziiert ist. Für diese Untersuchungen wurde während einer *in organello*-Translation Crosslinker zugegeben und dann unvollständig translatierte, naszierende Polypeptidketten mit Puromycin von den Ribosomen abgelöst. Die durch Quervernetzung erhaltenen Produkte wurden mit Antikörpern gegen Mdj1p und Ssc1p präzipitiert und durch Gelelektrophorese und anschließende Fluorographie analysiert. Naszierende Ketten wurden sowohl mit Mdj1p als auch Ssc1p quervernetzt. Die Bindung von Mdj1p und Ssc1p an die entstehenden Polypeptide verhindert wahrscheinlich die Bildung

unproduktiver Konformationen, die zur Aggregation führen können. Unklar ist, ob Mdj1p direkt oder über Ssc1p an die naszierenden Ketten bindet. Damit verbunden ist auch die Frage, ob Mdj1p bei der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine als Co-Chaperon von Ssc1p oder als unabhängiges Chaperon beteiligt ist.

Durch unsere Ergebnisse wurden Untersuchungen von Herrmann et al. bestätigt, in denen gezeigt wurde, daß Ssc1p an der Biogenese von Var1 beteiligt ist (Herrmann et al., 1994). Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig um zu klären, ob alle - und wenn nicht, welche - mitochondrial kodierten Proteine für ihre Faltung und/oder Assemblierung Mdj1p benötigen. Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt sein, daß Herrmann et al. (1994) zeigen konnten, daß neben VarI auch die Assemblierung der ATPase Untereinheit 6 unter Beteiligung von Ssc1p erfolgt. Wir nehmen an, daß bei diesem Prozeß auch Mdj1p eine Rolle spielt.

8. Mitochondrien der *mdj1-5* Mutante besitzen bei restriktiver Temperatur eine verminderte DNA-Polymerase-Aktivität

Das bakterielle DnaK-System spielt eine zentrale Rolle bei der DNA-Replikation des Bakteriophagen λ. Bei diesem Prozeß werden DnaK und die Co-Chaperone, DnaJ und GrpE benötigt, um einen die Replikation inhibierenden Proteinkomplex zu dissoziieren (Zylicz et al., 1989; als Übersichtartikel siehe: Zylicz, 1993). Neben der λ–DNA-Replikation vermittelt das DnaK-System auch die Replikation von Plasmiden der P1-Gruppe (Wickner et al., 1991a,b; Skowyra und Wickner, 1993; Sozhamannan und Chattoraj, 1993). Weiterhin gibt es Hinweise, daß DnaK an der Replikation der chromosomalen DNA in *E. coli* beteiligt ist (Hwang et al., 1990; Hwang und Kaguni, 1991). Derzeit besteht eine Kontroverse, ob das DnaK-System für die Faltung benötigt wird oder für die Bereitstellung von Replikationskomponenten durch Dissoziation inaktiver Komplexe (Wickner et al., 1991a,b; Skowyra und Wickner, 1992; Skowyra und Wickner, 1993; Chattoraj et al., 1996).

Da die Gendisruption von *MDJ1* umfangreiche Deletionen im mitochondrialen Genom zur Folge hat, war für uns wichtig zu untersuchen, in welcher Weise das mitochondriale Hsp70-System bei der Replikation der mitochondrialen DNA beteiligt ist. Eine Analyse der Funktion des mitochondrialen Hsp70-Systems bei der DNA-Replikation wird durch die Tatsache erschwert, daß Ssc1p eine essentielle Importkomponente darstellt. Wir gingen deshalb davon aus, daß eine *in vivo*-Analyse des Nukleinsäuremetabolismus in Mitochondrien mit konditionalen Ssc1-Proteinen durch den Importdefekt keine zuverlässigen

Aussagen erlaubt. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns auf die Charakterisierung der Rolle von Mdj1p bei der mitochondrialen DNA-Replikation.

Für die Untersuchungen wurden Zellen und Mitochondrien der konditionalen *mdj1-5* Mutante mit einer Deletion in einem der cysteinreichen Motive verwendet. Die Zellen wurden entweder bei permissiver oder bei restriktiver Temperatur auf glucosehaltigem Medium (YPD) kultiviert. Nach verschiedenen Kultivierungszeiten wurden die Zellen auf ihre respiratorische Aktivität durch Ausplattieren auf YPG und die Anwesenheit der mitochondrialen DNA durch Anfärbung der Nukleinsäure mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) und anschließender Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Während die Zellen nach Kultivierung bei permissiver Temperatur respiratorisch aktiv waren und mitochondriale DNA besaßen, war mitochondriale DNA in der Mehrzahl der bei 37°C kultivierten Mutanten nicht detektierbar. Diese Zellen waren nicht mehr in der Lage, auf YPG zu wachsen. Im Fluoreszenzmikroskop war deutlich, daß zu frühen Zeitpunkten bei restriktiver Temperatur die sich von den Mutterzellen abschnürenden Knospen DNA enthaltende Mitochondrien besaßen. Durch diese Beobachtungen konnten wir ausschließen, daß ein Defekt bei der DNA-Segregation vorlag (Duchniewicz et al., 1999).

Um zu analysieren, bei welchem Schritt der mitochondrialen DNA-Replikation Mdj1p beteiligt sein könnte, wurden *mdj1-5*- und Wildtyp-Zellen bei permissiver oder restriktiver Temperatur kultiviert und Mitochondrien präpariert. *mdj1-5*-Mitochondrien, die nach Kultivierung der Zellen bei restriktiver Temperatur (37°C) erhalten worden waren, zeigten einen geringeren Einbau radioaktiver Desoxy-Nukleotide in die mitochondriale DNA als die Organellen, die aus Zellen, welche unter permissiven Kulturbedingungen (24°C) gezüchtet wurden, präpariert worden waren. Letztere unterschieden sich bezüglich des Einbaus von Desoxy-Nukleotiden nicht von Wildtyp-Mitochondrien. Als nächstes wurde untersucht, ob durch die Mutation in Mdj1p die Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase beeinträchtigt ist. Tatsächlich besaßen Mitochondrien des *mdj1-5*-Stammes, der bei restriktiver Temperatur kultiviert worden war, nur etwa 30% der DNA-Polymerase-Aktivität, die mit Mitochondrien des Wildtyp-Stamms aus identischen Kulturbedingungen erreicht wurde. Mitochondrien der *mdj1-5*-Mutante, die bei permissiver Temperaturen gezogen war, enthielten eine DNA-Polymerase-Aktivität, die Wildtyp-Zellen entsprach. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß funktionelles Mdj1p bei erhöhter Temperatur (37°C) für eine aktive DNA-Polymerase benötigt wird. In welcher Weise beeinflußt Mdj1p die Aktivität der DNA-Polymerase? Da Mdj1p nicht für den Import kernkodierter Proteine in die mitochondriale Matrix benötigt wird, kann ein durch die Abwesenheit von Mdj1p bedingter reduzierter Import der DNA-Polymerase ausgeschlossen werden. Mdj1p ist jedoch, wie oben dargestellt, an der Faltung von in die Matrix importierten Proteinen beteiligt. Somit könnte Mdj1p für die

Strukturbildung der DNA-Polymerase und damit biologische Aktivität des Enzyms bei erhöhter Temperatur wichtig sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die mitochondriale DNA-Polymerase bei erhöhter Temperatur in ihrer aktiven Konformation durch Mdj1p stabilisiert wird.

Obwohl intensiv untersucht, ist der Mechanismus der mitochondrialen DNA-Replikation bislang weitgehend unverstanden. Unklar ist beispielsweise derzeit, ob die Voraussetzung für eine stabile Propagierung eines intakten rho^+ Genoms die Transkription und Translation mitochondrialer Gene ist. So beobachtete die Arbeitsgruppe von Alexander Tzagoloff, daß die Deletion mitochondrialer Gene zu einer Instabilität der mitochondrialen DNA führt (Myers et al., 1985). Dagegen konnte in einer jüngeren Arbeit gezeigt werden, daß bestimmte Deletionsvarianten des mitochondrialen Genoms, sogenannte hypersuppressive Genome, auch nach Deletion der mitochondrialen RNA-Polymerase stabil propagiert werden (Lorimer et al., 1995). Dies bedeutet, daß die Replikation der hypersuppressiven Genome unabhängig von mitochondrialen Transkriptions- und Translationsaktivitäten erfolgt. Um die Rolle von Mdj1p bei der mitochondrialen DNA-Replikation losgelöst von Transkriptions- und Translationereignissen zu untersuchen, wurde das *mdj1-5*-Allel durch Cytoduktion in einen Stamm mit einem hypersupppressiven Genom gebracht. Wie erwartet, wurde das hypersuppressive Genom nur bei permissiver Temperatur repliziert. Dieses Experiment bestätigte unsere Ergebnisse zur Rolle von Mdj1p bei der Aufrechterhaltung der DNA-Polymerase-Aktivität bei permissiver Temperatur.

Wichtig war als nächstes zu untersuchen, ob Mdj1p auch bei niedriger Temperatur für die Aktivität einer funktionellen DNA-Polymerase benötigt wird. Dazu wurden *mdj1-5*-Zellen mit hypersuppressiver mitochondrialer DNA auf Verlust des Plasmids mit dem *mdj1-5* -Allel selektioniert und auf das Vorhandensein mitochondrialer DNA getestet. Interessanterweise besaßen alle der von uns untersuchten Zellen das hypersuppressive mitochondriale Genom. Mdj1p wird also offensichtlich nicht für den Erhalt der mitochondrialen DNA bei niedriger Temperatur benötig. Dies bedeutet, daß die mitochondriale DNA-Polymerase bei niedriger Temperatur unabhängig von Mdj1p arbeitet. Dieser Befund wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Aus *Dmdj1*- (rho^- oder rho^o) [5], Wildtyp- (*MDJ1*, rho^+) und chromosomalen Wildtyp-Zellen (*MDJ1*, rho^o) wurden Mitochondrien isoliert und die Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase in mitochondrialen Extrakten gemessen. In allen

[5] Rho^- kennzeichnet Deletionen oder Punktmutationen im mitochondrialen Genom. Rho^o, dagegen bedeutet die vollständige Abwesenheit mitochondrialer DNA. Neuere Untersuchungen von uns und Jaroslaw Marszalek weisen darauf hin, daß die Inaktivierung von Mdj1p nicht, wie ursprünglich angenommen, zum vollständigen Verlust der mitochondrialen DNA führt, sondern daß Reste des mitochondrialen Genoms erhalten bleiben. Weitere Analysen sind allerdings notwendig, um diese Beobachtung zu bestätigen und präzisieren.

Extrakten war die Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase vergleichbar (Duchniewicz et al., 1999).

