

Elektrophysiologische Charakterisierung des Proteinimports an der inneren Mitochondrienmembran

von Dipl. Biol. Peter Alexander Kovermann

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
vorgelegte Dissertation

Osnabrück im Mai 2003

Diese Arbeit wurde am Fachbereich Biologie/Abteilung Biophysik an
der Universität Osnabrück angefertigt.

1	Einleitung	7
1.1	Proteinimport in Mitochondrien.....	8
1.2	Das Tom-Tim System.....	9
1.3	PRAT-Proteine.....	16
1.4	Elektrophysiologische Hinweise auf Proteinimport-Poren in der IMM.....	16
1.5	Aufgabenstellung.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Biochemische Methoden	18
2.1.1	Untersuchungsobjekte für die elektrophysiologische Charakterisierung.....	18
2.1.2	Aufreinigung von SIV-Lipid.....	19
2.1.3	Herstellung von SIV-Liposomen.....	20
2.1.4	Rekonstitution von Tim23 _{IMV} und tim23-2 _{IMV}	20
2.1.5	Rekonstitution von Tim23 _{rekom} , tim23-1 _{rekom} , tim23-2 _{rekom} , Tim23 _C , Tim23 _N , Tim22 _{rekom}	20
2.1.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
2.1.7	Färbung von SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue G-250.....	22
2.1.8	Silberfärbung.....	22
2.1.9	Diskontinuierliche Saccharosedichtegradientenzentrifugation.....	23
2.1.10	Aceton Fällung.....	23
2.1.11	Blaue native Polyacrylamid-Elektrophorese (BN-PAGE).....	24
2.1.12	Rekonstitution von TIM22-Komplexen.....	24
2.1.13	Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie.....	24
2.2	Multiple Alignments	26
2.2.1	FASTA Format.....	26
2.2.2	Suche nach sequenzähnlichen Proteinen mit PSI-BLAST.....	26
2.2.3	Swissprot und TrEMBL Datenbanken.....	27
2.2.4	Alignments mit ClustalW.....	27
2.3	Elektrophysiologie	29
2.3.1	Elektrophysiologische Messungen am planaren Bilayer.....	29
2.3.2	Messplatz.....	30
2.3.3	Messkammer.....	32
2.3.4	Septum und Bilayer.....	33
2.3.5	Perfusion.....	34
2.3.6	Elektroden.....	34
2.3.7	Kopfverstärker (<i>headstage</i>) und Hauptverstärker.....	35
2.3.8	AD/DA Wandler.....	37
2.3.9	Datenspeicherung.....	37
2.4	Elektrophysiologische Grundlagen	38
2.4.1	Vorzeichenkonvention am planaren Bilayer.....	38
2.4.2	Selektivität.....	38
2.4.3	Bi-ionische Messungen.....	40
2.4.4	Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit.....	41
2.4.5	<i>Dose-response</i> Funktionen.....	43
2.4.6	Messungen bei asymmetrischen Bedingungen.....	44
2.4.7	Messungen bei symmetrischen Bedingungen.....	44
2.4.8	Strom-Spannungsdiagramm (U~I Plot).....	44
2.4.9	Unterleitwerte.....	45
2.4.10	<i>Mean-Variance</i> -Darstellung.....	45
2.4.11	Der <i>cis/trans</i> -Effekt.....	47
2.4.12	Spannungsrampen.....	47
2.4.13	Schaltereignisse.....	48
2.4.14	Bestimmung der Porendurchmesser (nach Hille 1992).....	48
2.4.15	Bestimmung des Porenradius mit Hilfe der PEG-Methode.....	49
2.4.16	Auswertung der elektrophysiologischen Daten.....	50