Wie oben erwähnt, führt die Deletion des *MDJ1*-Gens zum weitgehenden Verlust der mitochondrialen DNA. Dies geschieht allerdings nur bei erhöhter Temperatur. Welches Schicksal haben *Dmdj1*-Zellen, die permanent bei niedriger Temperatur (25°C) gehalten werden? Um diese Frage zu beantworten, wurden Zellen mit disruptiertem, chromosomalen *MDJ1*-Allel und einem komplementierenden, plasmidkodierten *MDJ1*-Allel auf Verlust des Plasmids selektioniert, und die mitochondriale DNA der Zellen untersucht. Restriktionsanalysen der mitochondrialen DNA ergaben, daß alle Zellen ein vom Wildtyp abweichendes Restriktionsmuster der mitochondrialen DNA besaßen. Mdj1p wird also auch bei niedriger Temperatur für den Erhalt eines intakten, mitochondrialen Genoms benötigt. Die Rolle von Mdj1p bei diesem Prozeß ist bislang ungeklärt. Gewiß ist allerdings, daß es sich hier nicht um eine Beeinträchtigung der Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase handeln kann.

9. DnaJ aus *E. coli* und eine Reihe von nicht mitochondrialen DnaJ-Proteinen aus *S. cerevisiae* komplementieren Mdj1p

Um Aufschluß über die funktionelle Spezifität von Mdj1p zu erhalten, wurden verschiedene DnaJ-Proteine bezüglich einer Komplementation untersucht. Für diese Experimente wurden *E. coli* DnaJ und folgende Hefe-DnaJ-Proteine getestet: 1. Ydj1p, ein cytosolisches DnaJ-Protein, welches die Proteintranslokation über intrazelluläre Membranen und den Proteinabbau reguliert (Caplan et al., 1992a; Becker et al., 1996; Lee et al., 1996). 2. Sis1p, ein ebenfalls cytosolisches DnaJ-Homolog, welches eine essentielle Funkion bei der Translation spielt (Luke et al., 1991; Zhong und Arndt, 1993). 3. Scj1p, ein DnaJ-Protein, das im Lumen des ER lokalisiert wurde und zusammen mit Kar2p, einem im ER lokalisierten Hsp70-Homolog, die Proteintranslokation in das ER vermittelt (Blumberg und Silver, 1991; Schlenstedt et al., 1995). 4. Xdj1p, ein DnaJ-Protein von bislang unbekannter Funktion (Schwarz et al., 1994; s. o.). Für die Sortierung in die Mitochondrien wurden Fusionsproteine der DnaJ-Proteine mit der Präsequenz der ATPase-Untereinheit 9 hergestellt. Zur Kontrolle wurde Mdj1p mit der mitochondrialen Importsequenz der Untereinheit 9 der F_o-ATPase fusioniert. Die Konstrukte wurden in einen Hefe-*E. coli* Shuttle-Vektor ligiert, so daß die Gene unter der Kontrolle des *MDJ1*-Promotors lagen.

Die Plasmide wurden in einen Hefestamm transformiert, der das chromosomale *MDJ1*-Gen inaktiviert und ein plasmidkodiertes, komplementierendes *MDJ1*-Allel besaß. Nach Transformation wurde auf Verlust des plasmidkodierten *MDJ1*-Allels selektiert. Für *E. coli* DnaJ, Scj1p, Mdj1p und Ydj1p standen Antiseren zur Verfügung, so daß die Expression und mitochondriale Lokalisierung dieser Proteine im Western-Blot bestätigt werden konnte. Für die anderen DnaJ-Homologe standen keine Antiseren zur Verfügung. Wir gehen allerdings davon aus, daß diese Homologe vergleichbar gut wie die getesteten Homologe exprimiert und in die Mitochondrien importiert wurden. Für die Komplementations-Untersuchungen wurden die Zellen mit den DnaJ-Konstrukten unter für das Plasmid selektiven Bedingungen angezogen. Verdünnungen der Kulturen wurden dann auf Agarplatten mit glucosehaltigem (YPD) und glycerinhaltigem Medium (YPG) pipettiert. Nach 2-4 Tagen Inkubation der Platten bei 24°C oder 37°C wurde die Komplementation der Temperatursensitivität (Wachstum bei 37°C auf YPD) und die Komplementation der respiratorischen Aktivität (Wachstum auf glycerinhaltigem Medium) untersucht.

Zellen mit DnaJ aus *E. coli* in den Mitochondrien wuchsen unter allen getesteten Bedingungen, also auf YPD und auf YPG bei 24°C und 37°C. Die Hefe-DnaJ-Proteine Xdj1p und Ydj1p komplementierten Wachstum bei 24°C auf YPG-Medium. Diese DnaJ-Proteine vermittelten jedoch kaum Wachstum unter respiratorischen Bedingugnen bei 37°C, während das Wachstum auf YPD-Medium bei 37°C nicht beeinträchtigt war. Zellen mit mitochondrialem Scj1p und Sis1p zeigten auf YPG bei 24°C extrem schlechtes Wachstum. Hier waren Mikrokolonien erst nach über acht Tagen Bebrütung erkennbar. Offensichtlich ist die respiratorische Aktivität in diesen Zellen stark reduziert. Bei 37°C war kein Wachstum auf YPG feststellbar. Sis1p war das einzige DnaJ-Homolog, welches die Temperatursensitivität komplementierte, nicht aber die respiratorische Aktivität. Wir nehmen aus diesem Grund an, daß sich diese beiden DnaJ-abhängigen Prozesse entweder qualitativ oder quantitativ unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Sis1p das einzige von uns getestete DnaJ-Protein ist, welches nicht das cysteinreiche Motiv besitzt. Möglicherweise spielt diese Domäne eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der respiratorischen Aktivität (Lisse Schwarz, 2000).

Warum komplementieren DnaJ-Proteine Mdj1p so unterschiedlich? Eine mögliche Antwort auf diese Frage ist eine niedrige Konzentration an nativem Protein, bedingt durch einen ineffektiven Import in die mitochondriale Matrix oder durch eine schlechte Faltung bzw. veränderte Stabilität in den Organellen. Da wir jedoch wissen, daß sehr geringe Konzentrationen nach einer weitgehenden Depletion von Mdj1p noch für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen ausreichend sind (Benedikt Westermann, unveröffentl. Daten), nehmen wir an, daß diese Erklärung nicht zutrifft. Dennoch können wir

im Fall von Scj1p eine Beeinträchtigung der Struktur nicht ausschließen. Scj1p wurde nach Import in die Mitochondrien nicht zur reifen Form prozessiert. Die Anwesenheit des mitochondrialen Importsignals könnte die Faltung zur nativen Konformation beeinträchtigen oder gänzlich verhindern. Des weiteren kann auch eine Inaktivierung von Scj1p durch die Präsequenz nicht ausgeschlossen werden. Eine andere Erklärung für die schlechte Komplementation durch Scj1p könnte auch darin bestehen, daß Scj1p normalerweise im ER, einem oxidierenden Kompartiment, lokalisiert ist und in der nativen Struktur Disulfidbrücken besitzt, die in Mitochondrien nicht ausgebildet werden. Das unterschiedliche Komplementationsvermögen der DnaJ-Proteine könnte auch auf einer reduzierten Wechselwirkung der Proteine mit den endogenen Hsp70-Proteinen beruhen oder dadurch zustande kommen, daß ganz spezifische Ziel-Proteine von Mdj1p oder den komplementierenden DnaJ-Proteinen erkannt werden. Ob die letzte Hypothese zutrifft, wurde im Folgenden näher untersucht. Dazu wurden Komplementations-Experimente mit der J-Domäne durchgeführt.

Das aminoterminale Segment von *E. coli* DnaJ (Aminosäure 1-108, J-Domäne und anschließendes glycin- und phenylalaninreiches Segment) ist ausreichend *in vitro* und eingeschränkt auch *in vivo* für die Replikation des Bakteriophagen λ (Wall et al., 1994). Wir untersuchten deshalb, ob die entsprechenden Segmente von Mdj1p und von *E. coli* DnaJ den Erhalt der mitochondrialen Funktionen und Wachstum bei 37°C vermitteln können. Tatsächlich wurde mit dem Deletionskonstrukt von Mdj1p (Aminosäure 1-189 des Vorläuferproteins, Mdj189p) eine vollständige Komplementation beider Mdj1p-vermittelten Phänotypen beobachtet: Die Zellen zeigten temperaturresistentes Wachstum und waren sowohl bei 24°C als auch bei 37°C respiratorisch aktiv. Das aminoterminale Segment von *E. coli* DnaJ (DnaJ108p) komplementierte Wachstum bei 37°C. Zellen mit DnaJ108p in den Mitochondrien wuchsen allerdings langsamer als Wildtyp-Zellen auf YPG. Da die bislang einzig bekannte Funktion der J-Domäne die Stimulierung der ATPase-Aktivität des entsprechenden Hsp70-Partner-Proteins ist und keine Chaperon-Aktivität für diese Domäne beschrieben wurde (Szabo et al., 1996), nehmen wir dieses Ergebnis als Hinweis, daß beiden Mdj1p-vermittelten Phänotypen, also Wachstum bei 37°C und respiratorische Aktivität, eine Wechselwirkung mit Ssc1p zugrunde liegt.

Zellen mit mitochondrialem Scj1p und Sis1p wuchsen auf YPG extrem langsam. Um nun zu testen, ob diese beeinträchtigte, respiratorische Aktivität auf einer Instabilität oder Reduktion des mitochondrialen Genoms beruht, wurde die mitochondriale DNA der Zellen durch Southern Blots analysiert. Für diese Experimente wurde Gesamt-DNA isoliert und nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen auf Nylonmembranen übertragen. Mitochondriale DNA wurde mit einem DNA-Fragment als Sonde, welches den mitochondrialen

Replikationsursprung ori5 enthält, untersucht. Als Kontrolle wurde auch eine Sonde (*MGE1*-DNA) für die nukleäre DNA verwendet. Die Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit den Sonden zeigte, daß die mitochondriale DNA in Zellen mit Scj1p und Sis1p nicht vermindert war. Warum wachsen Zellen mit diesen rekombinanten DnaJ-Proteinen unter rein respiratorischen Bedingungen trotzdem so schlecht? Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden die Zellen mit Plasmiden, welche das Gen für Mdj1p enthielten, transformiert und auf respiratorische Aktivität untersucht. In beiden Fällen wurde die volle respiratorische Aktivität durch die Anwesenheit von plasmidkodiertem Mdj1p wiederhergestellt. Dieses Ergebnis bedeutet, daß sowohl Scj1p als auch Sis1p die Propagierung eines funktionellen, mitochondrialen Genoms vermitteln.

Voraussetzungen für respiratorische Aktivität ist zum einen das Vorhandensein eines intakten, mitochondrialen Genoms und zum anderen mitochondriale Transkriptions- und Translationsaktivität. Wir untersuchten deshalb als nächstes, ob Zellen mit mitochondrialem Sis1p und Scj1p mitochondriale Translationsprodukte synthetisieren können. Die Fähigkeit der Zellen, mitochondriale Translationsprodukte herzustellen, wurde mittels einer *in vivo*-Markierung der mitochondrialen Syntheseprodukte mit ^{35}S-Methionin analysiert. Die cytosolische Translation wurde durch Zugabe von Cycloheximid inhibiert. Die Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte ergab, daß Zellen mit mitochondrialem Scj1p oder Sis1p eine auffällige Reduktion aller mitochondrialen Translationsprodukte aufwiesen. Ein weiteres Ergebnis war, daß die Atmungskettenkomponenten CoxI und CoxII in Anwesenheit von heterologen DnaJ-Proteinen nur in sehr geringem Umfang hergestellt wurden. Es ergibt sich nun die Frage, bei welchem Schritt der Biogenese der mitochondrialen Genprodukte, der Transkription oder Translation, Mdj1p benötigt wird. Diese Frage soll durch Untersuchung der mitochondrialen Transkriptionsprodukte beantwortet werden.