2.4.17	Anpassung von Funktionen an die Messdaten	50
2.4.18	Signalpeptide.....	51
2.4.19	Peptidfragmente des Phosphat-Carriers aus der IMM.....	52
2.4.20	Verwendete Antikörper.....	53
2.5	Verwendete Geräte und Chemikalien	54
2.5.1	Messpuffersysteme für die Elektrophysiologie	55
2.5.2	Chemikalien.....	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Charakterisierung von Tim23.....	58
3.1.1	Biochemie	58
3.1.1.1	Isolation von Tim23 _{rekom}	58
3.1.1.2	Trennung von OMM und IMM.....	59
3.1.1.3	Isolation von Tim54 _{rekom} and Tim18 _{rekom}	60
3.1.2	Elektrophysiologische Messungen an Tim23 _{IMV} und Tim23 _{rekom}	60
3.1.2.1	Fusion von IMV-Vesikeln mit planaren Bilayern	60
3.1.2.2	Leitwerte und Schaltverhalten von Tim23 _{IMV}	60
3.1.2.3	Selektivität von Tim23 _{rekom} unnd Tim23 _{IMV}	62
3.1.2.4	Selektivität von Tim23 _{IMV}	63
3.1.2.5	Leitwerte und Schaltverhalten von Tim23 _{rekom}	63
3.1.2.6	Anzahl Poren von Tim23 _{rekom}	67
3.1.2.7	Offenwahrscheinlichkeit von Tim23 _{rekom}	67
3.1.2.8	Einfluss von pCytOxIV und SynB ₂ auf Tim23 _{rekom}	70
3.1.2.9	Einfluss von pCytOxIV auf Tim23 _{IMV}	72
3.1.2.10	Einfluss von b ₂ -ADHFR und P2 auf Tim23 _{rekom}	72
3.1.2.11	Porendurchmesser von Tim23 _{rekom}	75
3.1.2.12	Antikörper.....	76
3.2	Charakterisierung von Tim23_c.....	79
3.2.1	Biochemie	79
3.2.1.1	Isolation von Tim23 _C und Tim23 _N	79
3.2.2	Elektrophysiologische Messungen an Tim23 _c	80
3.2.2.1	Fusionsversuche mit Tim23 _N und Tim23 _c	80
3.2.2.2	Selektivität und Leitfähigkeit von Tim23 _C	80
3.2.2.3	Einfluss von pCytOxIV auf Tim23 _c	81
3.3	Charakterisierung von tim23-1 und tim23-2	83
3.3.1	Biochemie	83
3.3.1.1	Isolation von tim23-1 (G186D).....	83
3.3.1.2	Isolation von tim23-2 (G112E).....	83
3.3.1.3	Destabilisierung des 90 kDa-Komplexes bei tim23-2 (G112E)	83
3.3.2	Elektrophysiologische Messungen an tim23-1 _{rekom}	85
3.3.2.1	Selektivität und Leitfähigkeit von tim23-1 _{rekom}	85
3.3.2.2	Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von tim23-1 _{rekom}	86
3.3.2.3	Einfluss von pCytOxIV auf tim23-1 _{rekom}	86
3.3.3	Elektrophysiologische Messungen an tim23-2.....	87
3.3.3.1	Leitfähigkeit und Selektivität von tim23-2 _{rekom}	87
3.3.3.2	Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von tim23-2 _{rekom}	87