Die Funktion des GrpE-Homologs, Mge1p, in Mitochondrien

1. Austausche konservierter Aminosäuren im Mge1-Protein führen zu einem konditional letalen Phänotyp

Wie in der Einleitung erwähnt, war zu Beginn der Arbeit unklar, ob in Mitochondrien ein Homolog zum bakteriellen GrpE vorhanden ist. Im Lauf unserer Untersuchungen wurde das Gen für mitochondriales GrpE, *MGE1*, 1994 von mehreren Gruppen fast gleichzeitig und unabhängig identifiziert (Bolliger et al., 1994; Ikeda et al., 1994; Laloraya et al., 1994; Nakai et al., 1994). Die Arbeitsgruppen von Elizabeth Craig und Toshiya Endo zeigten, daß Zellen, in denen die Expression des *MGE1*-Gens unterdrückt wurde, unprozessierte Vorstufen mitochondrialer Vorläuferproteine anhäuften (Laloraya et al., 1994; Nakai et al., 1994). Dies wurde als erster Hinweis gedeutet, daß Mge1p am mitochondrialen Proteinimport beteiligt ist. Diese Vermutung wurde durch biochemische Experimente bestätigt: Durch Co-Immunpräzipitation wurde Mge1p im Komplex mit Ssc1p und translozierenden Vorstufenproteinen erhalten (Voos et al., 1994). Mge1p bindet in Abwesenheit von ATP hochaffin an Ssc1p. Diese Tatsache wird für die Reinigung von Mge1p aus Mitochondrien genützt (Bolliger et al., 1994).

Ziel unserer Arbeiten war es, zu einem besseren Verständnis der Rolle von Mge1p bei der mitochondrialen Biogenese beizutragen. Dazu sollten Mitochondrien untersucht werden, die mutierte Mge1-Proteine enthielten. Aus der Literatur war bekannt, daß *MGE1*-Null-Mutanten nicht lebensfähig sind. Eine funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen GrpE-Proteins wurde deshalb mit konditionalen Mutanten des Proteins durchgeführt (Westermann et al., 1995). Für die Isolierung konditionaler *MGE1*-Allele wurde das Gen für Mge1p mit Hydroxylamin *in vitro* mutagenisiert. Das Hefe-*E. coli*-Shuttle-Plasmid wurde nach Mutagenese in einen Hefestamm transformiert, der das chromosomale *MGE1*-Allel disruptiert und ein komplementierendes, plasmidkodiertes *MGE1*-Allel besaß. Es wurde dann auf den Verlust des Plasmids mit dem komplementierenden Wildtyp-*MGE1*-Gen selektioniert. Die nach dieser Gegenselektion erhaltenen Zellen wurden auf temperatursensitives Wachstum getestet. Insgesamt wurden 3000 Transformanten getestet, von denen fünf Klone, *mge1-2* bis *mge1-6*, temperatursensitives Wachstum zeigten. Um nachzuweisen, daß das temperatursensitive Wachstum tatsächlich durch die mutierten *MGE1*-Allele verursacht wurde, wurden die Plasmide aus den temperatursensitiven Klonen isoliert und in den ursprünglichen Rezipientenstamm transfomiert. Alle Transformanten zeigten nach einer Gegenselektion des Plasmids mit dem Wildtyp-*MGE1*-Gen temperatursensitives Wachstum.

Durch diese Experimente konnten wir bestätigen, daß der konditional temperatursensitive Phänotyp tatsächlich durch die entsprechenden *MGE1*-Allele verursacht wurde.

Die fünf Mutanten-*MGE1*-Allele wurden sequenziert. In allen Allelen war jeweils eine Aminosäure verändert: A81D in Mge1-2p, A134V in Mge1-3p, E123K in Mge1-4p, T102I in Mge1-5p und E189K in Mge1-6p. Einige der Aminosäureaustausche in den Mutanten-Allelen liegen benachbart zu konservierten Resten oder in den konservierten Domänen, wie sie für bakterielle GrpE-Proteine definiert wurden (Wu et al., 1994; 1996). Alle Mutanten besaßen zusätzlich den Austausch T199A, bedingt durch die Amplifikation des Hefegens mittels PCR. Da jedoch das *MGE1*-Allel mit dem Austausch T199A die Nullmutante vollständig komplementierte, ist davon auszugehen, daß diese Mutation die Funktion des Proteins in keiner Weise beeinträchtigt.

Die Expression der mutierten Allele wurde immunologisch überprüft. Mit Ausnahme der Mutante *mge1-2*, in der die Menge des Mge1-Proteins auf etwa 20% der im Wildtyp beobachteten Menge reduziert war, besaßen alle anderen Mutanten eine unveränderte Mge1p-Konzentration. Wahrscheinlich ist die reduzierte Konzentration an Mge1-2p auf die verringerte Stabilität dieses Proteins zurückzuführen (s. u.).

2. Mitochondrien, welche Mge1-Proteine mit Mutationen enthalten, zeigen bei restriktiver Temperatur einen Import-Defekt, da die Bindung von Ssc1p an translozierende Polypeptidketten beeinträchtigt ist

Um zu überprüfen, ob die Mutationen in den Mge1-Proteinen den Import von Vorläuferproteinen beeinträchtigen, wurde untersucht, ob die Mutanten unter restriktiven Bedingungen Vorläuferproteine akkumulieren. Für diese Experimente wurden die Mutanten nach Vorkultivierung bei permissiver Temperatur kurze Zeit restriktiven Kulturbedingungen ausgesetzt und die Zellen dann geerntet. Die Proteinextrakte wurden nach SDS-PAGE und Übertragung auf Nitrozellulose mit Antikörpern gegen mitochondriales Hsp60 dekoriert. Während in den Zellextrakten der Wildtyp-Zellen, die bei 37°C inkubiert worden waren, nahezu ausschließlich die prozessierte Form des Hsp60-Proteins detektiert wurde, war in Proteinextrakten der Mutanten, die unter restriktiven Bedingungen kultiviert worden waren, auch die unprozessierte Vorläuferform zu beobachten. Daraus läßt sich schließen, daß der mitochondriale Proteinimport durch die Mutationen betroffen war.

Der Mutanten-Phänotyp konnnte auch in isolierten Organellen induziert werden: Wurden Mitochondrien mit den defekten Mge1-Proteinen bei restriktiver Temperatur (37°C) vorinkubiert und der *in vitro*-Proteinimport bei 37°C durchgeführt, so war in diesen Organellen sowohl die Kinetik als auch die Effizienz des Proteinimportes gegenüber Wildtyp-Mitochondrien stark reduziert (Westermann et al., 1995).

Als nächstes interessierte uns die Frage, in welcher Weise Mge1p den mitochondrialen Proteinimport stimuliert. Da GrpE-Proteine nicht selbst mit Substratproteinen in Wechselwirkung treten, war naheliegend zu untersuchen, ob Mge1p die Bindung von Ssc1p an translozierende Vorläuferproteine beeinflußt. Für diese Experimente wurden Mitochondrien mit den mutierten Mge1-Proteinen Mge1-2p und Mge1-3p mit Mitochondrien des Wildtyps verglichen. Das Fusionsprotein Su9(1-79)DHFR wurde in Gegenwart von Methotrexat importiert und die Assoziation dieser Translokations-Intermediate mit Ssc1p durch Co-Immunpräzipitation überprüft. Nur aus Wildtyp-Mitochondrien konnten bei restriktiver Temperatur und hohem Matrix-ATP-Spiegel signifikante Mengen an Translokations-Intermediaten mit Ssc1p-Antiserum gefällt werden. Dagegen wurden in Mitochondrien mit defektem Mge1p keine Translokations-Intermediate im Komplex mit Ssc1p erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, daß Mge1p die Wechselwirkung von Ssc1p mit in die Matrix eintretenden Vorläuferproteinen stimuliert. Wie in Kapitel 3.5 erwähnt, vermittelt Mge1p auch die Assoziation von Ssc1p mit einem entfaltetem Test-Protein, der Luciferase (Prip-Buus et al., 1996). Zusammengefaßt zeigen unsere Experimente, daß Mge1p die Aktivität von Ssc1p moduliert, indem die Substratbinde-Aktivität von Ssc1p erhöht wird.

Unsere Ergebnisse, welche mit den temperatursensitiven Mge1-Proteinen erhalten wurden, sind teilweise in Einklang mit Resultaten der Arbeitsgruppen von Betty Craig und Nikolaus Pfanner, die mit einer temperatursensitiven Mge1-Mutante, *mge1-100*, erhalten wurden (Laloraya et al., 1995). In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, daß Mge1p die Wechselwirkung von Ssc1p mit Substratproteinen beeinflußt. *mge1-100*-Mitochondrien zeigten nach Inkubation bei restriktiver Temperatur eine leicht verminderte Assoziation von Ssc1p mit in die Matrix eintretenden Translokations-Intermediaten. Eine Diskrepanz zu unseren Ergebnissen besteht allerdings darin, daß in *mge1-100*-Mitochondrien die Assoziation von vollständig importierten Vorläuferproteinen mit Ssc1p erhöht war. Wir vermuten, daß dieses unseren Ergebnissen widersprechende Resultat auf die unterschiedliche Vorbehandlung der Mitochondrien zur Induktion des temperatursensitiven Phänotyps zurückzuführen ist: Während Laloraya et al. den temperatursensitiven Phänotyp durch Vorinkubation der Mitochondrien bei 37°C induzierten und dann alle weiteren Versuche bei der permissiven Temperatur von 25°C durchführten, wurde in unseren Experimenten durchwegs die restriktive

Temperatur von 37°C beibehalten um eine eventuelle Reversibilität der Inaktivierung von Mge1p während der Experimente auszuschließen.

3. Mge1p moduliert die nukleotidabhängige Assoziation von Ssc1p mit der Importkomponente Tim44p

Der gerichtete Transport von Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix erfordert die Bindung der translozierenden Polypeptidketten an einen Importkomplex der inneren Membran (als Übersichtsartikel siehe: Neupert, 1997; Rassow et al., 1999). Zwei Komponenten dieses Komplexes sind Ssc1p und die membranassoziierte Importkomponente Tim44p, die direkt und reversibel miteinander assoziiert sind (Kang et al., 1990; Bolliger et al., 1994; Kronidou et al., 1994; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Die Wechselwirkung von Ssc1p und Tim44p wird via Ssc1p durch ATP-Bindung und Hydrolyse kontrolliert (Kronidou et al., 1994; Schneider et al., 1994). In Gegenwart von ATP dissoziiert der Komplex Ssc1p und Tim44p. Durch diese ATP-getriebene, reversible Assoziation von Ssc1p und Tim44p[6] werden die translozierenden Polypeptide in die Matrix transportiert (von Ahsen et al., 1995; Ungermann et al., 1996; Voos et al., 1996; Bömer et al., 1998; Gaume et al., 1998).

Wie oben dargestellt, besitzen Mitochondrien mit defektem Mge1p einen Importdefekt. Wir konnten zeigen, daß dies auf eine geschwächte Assoziation von Ssc1p mit in die Matrix eintretenden Polypeptiketten zurückgeführt werden kann. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Mutationen in Mge1p auch die Assoziation von Ssc1p mit der Importkomponente Tim44p beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurde der Komplex von Ssc1p und Tim44p durch Co-Immunpräzipitation mit Antiserum gegen Ssc1p analysiert. Die Co-Immunpräzipitationen wurden in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen ATP durchgeführt. Es zeigte sich, daß in *mge1-2* und *mge1-3* Mitochondrien eine wesentlich höhere ATP-Konzentration als in Wildtyp-Mitochondrien eingesetzt werden muß, damit der Komplex Ssc1p-Tim44p dissoziiert werden kann. Weiterhin konnten wir durch Co-Immunpräzipitation nachweisen, daß in Mitochondrien mit den Mge1-Proteinen Mge1-2p und Mge1-3p mehr Tim44p im Komplex mit Ssc1p vorlag als in Wildtyp-Mitochondrien.

[6] An der Translokation in die mitochondriale Matrix sind weitere Proteine des Translokationskomplexes der inneren Membran (TIM-Komplex) beteiligt, die in diesem Zusammenhang keine Rolle spielen und deren Funktion deshalb hier nicht näher dargestellt wird. Es sollte auch erwähnt werden, daß derzeit nicht klar ist, ob Ssc1p als eine Art „Import-Motor“ vergleichbar der Lokomotionskraft von Myosin fungiert oder ob der mitochondriale Proteinimport nach einem „molecular ratchet“-Mechanismus durch die Bindung von Vorläuferproteinen an Ssc1p erfolgt (als Übersichtsartikel, die sich mit dieser Kontroverse befassen, siehe: Pfanner und Meijer, 1995; Schatz und Dobberstein, 1996; Pilon und Schekman, 1999).

Zusammengefaßt bedeuten diese Befunde, daß die ATP-getriebene Dissoziation des Ssc1p-Tim44p-Komplexes durch die Mutationen in den Mge1-2- und Mge1-3-Proteinen beeinträchtigt ist.

In welcher Weise können Mutationen in Mge1p die nukleotidabhängige Wechselwirkung von Ssc1p mit Tim44p beeinflussen? Wir wissen, daß bakterielles GrpE *in vitro* die Nukleotidablösung von DnaK um einen Faktor von bis zu 5000 beschleunigt (Packschies et al., 1997). Aufgrund der Ähnlichkeit des mitochondrialen Hsp70-Systems mit dem bakteriellen DnaK-System und der hohen Homologie von Mge1p zu GrpE nehmen wir an, daß Mge1p wie GrpE die Nukleotidablösung von Ssc1p beschleunigt. Mutationen in Mge1p sollten also zu einer Gleichgewichtsverschiebung von Ssc1p in der ATP-gebundenen Konformation zur ADP-gebundenen Konformation führen. Wir wissen weiterhin, daß Ssc1p in dieser Konformation Tim44p binden kann oder an Tim44 gebunden ist (Kronidou et al., 1994). In Abwesenheit von Mge1p sollte die Dissoziation des Komplexes Ssc1p-Tim44 verlangsamt sein, da ein durch Mge1p vermittelter Nukleotidaustausch nicht erfolgt. Damit kommt es zu einer Arretierung des Chaperon-Substratbindungs-Zyklus. Es ist anzunehmen, daß Ssc1p in der ADP-gebundenen Konformation genauso wie andere Hsp70-Proteine eine hohe Affinität zu Substratproteinen mit langsamen Assoziations- und Dissoziationskinetiken besitzt (s. Einleitung). Die Vermutung, daß Ssc1p in Mitochondrien mit defektem Mge1p vorwiegend in der ADP-gebundenen Konformation vorliegt, wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß höhere ATP-Mengen zu den mitochondrialen Extrakten gegeben werden mußten, um den Komplex Ssc1p-Tim44p zu dissoziieren. Des weiteren konnten wir zeigen, daß Ssc1p in Mitochondrien mit defekten Mge1-Proteinen bei restriktiver Temperatur nicht mit Translokations-Intermediaten assoziiert ist. Offensichtlich ist der Komplex Ssc1p-Tim44p in Mitochondrien mit mutiertem Mge1p inaktiv und kann nicht produktiv mit in die Matrix eintretenden Polypeptidketten in Wechselwirkung treten. Die hier dargestellten Ergebnisse zur Kontrolle der nukleotidabhängigen Assoziation von Ssc1p mit Tim44 durch Mge1p wurde in einer weiteren Arbeit detailliert und bestätigt (Schneider et al., 1996).

Unsere Hypothese, daß Mge1p die reversible Assoziation von Ssc1p mit Substratproteinen vermittelt, wurde unlängst durch Untersuchungen mit gereinigtem Mge1p und Ssc1p bzw. DnaK unterstützt. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Mge1p tatsächlich die Nukleotidfreisetzung von Ssc1p und DnaK beschleunigt (Deloche und Georgopoulos, 1996; Dekker und Pfanner, 1997; Miao et al., 1997; Horst et al., 1997). In anderen Arbeiten wurde die nukleotidabhängige Asssoziation von Ssc1p und Mge1p nachgewiesen (Bolliger et al., 1994; Azem et al., 1997).

4. Mge1p wird für die Faltung eines in die Matrix importierten Testproteins (DHFR) benötigt

Um zu untersuchen, ob Mge1p neben dem mitochondrialen Proteinimport auch an anderen Prozessen der mitochondrialen Biogenese wie z. B. der Faltung beteiligt ist, wurde das Fusionsprotein pSu9(1-79)DHFR in Mitochondrien des Wildtyps und der Mge1p-Mutanten importiert. Als Kriterium für die native Struktur der DHFR-Enzyms kann die Löslichkeit und die intrinsische Trypsinresistenz des gefalteten Proteins herangezogen werden. Nach Import bei permissiver Temperatur (24°C) lagen in Wildtyp- und Mutanten-Mitochondrien 100% des importierten Materials proteaseresistent und löslich vor. Dagegen unterschied sich bei restriktiver Temperatur der Anteil der gefalteten DHFR in Wildtyp- und Mutanten-Mitochondrien (Westermann et al., 1995): In Wildtyp-Mitochondrien waren etwa 70% des importierten Materials gefaltet. Dagegen waren in *mge1-2* und *mge1-3* Mitochondrien nur etwa 20% der importierten DHFR-Moleküle löslich und proteaseresistent. In den Mitochondrien mit defektem Mge1p war darüber hinaus mehr als 50% der importierten DHFR in Aggregaten abgelagert. In Wildtyp-Mitochondrien hingegen wurde ein wesentlich geringerer Anteil an aggregierter DHFR beobachtet. Mit diesen Experimenten konnten wir zeigen, daß Mge1p also nicht nur am mitochondrialen Proteinimport beteiligt ist, sondern auch bei den anschließenden Prozessen der mitochondrialen Biogenese wie der Faltung der importierten Proteine in der Matrix.

Es ist anzunehmen, daß auch beim Prozeß der mitochondrialen Proteinfaltung die molekulare Rolle von Mge1p darin besteht, die Nukleotidfreisetzung von Ssc1p zu stimulieren. Wie oben diskutiert, kann wahrscheinlich nur durch die Mge1p-katalysierte Nukleotidfreisetzung Ssc1p reversibel und schnell den Substrat-Binde-Zyklus durchlaufen. Damit implizieren unsere Ergebnisse auch, daß eine reversible Assoziation der DHFR mit Ssc1p wesentlich für die Strukturbildung des Enzyms in der mitochondrialen Matrix ist.

5. Alle Mutationen in den Mge1-Proteinen bewirken eine reduzierte Stabilität

Die Struktur des bakteriellen GrpE-Proteins wurde im Komplex mit der ATPase-Domäne von DnaK mit einer Auflösung von 2.8 A aufgeklärt (Harrison et al., 1997). Im Kristall ist GrpE als Homodimer mit DnaK assoziiert. Dabei bindet das Dimer asymmetrisch an die ATPase-Domäne, so daß nur die DnaK-proximale Untereinheit mit der ATPase-Domäne in Wechselwirkung tritt. Beide GrpE-Untereinheiten zeigen eine gestreckte Struktur, bedingt durch zwei lange α-Helices. Im Bereich der Kontaktfläche zu DnaK bilden die zwei

Untereinheiten ein Vierhelixbündel aus. Der Carboxyterminus besitzt eine β-Faltblattstruktur, die ebenfalls einen Kontakt zu DnaK vermittelt.

Basierend auf den vorliegenden Strukturdaten des bakteriellen GrpE-Proteins können Struktur-Funktions-Zusammenhänge der Mge1-Mutanten nun leichter erkannt werden. Zur Struktur-Funktions-Aufklärung von GrpE-Proteinen wurde bereits durch die Charakterisierung von konditional defekten Proteinvarianten des *E. coli* GrpE beigetragen (Wu et al., 1994, 1996). Allerdings stehen bislang Untersuchungen zur Stabilität und Faltung von GrpE-Proteinen aus. In diesem Zusammenhang ist die *in vitro*-Analyse der konditionalen Mge1p-Proteinvarianten von Interesse. Um zu untersuchen, welche Auswirkung die erwähnten Aminosäure-Austausche in den Mge1p-Mutanten auf die Faltung, Stabilität und Aktivität des Proteins besitzen, wurden die Gene der reifen Formen des Wildtyp-Proteins und der Mutanten in *E. coli* überexprimiert und mittels eines carboxyterminalen Histidin-Tags durch Metall-Affinitäts-Chromatographie gereinigt.

Die Analyse von Wildtyp- und Mutanten-Protein erfolgte zunächst spektroskopisch. CD-Messungen im Fern-UV-Bereich ergaben, daß die Mge1-Proteine Mge1-3p bis Mge1-6p wie das Wildtyp-Protein einen α-helikalen Charakter besitzen (Lisse et al., Manuskript in Vorbereitung). Bei keinem der genannten Varianten war eine drastische, durch CD detektierbare Strukturänderung zu beobachten. Um zu untersuchen, ob die Austausche in den Mge1-Proteinen zu einer veränderten Stabilität führen, wurden die Proteine durch steigende Konzentrationen Harnstoff entfaltet und die Strukturänderung wiederum durch CD-Messung verfolgt. Für das Wildtyp-Protein wurde eine Stabilisierungsenergie von ΔG=-17.0 kJ/mol und für die Mutanten folgende ΔG-Werte ermittelt: Mge1-3p: -12,4 kJ/mol; Mge1-4p: -15.9 kJ/mol; Mge1-5p: -12.7 kJ/mol; Mge1-6p: 11.4 kJ/mol. Im Falle der Mge1-2-Mutante konnte die thermodynamische Stabilität nicht ermittelt werden, da ein großer Teil des Proteins bereits vor Zugabe von Harnstoff denaturiert vorlag. Die im α-helikalen Abschnitt lokalisierte Mutation der Mge1-2p (A81D) bewirkt offensichtlich eine drastische Reduktion der Stabilität. Diese Beobachtung erklärt auch den Befund, daß Mitochondrien der Mge1-2-Mutante nur etwa 20% der Mge1p-Konzentration des Wildtyps aufwiesen. Wir nehmen an, daß das Protein auch in Mitochondrien teilweise denaturiert vorliegt und deshalb einem hohen proteolytischen Umsatz unterliegt.