3.3.3.3	Einfluss von pCytOxIV auf <i>tim23-2_{rekom}</i> und <i>tim23-2_{IMV}</i>	87
3.4	Charakterisierung von Tim22_{rekom}	90
3.4.1	Biochemie	90
3.4.1.1	Isolation von Tim22 _{rekom}	90
3.4.2	Elektrophysiologische Messungen an Tim22 _{rekom}	90
3.4.2.1	Identifizierung des porenbildenden Kernproteins	90
3.4.2.2	Isolation von Tim9 _{rekom} , Tim10 _{rekom}	91
3.4.2.3	Fusionstests (Tim9, 10, 18, 22 und Tim54)	91
3.4.2.4	Selektivität von Tim22 _{rekom}	91
3.4.2.5	Schaltverhalten und Leitfähigkeit von Tim22 _{rekom}	91
3.4.2.6	Offenwahrscheinlichkeit und Spannungsaktivierung von Tim22 _{rekom}	92
3.4.2.7	Tim22 _{rekom} zeigt eine seitenabhängige Zugänglichkeit für Peptide	95
3.4.2.8	Anzahl Poren von Tim22 _{rekom}	96
3.4.2.9	Porendurchmesser von Tim22 _{rekom}	97
3.4.2.10	Einfluss von P1, P2, P3, P4 auf Tim22 _{rekom}	99
3.5	Multiple Alignments P2	104
3.6	Charakterisierung des TIM22-Komplexes	107
3.6.1	Biochemie	107
3.6.1.1	Isolation des TIM22-Komplexes	107
3.6.1.2	Insertion von Carriern durch den TIM22-Komplex	109
3.6.1.3	Elektronenmikroskopie am isolierten TIM22-Komplex	112
3.6.2	Elektrophysiologische Messungen am TIM22-Komplex	114
3.6.2.1	Fusionstests mit dem TIM22-Komplex	114
3.6.2.2	Leitfähigkeit vom TIM22-Komplex	114
3.6.2.3	Selektivität des TIM22-Komplexes	117
3.6.2.4	Einfluss von P2 auf den TIM22-Komplex	117
4	Diskussion	120
4.1	Kanalbildung durch Tim22 und Tim23	120
4.2	Elektrophysiologie	123
4.2.1	Selektivitätseigenschaften der untersuchten PRAT-Proteine	123
4.2.2	Leitwerte der in dieser Arbeit charakterisierten Kanäle	128
4.2.3	Offenwahrscheinlichkeit und Spannungsaktivierung	131
4.2.4	Porendurchmesser von Tim23 _{rekom} und Tim22 _{rekom}	134
4.2.4.1	Berechnung der Porengröße aus dem Leitwert	134
4.2.4.2	Bestimmung der Porengröße mit Hilfe der PEG-Methode	136
4.2.5	Einfluss von Präsequenzpeptiden auf die untersuchten Kanäle	137
5	Zusammenfassung	147
6	Anhang	1496
6.1	Abkürzungsverzeichnis	1496
6.2	Abbildungsverzeichnis	152
6.3	Tabellenverzeichnis	154
6.4	Literaturverzeichnis	155
6.4.1	Publikationen:	173

6.5	Danksagung	174
6.6	Eidesstattliche Versicherung.....	175

1 Einleitung

Mitochondrien leiten sich von nicht-pigmentierten aeroben Prokaryonten her, die erst sekundär von Eukaryonten (Progenoten) endocytiert wurden (Margulis, 1970; Gray *et al.*, 1988). Diese primären *höheren* Zellen übernahmen biochemische Stoffkreisläufe dieser Endosymbionten zur Optimierung ihrer eigenen Vitalfunktionen. Obwohl in Laufe der weiteren Evolution 96% des ursprünglichen Genoms der mitochondrialen Vorläufer in den Zellkern konvertiert wurden, verfügen sie, wie die Plastiden, weiterhin über eigenes genetisches Material und durchlaufen einen eigenen Replikationszyklus.

Wie die Chloroplasten verfügen auch Mitochondrien über eine „Äußere Membran“ (OMM, *outer mitochondrial membrane*), und über eine stark gefaltete „Innere Membran“ (IMM, *inner mitochondrial membrane*), die die mitochondriale Matrix vom Intermembranraum (IMS, *intermembrane space*) trennt und die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung sowie die ATP-Synthase beinhaltet. Daher gelten Mitochondrien als die „Kraftwerke“ der eukaryotischen Zelle, denn in ihrer Matrix laufen die Hauptenergie- und Metabolit erzeugenden Zellstoffwechselprozesse ab. Die mitochondrialen Membranen sind von einer Vielzahl von integralen Proteinen durchsetzt, die die Verbindung der mitochondrialen Matrix mit dem IMS und dem Cytosol gewährleisten. Diese Proteine stellen Transportsysteme dar, mit denen Energieäquivalente und Substrate, wie ATP (Adenosin-Tri-Phosphat), Aminosäuren, Ketosäuren und Kohlenhydrate über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden. Alle diese Transportsysteme aus der inneren Mitochondrienmembran werden zur mitochondrialen Carrier Familie (MCF) gezählt (Palmieri *et al.*, 1994 und 1996; Nelson *et al.*, 1998). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 37 Mitglieder dieser Proteinfamilie aus verschiedenen Organismen isoliert werden. Im speziellen Fall der Hefe (*S. cerevisiae*) konnten 32 Proteine der mitochondrialen Carrier Familie identifiziert werden (El Moulidj *et al.*, 1997, Nelson *et al.*, 1998). Allen Proteinen der mitochondrialen Carrierfamilie gemeinsam ist (1) eine dimere Struktur mit je einer dreigeteilten Sequenz von je etwa 100 Aminosäuren, von denen jede zwei Transmembrandurchgänge ausbildet, und (2) die fünffache Wiederholung eines typischen mitochondrialen Carrier Sequenz-Motivs [(D/E)xh(K/R), mit h=hydrophobe Aminosäure und x=beliebige Aminosäure] (Kuan und Saier, 1993a, b).

1.1 Proteinimport in Mitochondrien

Obwohl Mitochondrien über eigenes genetisches Material verfügen, sind sie nicht unabhängig von ihrer Wirtszelle, da eine Vielzahl von mitochondrialen Proteinen im Verlauf der Evolution zur Zellkernkodierung übergewechselt sind. Aus diesem Grund ist der Reimport von Proteinen, wie z.B. der Translokator-Isoformen $AAC_1 \rightarrow AAC_3$ aus dem Cytosol in die innere Mitochondrienmembran essenziell für den Organellstoffwechsel. Sowohl der Proteinimport in die mitochondriale Matrix, als auch die Proteininsertion in die Innere Membran ist abhängig vom Vorhandensein eines Membranpotenzials ϕ_{mem} und wird über spezifische **Signalsequenzen** am Präprotein gesteuert (Endres *et al.*, 1999, Bauer *et al.*, 2000). Dabei unterscheidet man verschiedene Typen von Signalsequenzen:

- (1) **Präproteine mit einer N-terminalen Signalsequenz**, deren Bestimmungsort die mitochondriale Matrix ist (Schatz und Dobberstein, 1996)

Diese Signalsequenzen sind untereinander nicht sequenzähnlich, aber sie besitzen alle eine analoge Ausstattung an Aminosäuren. Dabei besteht die Grundausrüstung aus 20-60 Aminosäureresten mit zahlreichen positiven Ladungen und Hydroxylseitenketten. Die Abundanz von negativen Ladungen wird über einen relativen Überschuss von positiven Ladungen ausgeglichen. Diese Peptide bilden in hydrophoben Umgebungen, wie Biomembranen, amphipatische α -Helices, während ihre strukturelle Organisation in wässriger Umgebung relativ ungeordnet vorliegt. Die Präsequenz der Cytochrom Oxidase Untereinheit IV wird durch das Peptid pCytOxIV gebildet. Diese Präsequenzen sind essenziell für die Translokation von mitochondrialen Proteinen, die cytosolisch synthetisiert und an den Ribosomen cotranslatiert werden. (Neupert, 1997)

- (2) **Präproteine mit internen hydrophoben Erkennungsregionen**, deren Bestimmungsort die Innere Mitochondrienmembran (IMM) ist (Pfanner *et al.*, 1987a, Davis *et al.*, 1988, 2000, Brix *et al.*, 2000, Endres *et al.*, 1999, Wiedemann *et al.*, 2001)

Dieser Typ von Signalsequenzen unterscheidet sich durch zwei wesentliche Merkmale von den vorher erwähnten Signalsequenzen. Zum Einen liegen diese Sequenzabschnitte nicht terminal sondern intern in der Sequenz und zum Anderen sind sie ladungsneutral. Integrale Rezeptorproteine in den Membranen der Zielorganellen binden diese Signalsequenzen und ermöglichen die Interaktion zwischen dem zu translozierenden Protein und der dazugehörigen Translokationspore (Lithgow *et al.*, 1995). Der Transport über die Membranen wird von hochmolekularen Translokationskomplexen in der „Inneren“ und der „Äusseren“ Membran ermöglicht (Pfanner *et al.*, 1992), die mit großer Wahrscheinlichkeit tandemartig einen Translokationskanal über die OMM und IMM bilden (Glick *et al.*, 1991).