Die ΔG-Werte waren in den Mutanten Mge1-3p bis Mge1-6p im Vergleich zum Wildtyp-Protein bis zu maximal 6 kJ/mol reduziert. Unklar ist allerdings, ob der *in vivo* beobachtete, konditional letale Phänotyp allein auf die verringerte Stabilität der entsprechenden Proteine bei restriktiver Temperatur und einen dadurch bedingten erhöhten

proteolytischen Abbau zurückzuführen ist. Zur Beantwortung dieser Frage sind weitere *in vitro*-Untersuchungen zur Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen geplant.

Wo kartieren die Mutationen im Mge1-Protein? Basierend auf den Strukturdaten von GrpE kann die Struktur des mitochondrialen Proteins abgeleitet werden. Nach ”Modellierung” der Mge1p-Struktur liegt die Mutationen in Mge1-2p und Mge1-5p in den α-helikalen Bereichen (Abb. 3). Da es wahrscheinlich ist, daß die α-helikalen Segmente wesentlich zur Stabilisierung des Homo-Dimers beitragen, bewirken diese Austausche vermutlich durch eine Destabilisierung des dimeren Proteins den Funktionsverlust bei restriktiver Temperatur. Mit Ausnahme des Austausches in Mge1-2p liegen alle anderen Mutationen entweder eng benachbart zu Kontaktbereichen mit der ATPase-Domäne von Ssc1p oder betreffen Reste, die eine Wechselwirkung mit der ATPase-Domäne herstellen. Wir vermuten, daß die Austausche neben der Stabilität auch die Wechselwirkung mit Ssc1p und damit verbunden die katalytische Aktivität des Proteins beeinträchtigen. So konnten wir z. B. durch eine Co-Immunpräzipitation von Mge1p mit Antiserum gegen Ssc1p nachweisen, daß die Mutation in Mge1-3p die Assoziation des Proteins mit Ssc1p stark vermindert (Westermann et al., 1995). Es ist zu erwarten, daß auch einige oder alle der anderen, bislang in isolierten Mitochondrien nicht untersuchten Mge1p-Varianten die Wechselwirkung mit der ATPase-Domäne von Ssc1p und damit die Nukleotidfreisetzung beeinflussen. Derzeit wird die Wechselwirkung der Mutanten-Proteine mit gereinigtem DnaK-Protein mittels Biacore untersucht (Lisse et al., in Vorbereitung).

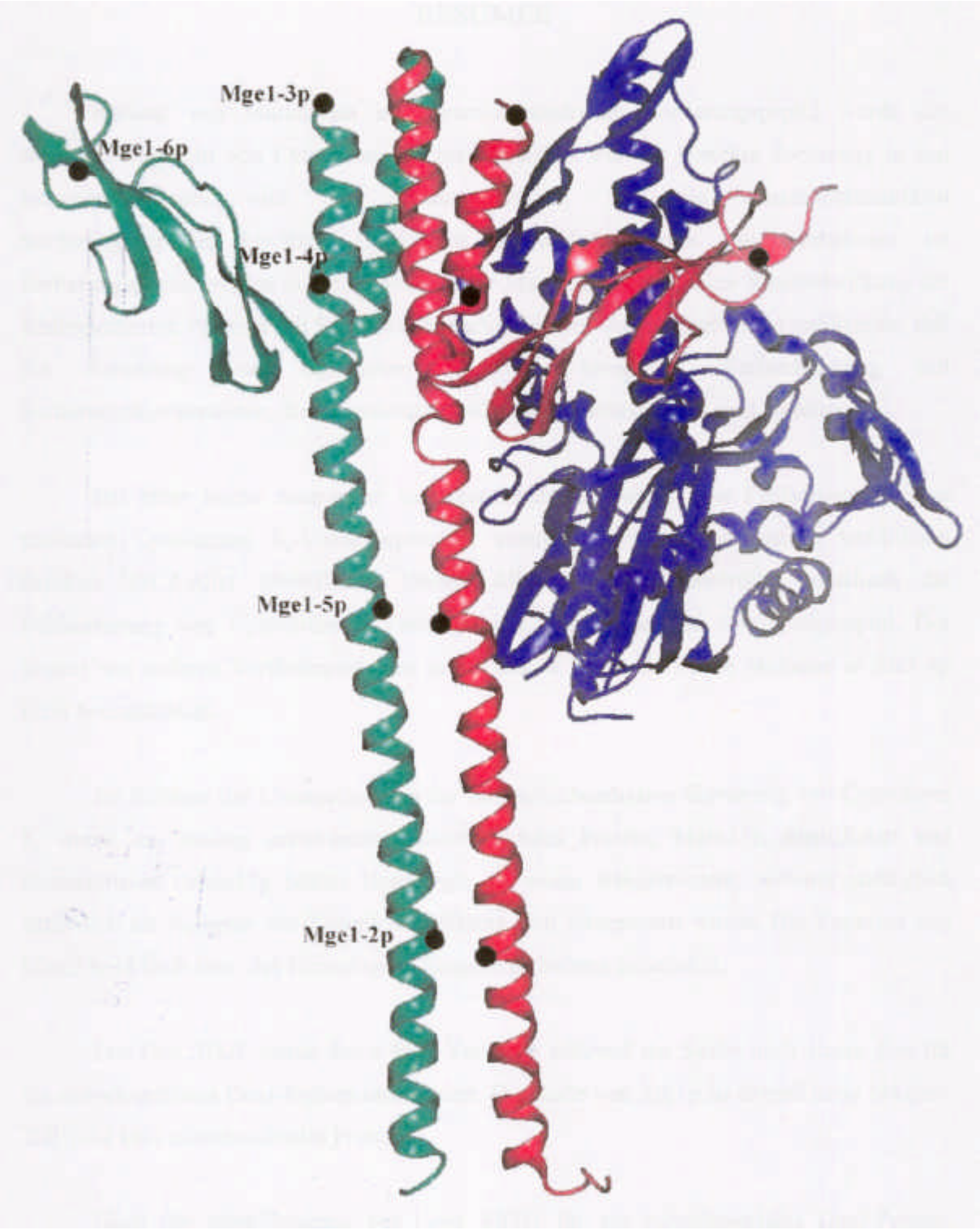

Abb. 3: Modell für Mge1p im Komplex mit der ATPase-Domäne von Hsp70 (blau). Die Austausche in den Mutanten-Mge1-Proteinen sind gekennzeichnet (gefüllte schwarze Kreise). Die Modellierung von Mge1p erfolgte nach den Kristall-Strukturdaten des bakteriellen GrpE (Harrison et al., 1997).

RESÜMEE

Anhand von Mutationen im intramitochondrialen Sortierungspeptid wurde der topogene Abschnitt von Cytochrom b_2 charakterisisiert. Für die korrekte Sortierung in den Intermembranraum wird der gesamte zweite Teil des intramitochondrialen Sortierungspeptides benötigt. Cytochrom b_2-Vorläuferproteine mit Mutationen im Sortierungspeptid werden in die mitochondriale Matrix importiert. Eine Wechselwirkung der fehlimportierten Proteine mit Ssc1p wurde nachgewiesen. Unsere Ergebnisse implizieren, daß die Sortierung von Cytochrom b_2 eine komplexe Wechselwirkung mit Sortierungskomponenten, die offensichtlich teilweise matrixexponiert sind, voraussetzt.

Bei einer Suche nach einer Suppressormutante, welche eine Fehlsortierung eines mutierten Cytochrome b_2-Vorläuferproteins unterdrückt, wurde ein neues, konditional defektes *SSC1*-Allel identifiziert. Dieses Allel (*ssc1-4*) unterdrückt spezifisch die Fehlsortierung von Cytochrom b_2-Varianten mit Austauschen im Sortierungspeptid. Der Import von anderen Vorläuferproteinen in die Matrix wurde durch die Mutation in Ssc1-4p nicht beeinträchtigt.

Im Rahmen der Untersuchungen zur intramitochondrialen Sortierung von Cytochrom b_2 wurde ein bislang unbekanntes mitochondriales Protein, Mam33p, identifiziert und charakterisiert. Mam33p besitzt Homologie zu einem Säugerprotein, welches anfänglich irrtümlich als Rezeptor des Komplementfaktors C1q interpretiert wurde. Die Funktion von Mam33p in Hefe bzw. des Homologs in Säugern ist bislang unbekannt.

Das Gen *XDJ1* wurde durch PCR-Versuche während der Suche nach einem Gen für ein mitochondriales DnaJ-Protein identifiziert. Die Rolle von Xdj1p ist derzeit nicht bekannt. Xdj1p ist kein mitochondriales Protein.

Nach der Identifizierung des Gens *MDJ1* für ein mitochondriales DnaJ-Protein, Mdj1p, durch die Arbeitsgruppe von Bart Barrell, Cambridge, UK, charakterisierten wir die Funktion von Mdj1p bei verschiedenen Prozessen der mitochondrialen Biogenese. Im

Gegensatz zu Ssc1p ist Mdj1p keine essentielle Komponente des mitochondrialen Importapparates. Mdj1p stimulierte die Faltung von Test-Proteinen, die in einer entfalteten Konformation in die Matrix importiert worden waren. Mdj1p konnte in Assoziation mit Translokations-Intermediaten, die bereits während der Translokation über die mitochondrialen Membranen falten, nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse zeigen, daß Mdj1p an der Faltung von in die Matrix importierten Proteinen beteiligt ist.

Mdj1p spielt eine protektive Rolle bei erhöhter Temperatur. *Dmdj1*-Mutanten sind temperatursensitiv. Wir konnten anhand von zwei Modellproteinen zeigen, daß Mdj1p die Aggregation thermolabiler Proteine in den Organellen unterdrückt. Da Mdj1p die transiente Bindung eines entfalteten Proteins an Ssc1p stimulierte, nehmen wir an, daß die protektive Rolle von Mdj1p bei erhöhter Temperatur zumindest teilweise auf die Modulation der Substratbinde-Eigenschaften von Ssc1p zurückzuführen ist.

Anhand von temperatursensitiven Mutanten gelang uns der Nachweis einer Funktion von Mdj1p bei der Biogenese eines mitochondrial kodierten Proteins. In Abwesenheit von intaktem Mdj1p aggregierte das ansonsten lösliche Protein VarI. Eine Rolle von Mdj1p bei der Faltung und/oder Assemblierung anderer mitochondrial kodierter Proteine ist zu vermuten.

Mdj1p wird bei erhöhter Temperatur für die Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase benötigt. Damit konnte die Beobachtung erklärt werden, daß *Dmdj1*-Zellen bei Kultivierung bei 30°C, einer „intermediären“ Temperatur für *S. cerevsiae*, die mitochondriale DNA verlieren. Bei niedriger Temperatur (24°C) führt die Abwesenheit von Mdj1p zur Entstehung von defekten mitochondrialen Genomen, die nicht mehr in der Lage sind, den Zellen respiratorische Aktivität zu vermitteln. Bei niedriger Temperatur bleibt die Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase auch in Abwesenheit von Mdj1p erhalten. Die molekulare Funktion von Mdj1p bei der Propagierung eines funktionellen, mitochondrialen Genoms bei niedriger Temperatur ist bislang ungeklärt.

Eine Reihe nicht-mitochondrialer DnaJ-Proteine komplementierten *in vivo* die Funktion von Mdj1p hinsichtlich der Propagierung des mitochondrialen Genoms. So vermittelten beispielsweise DnaJ aus *E. coli* und alle von uns getesteten DnaJ-Homologe aus

S. cerevisiae die Propagierung des mitochondrialen Genoms. Sogar Deletionskonstrukte, bestehend aus der J-Domäne und der anschließenden glycin-reichen Region von *E. coli* DnaJ und Mdj1p, waren ausreichend für die Erhaltung des mitochondrialen Genoms. Durch die Komplementationsversuche konnten Hinweise erhalten werden, daß Mdj1p auch für die Synthese mitochondrialer Proteine benötigt wird.

Anhand konditionaler Mutanten des mitochondrialen GrpE-Homologs, Mge1p, konnten wir zeigen, daß Mge1p die Wechselwirkung von Ssc1p und translozierenden Polypeptidketten kontrolliert. Dabei moduliert Mge1p die nukleotidabhängige Assoziation von Ssc1p mit der Importkomponente Tim44p. Wir konnten weiterhin nachweisen, daß Mge1p auch für die Faltung eines importierten Testproteins in der mitochondrialen Matrix benötigt wird. Bei erhöhter Temperatur vermittelt Mge1p wie Mdj1p die transiente Bindung eines entfalteten Proteins an Ssc1p. Mit diesen Untersuchungen konnte bewiesen werden, daß Mge1p als Co-Chaperon von Ssc1p dessen Substratbindungs-Eigenschaften moduliert.

Für Struktur-Funktions-Untersuchungen wurden das Wildtyp-Mge1-Protein und die mutierten Proteine gereinigt und spektroskopisch analysiert. Nach Entfaltung der Proteine mit Harnstoff wurden die Stabilisierungsenergien der Mge1-Proteine berechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden nach Modellierung des Mge1-Proteins nach den Strukturdaten für GrpE aus *E. coli* diskutiert.

LITERATUR

Arretz, M., Schneider, H., Wienhues, U. und Neupert, W. (1991). Processing of mitochondrial precursor proteins. Biomed. Biochim. Acta 50, 403-412.

Atencio, D. P. und Yaffe, M. P. (1992). MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. Mol. Cell. Biol. 12, 283-291.

Azem, A., Oppliger, W., Lustig, A., Jenö, P., Feifel, B., Schatz, G. und Horst, M. (1997). The mitochondrial hsp70 chaperone system. J. Biol. Chem. 272, 20901-20906.

Beasley, E. M., Müller, S. und Schatz, G. (1993). The signal that sorts yeast cytochrome b_2 to the mitochondrial intermembrane space contains three distinct functional regions. EMBO J. 12, 2303-2311.

Becker, J., Walter, W., Yan, W. und Craig, E. A. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. Mol. Cell. Biol. 16, 4378-4386.

Behrens, M., Michaelis, G. und Pratje, E. (1991). Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase. Mol. Gen. Genet. 228, 167-176.

Bimston, D., Song, J., Winchester, D., Takayama, S., Reed, J. C. und Morimoto, R. I. (1998). BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. EMBO J. 17, 6871-6878.

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1496-1500.

Blumberg, H. und Silver, P. A. (1991). A homologue of the bacterial heat-shock gene DnaJ that alters protein sorting in yeast. Nature 349, 627-629.

Bömer, U., Meijer, M., Guiard, B., Dietmeier, K., Pfanner, N. und Rassow, J. (1997). The sorting route of cytochrome b_2 branches from the general mitochondrial import pathway at the preprotein translocase of the inner membrane. J. Biol. Chem. 272, 30439-30446.

Bömer, U., Maarse, A. C., Martin, F., Geissler, A., Merlin, A., Schönfisch, B., Meijer, M., Pfanner, N. und Rassow, J. (1998). Separation of structural and dynamic functions of the mitochondrial translocase: Tim44 is crucial for the inner membrane import sites in translocation of tightly folded domains, but not of loosely folded preproteins. EMBO J. 17, 4226-4237.

Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B. S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. und Schatz, G. (1994). A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. EMBO J. 13, 1998-2006.

Brodsky, J. L. und Schekman, R. (1993). A sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. J. Cell Biol. 123, 1355-1363.

Brodsky, J. L. (1996). Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. TIBS 21, 122-126.

Brown, C. R., Martin, R. L., Hansen, W. J., Beckmann, R. P. und Welch, W. J. (1993). The constitutive and stress inducible forms of hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. J. Cell Biol. 120, 1101-1112.

Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

Bukau, B. und Walker, G. (1990). Mutations altering heat shock specific RNA polymerase suppress major cellular defects of *E. coli* mutants lacking the DnaK chaperone. EMBO J. 9, 4027-4036.

Caplan, A. J. und Douglas, M. G. (1991). Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. J. Cell Biol. 114, 609-621.

Caplan, A. J., Cyr, D. M. und Douglas, M. G. (1992a). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. Cell 71, 1143-1155.

Caplan, A. J., Tsai, J., Casey, P. J. und Douglas, M. D. (1992b). Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. 267, 18890-18895.

Chattoraj, D. K., Ghirlando, R., Park, K., Dibbens, J. A. und Lewis, M. S. (1996). Dissociation kinetics of RepA dimers: implications for mechanisms of activation of DNA binding by chaperones. Genes Cells 1, 189-199.

Cheng, M. Y., Hartl, F.-U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. und Horwich, A. L. (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. Nature 337, 620-625.

Chirico, W. J., Waters, M. G. und Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature 332, 805-810.

Cyr, D. M., Stuart, R. A., und Neupert, W. (1993). A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. J. Biol. Chem. 268, 23751-23754.

Cyr, D. M., Langer, T. und Douglas, M. G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. TIBS 19, 176-181.

Cyr, D. M. (1997). HSP40 (DnaJ-related) proteins – an overview. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts (Hrsg.: M.-J. Gething) Sambrock & Tooze Publication, Oxford University Press, New York, 89-95.

Dedio, J. und Müller-Esterl, W. (1996). Kininogen binding protein p33/gC1qR is localized in the vesicular fraction of endothelial cells. FEBS Lett. 399, 255-258.

Dedio, J., Jahnen-Dechent, W., Bachmann, M. und Müller-Esterl, W. (1998). The multiligand-binding protein gC1qR, putative C1q receptor, is a mitochondrial protein. J. Immunol., 160, 3534-3542.

Dekker, P. J. T. und Pfanner, N. (1997). Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. J. Mol. Biol. 270, 321-327.

Deloche, O. und Georgopoulos, C. (1996). Purification and biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae´s* Mge1p, the mitochondrial cochaperone of Ssc1p. J. Biol. Chem. 271, 23960-23966.

Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A. und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature 332, 800-805.

Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. und Bukau, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. Nature 400, 693-696.

Duchniewicz, M., Germaniuk, A., Westermann, B., Neupert, W., Schwarz, E. und Marszalek, J. (1999). Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. Mol. Cell Biol. Im Druck.

Eilers, M. und Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. Nature 322, 228-232.

Gärtner, F., Bömer, U., Guiard, B. und Pfanner, N. (1995). The sorting signal of cytochrome b_2 promotes early divergence from the general mitochondrial import pathway and restricts the unfoldase activity of matrix Hsp70. EMBO J. 14, 6043-6057.

Gambill, B. D., Voos, W., Kang, P. J., Miao, B., Langer, T., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1993). A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. J. Cell Biol. 123, 109-117.

Gamer, J., Bujard, H. und Bukau, B. (1992). Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ^{32}. Cell 69, 833-842.

Gasser, S. M., Ohashi, A., Daum, G., Böhni, P. C., Gibson, J., Reid, G. A., Yonetani, T. und Schatz, G. (1982). Imported mitochondrial proteins cytochrome b_2 and cytochrome c_1 are processed in two steps. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 267-271.

Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1998). Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. EMBO J. 17, 6497-6507.

Georgopoulos, C. P. und Herskowitz, I (1971). *Escherichia coli* mutants blocked in lambda DNA synthesis. In: The bacteriophage lambda (Hrsg: A.D. Hershey) Cold Spring Harbor Press, New York, 553-564.

Ghebrehiwet, B., Lim, B.-L., Peerschke, E. I. B., Willis, A. C. und Reid, K. B. M. (1994). Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. J. Exp. Med. 179, 1809-182.

Gisler, S. M., Pierpaoli, E. V. und Christen, P. (1998). Catapult mechanism renders the chaperone action of Hsp70 unidirectional. J. Mol. Biol. 279, 833-840.

Glick, B. S., Brandt, A., Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R. L. und Schatz, G. (1992a). Cytochromes c_1 and b_2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. Cell 69, 809-822.

Glick, B. S., Beasley, E. M. und Schatz, G. (1992b). Protein sorting in mitochondria. TIBS 17, 453-459.

Glick, B. S., Wachter, C., Reid, G. A. und Schatz, G. (1993). Import of cytochrome b_2 to the mitochondrial intermembrane space: the tightly folded heme-binding domain makes import dependent upon matrix ATP. Protein Sci. 2, 1901-1917.

Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. und Lorimer, G. H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. Nature *337,* 44-47.

Greene, M. K., Maskos, K. und Landry, S. L. (1998). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6108-6113.

Gruhler, A., Ono, H., Guiard, B., Neupert, W. und Stuart, R. A. (1995). A novel intermediate on the import pathway of cytochrome b_2 into mitochondria: evidence for conservative sorting. EMBO J. 14, 1349-1359.

Gruhler, A., Arnold, I., Seytter, T., Guiard, B., Schwarz, E., Neupert, W. und Stuart, R. A. (1997). N-terminal hydrophobic sorting signals of preproteins confer mitochondrial hsp70 independence for import into mitochondria. J. Biol. Chem. 272, 17410-17415.

Guiard, B. (1985). Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b_2) EMBO J. 4, 3265-3272.

Hannan, L. A., Newmyer, S. L. und Schmid, S. L. (1998). ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for hsc70. Mol. Biol. Cell 9, 2217-2229.

Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F.-U. und Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. Science 276, 431-435.

Hartl, F.-U., Ostermann, J., Guiard, B. und Neupert, W. (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. Cell 51, 1027-1037.

Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381, 571-580.

Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C., Hendrix, R. W. und Ellis, R. J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333, 330-334.

Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Craig, E. A. und Neupert, W. (1994). Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. J. Cell Biol. 127, 893-902.

Herwald, H., Dedio, J., Kellner, R., Loos, M. und Müller-Esterl, W. (1996). Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. J. Biol. Chem. 271, 13040-14047.

Hesterkamp, T. und Bukau, B. (1998). Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli.* EMBO J. 17, 4818-4828.

Hill, R. B., Flanagan, J. M. und Prestegard, J. H. (1995). ^{1}H and ^{15}N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ(1-78). Biochemistry 34, 5587-5596.

Höhfeld, J. und Hartl, F.U. (1994). Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. J. Cell Biol. 126, 305-315.

Höhfeld, J. und Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. EMBO J. 16, 6209-6216.

Honoré, B., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Vandekerckhove, J., Celis, J. E. und Leffers, H. (1993) Cloning and expression of a cDNA covering the complete coding region of the P32 subunit of human pre-mRNA splicing factor SF2. Gene 134, 283-287.

Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schönfeld, H.-J., Schatz, G. und Azem, A. (1997). Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. EMBO J. 16, 1842-1849.

Hwang, D. S., Crooke, E. und Kornberg, A. (1990) Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein. J Biol Chem 265, 19244-19248.

Hwang, D. S. und Kaguni, J. M (1991). dnaK protein stimulates a mutant form of dnaA protein in *Escherichia coli* DNA replication. J. Biol. Chem. 266, 7537-7541.

Hwang, S. T., Wachter, C. und Schatz, G. (1991). Protein import into the yeast mitochondrial matrix. J. Biol. Chem. 266, 21083-21089.

Ikeda, E., Yoshida, S., Mitsuzawa, H., Uno, I. und Toh-e, A. (1994). *YGE1* is a yeast homologue of *Escherichia coli* grpE and is required for maintenance of mitochondrial functions. FEBS Lett. 339, 265-268.

Jascur, T., Goldenberg, D. P., Vestweber, D. und Schatz, G. (1992). Sequential translocation of an artificial precursor protein across the two mitochondrial membranes. J. Biol. Chem. 267, 13636-13641.

Jensen, R. E., Schmidt, S. und Mark, R. J. (1992). Mutations in a 19-amino-acid hydrophobic region of the yeast cytochrome c_1 presequence prevent sorting to the mitochondrial intermembrane space. Mol. Cell. Biol. 12, 4677-4686.

Jordan, R. und McMacken, R. (1995). Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. J.Bbiol. Chem. 270, 4563-4569.

Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. Nature 348, 137-143.

Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W. und Hartl, F.-U. (1992). Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. Cell 68, 1163-1175.

Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D. und Binns, G. (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K and *Drosophila* splicing regulators. Cell 66, 383-394.

Kronidou, N. G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B. S., Schatz, G. und Horst, M. (1994). Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12818-12822.

Kubo, Y., Tsunehiro, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Ikeda, E., Toh-e, A., Morishima, N., Shibata, T. und Endo T. (1999). Two distinct mechanisms operate in the reactivation of heat-denatured proteins by the mitochondrial Hsp70/Mdj1p/Yge1p chaperone system. J. Mol. Biol. 286, 447-464.

Laloraya, S., Gambill, B. D. und Craig, E. A. (1994). A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6481-6485.

Laloraya, S., Dekker, P. J. T., Voos, W., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1995). Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. Mol. Cell. Biol. 15, 7098-7105.

Langer, T., Neupert, W. und Schwarz, E. (1997). Functions of molecular chaperone proteins in the biogenesis of mitochondria. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts (Hrsg.: M.-J. Gething) Sambrock & Tooze Publication, Oxford University Press, New York, 499-506.

Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. und Finch, J. T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature 275, 416-420.

Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5452-5457.

Lee, D. H., Sherman, M. Y. und Goldberg, A. L. (1996). Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell. Biol. 16, 4773-4781.

Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1991a). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proc. Natl. Acad, Sci. USA 88, 2874-2878.

Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M., Johnson, C. und Georgopoulos, C. (1991b). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. J. Biol. Chem. 266, 14491-14496.

Lim, B.-L., Reid, K. B. M., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E. I. B., Leigh, L. A. E. und Preissner, K. T. (1996). The binding protein for globular heads of complement factor C1q, gC1qR. J. Biol. Chem. 271, 26739- 26744.

Lorimer, H. E., Brewer, B. J. und Fangman, W. L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. Mol. Cell. Biol. 15, 4803-4809.

Luke, M. M., Sutton, A und Arndt, K. T. (1991). Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. J. Cell Biol. 114, 623-638.

Lyman, S. K. und Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 131, 1163-1171.

Manning-Krieg, U. C., Scherer, P. E. und Schatz, G. (1991). Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. EMBO J. 10, 3273-3280.

Matlack, K. E. S., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T. A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-α factor across the ER membrane. Cell 97, 553-564.

McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. J. Mol. Biol. 249, 126-137.

Miao, B., Davis, J. E. und Craig, E. A. (1997). Mge1p functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 265, 541-552.

Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K. und Hartl, F.-U. (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. J. Biol. Chem. 271, 19617-19624.

Muta, T., Kang, D., Kitajima, S., Fujiwara, T. und Hamasaki, N. (1997). p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 272, 24363-24370.

Myers, A. M., Pape, L. K. und Tzagoloff, A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae.* EMBO J. 4, 2087-2092.

Nakai, M., Kato, Y., Ikeda, E., Toh-e, A. und Endo, T. (1994). Yge1p, a eukaryotic GrpE homolog, is localized in the mitochondrial matrix and interacts with mitochondrial Hsp70. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 435-442.

Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. und Craig, E. A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. Cell 71, 97-105.

Nelson, M. K., Kurihara, T. und Silver, P. A. (1993). Extragenic suppressors of mutations in the cytoplasmic C terminus of *SEC63* define five genes in *Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 134, 159-173.

Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria. Ann. Rev. Biochem. 66, 863-917.

Nollen, E. A. A., Brunsting, J. F., Roelofsen, H., Weber, L. A. und Kampinga, H. H. (1999). In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. Mol. Cell. Biol. 19, 2069-2079.

Nunnari, J., Fox, T. D. und Walter, P. (1993). A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. Science 262, 1997-2004.

Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, I. und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. J. Biol. Chem. 257, 13042-13047.

Ono, H., Gruhler, A., Stuart, R. A., Guiard, B., Schwarz, E. und Neupert, W. (1995). Sorting of cytochrome b_2 to the intermembrane space of mitochondria. J. Biol. Chem. 270, 16932-16938.

Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W. und Hartl, F.-U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. Nature 341, 125-130.

Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. und Reinstein, J. (1997). GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacememt mechanism. Biochemistry 36, 3417-3422.

Palleros, D. R., Welch, W. J. und Fink, A. L. (1991). Interaction of hsp70 with unfolded proteins: Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5719-5723.

Pelham, H. R. B. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 46, 959-961.

Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the J-domain and the gly/phe-rich region of the *Escherichia coli* DnaJ protein. J. Mol. Biol. 260, 236-250.

Pfanner, N., Tropschug, M. und Neupert, W. (1987). Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. Cell 49, 815-823.

Pfanner, N. und Meijer, M. (1995). Pulling in the proteins. Curr. Biol. 5, 132-135.

Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B. A., Lopez-Buesa, P., Walter, W. A., Wiedmann, M. und Craig, E. A. (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. EMBO J. 17, 3981-3989.

Pierpaoli, E. V., Sandmeier, E., Baici, A., Schönfeld, H.-J., Gisler, S. und Christen, P. (1997). The power stroke of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone system. J. Mol. Biol. 269, 757-768.

Pilon, M. und Schekman, R. (1999). Protein translocation: How Hp70 pulls it off. Cell 97, 679-682.

Prip-Buus, C., Westermann, B., Schmitt, M., Langer, T., Neupert, W. und Schwarz, E. (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. FEBS Lett. 380, 142-146.

Rassow, J., Hartl, F.-U., Guiard, B., Pfanner, N. und Neupert W. (1990). Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. FEBS Lett. 275, 190-194.

Rassow, J. und Pfanner, N. (1991). Mitochondrial preproteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space. FEBS Lett. 293, 85-88.

Rassow, J. und Pfanner, N. (1995). Molecular chaperones and intracellular protein translocation. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 126, Springer-Verlag, Berlin, 199-264.

Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1994). Mitochondrial protein import: biochemical and genetical evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. J. Cell Biol. 127, 1547-1556.

Rassow, J., Dekker, P. J. T., van Wilpe, S., Meijer, M. und Soll, J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: Function and evolution. J. Mol. Biol. 286, 105-120.

Reading, D. S., Hallberg, R. L. und Myers, A. M. (1989). Characterization of the yeast *HSP60* gene coding for a mitochondrial assembly factor. Nature 337, 655-659.

Ritossa, F. M. (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 18, 571-573.

Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B. S. und Schatz, G. (1996). Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. EMBO J. 15, 764-774.

Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G. und Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. J. Cell Biol. 109, 2641-2652.

Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. und Neupert, W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. Cell 77, 249-259.

Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. und Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. J. Cell Biol. 109, 2665-2675.

Sakakibara, Y. (1988). The *dnaK* gene of *Escherichia coli* functions in initiation of chromosome replication. J. Bacteriol. 170, 972-979.

Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D. und Schekman, R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. Cell 69, 353-365.

Schatz, G. und Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. Science 271, 1519-1526.

Scherer, P. E., Krieg, U. C., Hwang, S. T., Vestweber, D. und Schatz, G. (1990). A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kDa mitochondrial stress protein. EMBO J. 9, 4315-4322.

Schilke, B., Forster, J., Davis, J., James, P., Walter, W., Laloraya, S., Johnson, J., Miao, B. und Craig, E. (1996). The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a

mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. J. Cell Biol. 134, 603-613.

Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P. A. (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. J. Cell Biol. 129, 979-988.

Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. und Christen, P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. Science 263, 971-3.

Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. und Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. EMBO J. 10, 247-254.

Schneider, H.-C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. und Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. Nature 371, 768-774.

Schneider, H.-C., Westermann, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1996). The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. EMBO J. 15, 5796-5803.

Schröder, H., Langer, T., Hartl, F.-U. und Bukau, B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. EMBO J. 12, 4137-4144.

Schwarz, E., Seytter, T., Guiard, B. und Neupert, W. (1993). Targeting of cytochrome b_2 into the mitochondrial intermembrane space: specific recognition of the sorting signal. EMBO J. 12, 2295-2302.

Schwarz, E., Westermann, B., Caplan, A. J., Ludwig, G. und Neupert, W. (1994). *XDJ1*, a gene encoding a novel non-essential DnaJ homologue from *Saccharomyces cerevisiae.* Gene 145, 121-124.

Sell, S. M., Eisen, C., Ang, D., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1990). Isolation and characterization of *dnaJ* null mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172, 4827-4835.

Seytter, T., Lottspeich, F., Neupert, W. und Schwarz, E. (1998). Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the human complement receptor gC1q-R. Yeast 14, 303-310.

Silver, P. A. und Way, J. C. (1993). Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. Cell 74, 5-6.

Skowyra, D. und Wickner, S. (1992). DnaJ, DnaK, and GrpE heat shock proteins are required in oriP1 DNA replication solely at the RepA monomerization step. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 10345-10349.

Skowyra, D. und Wickner, S. (1993). The interplay of the GrpE heat shock protein and Mg^{2+} in RepA monomerization by DnaJ and DnaK. J. Biol. Chem. 268, 25296-25301.

Sozhamannan, S. und Chattoraj, D. K. (1993). Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. J. Bacteriol. 175, 3546-3555.

Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E. und Culotta, V. C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. 273, 31138-31144.

Straus, D. B., Walter, W. A. und Gross, C. A. (1988). *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. Genes Dev. 2, 1851-1858.

Stuart, R. A., Gruhler, A., van der Klei, I., Guiard, B., Koll, H. und Neupert, W. (1994). The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. Eur. J. Biochem. 220, 9-18.

Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B. und Hartl, F. U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system - DnaK, DnaJ, and GrpE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10345-10349.

Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. und Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. EMBO J. 15, 408-417.

Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wüthrich, K. (1994). NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ chaperone: Secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11343-11347.

Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. und Hartl, F. U. (1999). Polypeptide flux through the bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. Cell 97, 755-765.

Tissières, A., Mitchell, H. K. und Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84, 389-398.

Ungermann, C., Neupert, W. und Cyr, D. M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. Science 266, 1250-1253.

Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. und Cyr, D. M. (1996). The ΔΨ- and Hsp70/MIM44-dependent reaction cycle driving early steps of protein import into mitochondria. EMBO J. 15, 735-744.

Velculescu, V. E., Zhang, L. Zhou, W., Vogelstein, J., Basrei, M. A., Bassett, D. E. Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1999). Characterization of the yeast transcriptome. Cell 88, 243-251.

Vogel, J. P., Misra, L. M. und Rose, M. D. (1990). Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. J. Cell Biol. 110, 1885-1895.

Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N. und Voos, W. (1999). The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. Cell 97, 565-574.

von Ahsen, O., Voos, W., Henninger, H. und Pfanner, N. (1995). The mitochondrial protein import machinery. J. Biol. Chem. 270, 29848-29853.

Voos, W., Gambill, B. D., Guiard, B., Pfanner, N. und Craig, E. A. (1993). Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix. J. Cell Biol. 123, 119-126.

Voos, W., Gambill, B. D., Laloraya, S., Ang, D., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1994). Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. Mol. Cell. Biol. 14, 6627-6634.

Voos, W., v. Ahsen, O., Müller, H., Guiard, B., Rassow, J. und Pfanner, N. (1996). Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. EMBO J. 15, 2668-2677.

Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. und Neupert, W. (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. EMBO J. 13, 5135-5145.

Wall, D., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1994). The NH_2-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for λ replication. J. Biol. Chem. 269, 5446-5451.

Wall, D., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1995). The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. J. Biol. Chem. 270, 2139-2144.

Wawrzynów, A. und Zylicz, M. (1995). Divergent effects of ATP on the binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denatured protein substrates. J. Biol. Chem. 270, 19300-19306.

Wawrzynów, A., Banecki, B., Wall, D., Liberek, K., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1995). ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK chaperone for binding to both native and denatured protein substrates. J. Biol. Chem. 270, 19307-19311.

Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W. und Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. EMBO J. 14, 3452-3460.

Westermann, B., Gaume, B., Herrmann, J. M., Neupert, W. and Schwarz, E. (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. Mol. Cell. Biol. 16, 7063-7071.

Westermann, B. und Neupert, W. (1997). Mdj2p, a novel DnaJ homolog in the mitochondrial inner membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 272, 477-483.

Wickner, S., Hoskins, J. und McKenney, K. (1991a). Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. Nature 350, 165-167.

Wickner, S., Hoskins, J. und McKenney, K. (1991b). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7903-7907.

Wu, B., Ang, D., Snavely, M. und Georgopoulos, C. (1994). Isolation and characterization of point mutations in the *Escherichia coli* grpE heat shock gene. J. Bacteriol. 176, 6965-6973.

Wu, B., Wawrzynow, A., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1996). Structure-function analysis of the *Escherichia coli* GrpE heat shock protein. EMBO J. 15, 4806-4816.

Zhong, T. und Arndt, K. T. (1993). The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation. Cell 73, 1175-1186.

Ziegelhoffer, T., Lopez-Buesa, P. und Craig, E. A. (1995). The dissociation of ATP from hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae* is stimulated by both Ydj1p and peptide substrates. J. Biol. Chem. 270, 10412-10419.

Zylicz, M., Ang, D., Liberek, K. und Georgopoulos, C. (1989). Initiation of λ DNA replication with purified host- and bacteriophage-encoded proteins: The role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins. EMBO J. 8, 1601-1608.

Zylicz, M. (1993). The *Escherichia coli* chaperones involved in DNA replication. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **339,** 271-278.

Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten, eigenen Veröffentlichungen

1. E. Schwarz, T. Seytter, B. Guiard und W. Neupert (1993). Targeting of cytochrome b_2 into the intermembrane space: specific recognition of the sorting signal. EMBO J. **12**: 2295-2302.

2. N. Rowley, C. Prip-Buus, B. Westermann, C. Brown, E. Schwarz, B. Barrell und W. Neupert (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. Cell **77**: 249-259.

3. E. Schwarz, B. Westermann, A. J. Caplan, G. Ludwig und W. Neupert (1994). *XDJ1*, a gene encoding a novel non-essential DnaJ homologue from *Saccharomyces cerevisiae.* Gene **145**: 121-124.

4. E. Schwarz und W. Neupert (1994). Mitochondrial protein import: mechanisms, components and energetics. Biochim. Biophys. Acta **1187**: 270-274.

5. B. Westermann, C. Prip-Buus, W. Neupert und E. Schwarz (1995) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. EMBO J. **14**: 3452-3460.

6. H. Ono, A. Gruhler, R. A. Stuart, B. Guiard, E. Schwarz und W. Neupert (1995). Sorting of cytochrome b_2 to the intermembrane space of mitochondria: kinetic analysis of sorting intermediates demonstrates passage through the matrix. J. Biol. Chem. **270**: 16932-16938.

7. E. Schwarz (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Mdj1p. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts. (Hrsg: Mary-Jane Gething) A Saambrook & Tooze Publication, Oxford University Press, Oxford, UK S. 106-107.

8. C. Prip-Buus, B. Westermann, M. Schmitt, T. Langer, W. Neupert und E. Schwarz (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. FEBS Lett. **380:** 142-146.

9. T. Langer, W. Neupert und E. Schwarz (1997). Functions of molecular chaperone proteins in the biogenesis of mitochondria. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts. (Hrsg: Mary-Jane Gething) A Sambrook & Tooze Publication, Oxford University Press, Oxford, UK S. 499-506.

10. E. Schwarz, H. Lilie und R. Rudolph (1996). Effect of molecular chaperones on in vitro and in vivo folding processes. Biol. Chem. Hoppe Seyler **377:** 411-416.

11. B. Westermann, B. Gaume, J. M. Herrmann, W. Neupert und E. Schwarz (1996). The role of the mitochondrial DnaJ homolog, Mdj1p, as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. Mol. Cell. Biol. **16:** 7063-7071.

12. A. Gruhler, I. Arnold, T Seytter, B. Guiard, E. Schwarz, W. Neupert und R. A. Stuart (1997). N-terminal hydrophobic sorting signals of preproteins confer mitochondrial hsp70 independence for import into mitochondria. J. Biol. Chem. **28:** 17410-17415.

13. T. Seytter, F. Lottspeich, W. Neupert und E. Schwarz (1998). Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the human complement receptor gC1q-R. Yeast **14:** 303-310.

14. M. Duchniewicz, A. Germaniuk, B. Westermann, W. Neupert, E. Schwarz und J. Marszalek (1999). Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. Mol. Cell. Biol. **19:** 8201-8210.

15. T. Lisse und E. Schwarz (2000). Functional specificiy of the mitochondrial DnaJ, Mdj1p, in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Genet. **263:** 527-534.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nicht andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich, entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Halle an der Saale, November, 1999

Elisabeth Schwarz

Curriculum Vitae

Name	Elisabeth Schwarz
Geburtstag/-ort	9. Juni 1957 in Ingolstadt
Familienstand	ledig, ein Kind
Nationalität	deutsch
Privatadresse	Körnerstr. 37
	06114 Halle
Telefon	0345 / 5220683

Schulbildung

1964-1968	Besuch der Grundschule in Fürstenfeldbruck
1968-1977	Besuch des Graf-Rasso-Gymnasiums in Fürstenfeldbruck
1977	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1977-1981	Studium der Biologie an der Universität in Regensburg (Diplomstudiengang)
1982	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität, München, unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Piepersberg mit dem Thema: "Genetische und physiologische Untersuchungen an klinischen Isolaten mit unspezifischer Aminoglykosid-Resistenz“

Wissenschaftliche Tätigkeit

1982-1986	Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Leitung von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt mit dem Thema: "Der Citrat-Metabolismus von Klebsiella pneumoniae: Molekularbiologische Charakterisierung der beteiligten Gene"
1986-1987	wissenschaftliche Assistentin bei Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
1987-1988	DFG-Stipendiatin, Forschungsaufenthalt am John Innes Institute, Norwich, England, bei Prof. Dr. David Hopwood
1989-1990	wissenschaftliche Assistentin am Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg, bei Prof. Dr. Thomas Jentsch
Ende 1990- April 1991	viermonatiger Aufenthalt am Institut für Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, bei Prof. Dr. Volker Höllt
1991-1996	wissenschaftliche Assistentin am Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, bei Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
seit Juni 1996	wissenschaftliche Assistentin am Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Prof. Dr. Rainer Rudolph

Halle im November, 1999

Danksagung

Der überwiegende Anteil der hier zusammengefaßten Ergebnisse und damit die Grundlage der meisten vorgelegten Veröffentlichungen wurde im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München erhalten. Mein besonderer Dank gilt deshalb Herrn Neupert, der es mir ermöglichte, mit einer kleinen Arbeitsgruppe die Voraussetzungen für die hier vorgelegte Arbeit zu schaffen. Ich möchte Herrn Neupert auch für das intellektuelle „Ambiente“ seines Lehrstuhls danken, durch welches ich an Leistungsprofil gewinnen und lernen konnte, auf einem hohen Niveau wissenschaftlich produktiv zu sein.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich allen meinen „ehemaligen“ Mitarbeitern in München für ihren enormen Arbeitseinsatz, ihre stetige Leistungsbereitschaft und nicht zuletzt ihre Loyalität und Herzlichkeit. Namentlich bedanken möchte ich mich deshalb bei meinen „Ex-Doktoranden“, Tilman Seytter, Benedikt Westermann und Brigitte Gaume, meinen „Ex-Postdocs“, Hideyu Ono und Carina Prip-Buus, meinen damaligen technischen Assistentinnen, Gabriele Ludwig und Gabi Bader. Danken möchte ich auch Regina Lapschanski und der inzwischen verstorbenen Elisabeth Rastel, die unser Labor und den gesamten 1. Stock der Goethestr. 33 funktionsfähig gehalten haben. Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls Neupert, die mich in den Jahren 1991 bis 1996 durch ihre Hilfsbereitschaft, ihre Anteilnahme bei den alltäglichen Leiden und Freuden des Labor- bzw. Assistentenlebens und ihren unverwüstlichen Humor bei der Stange gehalten haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Tanja Lisse, meiner ersten halleschen Doktorandin für ihre Mitarbeit und ihr Engagement bei der Etablierung hefegenetischer und zellbiologischer Methoden am Institut für Biotechnologie. Allen meinen derzeitigen Doktoranden und Mitarbeitern, Jörg Schäffner, Anke Rattenholl, Till Scheuermann, Frank Hillger, Heike Mitternacht und Christiane Harnisch danke ich für ihr Verständnis, wenn ich wieder einmal an meiner „Habil“ gesessen bin, Literatur gewälzt und ihre Anliegen zurückgestellt habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Partner, Rainer Rudolph, für die moralische Unterstützung bedanken, mich in dem magischen Dreieck, Kind-Karriere-Partnerschaft, zurechtzufinden.