1.2 Das Tom-Tim System

Der Import von cytosolisch synthetisierten Proteinen wird in Hefemitochondrien über das **Tom-Tim System** (*Translocase of the Outer/Inner Membrane*) gesteuert. Dieses System bildet zusammen mit Chaperonen einen Translokationskomplex. Es gibt zahlreiche gut belegte Beispiele für die Funktion der Chaperone beim Proteinimport. Das lumenale BiP Chaperon im ER der Hefe, leitet die Translokation von Proteinen über eine ATP-abhängige Interaktion des BiP mit dem integralen Sec63p ein. BiP wird sowohl bei der posttranslationalen, als auch bei der cotranslationalen Translokation benötigt (Pfeffer and Rothman, 1987). Bei Hefe-Mitochondrien werden die Proteine zunächst von cytosolischen Chaperonen zu membranständigen Rezeptoren in der OM geleitet (Kübrich *et al.*, 1995, Schatz und Dobberstein 1996, Neupert 1997). Der membranständige Rezeptor **Tom70** bindet Peptide mit einer internen Signalsequenz, während **Tom20** nur solche bindet, die eine N-terminale Präsequenz tragen. Beide Rezeptoren vermitteln die Interaktion der gebundenen Proteine mit der Translokationspore **Tom40**. Dieses Protein konstituiert einen Proteinkanal durch die OMM (Hill *et al.*, 1998). Enzyme mit einer N-terminalen Präsequenz werden im IMS zu einem integralen **Tim23/17** Komplex geleitet, über welchen die Translokation in die mitochondriale Matrix erfolgt (Maarse *et al.*, 1992, Pfanner *et al.*, 1997). **Tim23** ist ein integrales Membranprotein, das aus 4 transmembranen Strängen von bis dato unbekannter Sekundärstruktur und einer großen Extramembrandomäne besteht, die von Tim23 in den IMS exponiert wird (Dekker *et al.*, 1993). Sekundärstrukturvorhersagen zufolge reichen sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende von Tim23, Tim17 und Tim22 in den IMS. Das

aminoterminal Ende von Tim23 trägt eine Leucin Zipper-Domäne. Die Funktion dieses Sequenzabschnittes wird noch diskutiert. Sie könnte der Dimerisierung von einzelnen Tim23-Monomeren, der Erkennung von Rezeptorproteinen oder der Bindung von Transitpeptiden dienen (Dekker *et al.*, 1993, Pfanner *et al.*, 1997). Gegenwärtig wird angenommen, dass Tim23 und Tim17 jeweils Untereinheiten einer Importpore durch die IMM konstituieren (Pfanner *et al.*, 1994).

```

                10         20         30         40         50         60
Tim23_Yeast    MSWLFGDKTPTDDANAAVGGQDTTKPKELSLKQSLGFEPNINNIISGPGGMHVDTARLHP
Tim23.2_Yeast  MSWLFGDKTPTDDANAAVGGQDTTKPKELSLKQSLGFEPNINNIISGPGGMHVDTARLHP
Tim23.1_Yeast  MSWLFGDKTPTDDANAAVGGQDTTKPKELSLKQSLGFEPNINNIISGPGGMHVDTARLHP
                *****

                70         80         90         100        110        120
Tim23_Yeast    LAGLDKGV EYLDLEEEQLSSLEGSQGLIPSRGWTDLDCYGTGAVYLLGLGIGGFSGMMQG
Tim23.2_Yeast  LAGLDKGV EYLDLEEEQLSSLEGSQGLIPSRGWTDLDCYGTGAVYLLGLGIGEFSGMMQG
Tim23.1_Yeast  LAGLDKGV EYLDLEEEQLSSLEGSQGLIPSRGWTDLDCYGTGAVYLLGLGIGGFSGMMQG
                *****

                130        140        150        160        170        180
Tim23_Yeast    LQNI PPNSPGKLQLNTVLNHITKRGPF LGNNAGILALS YNI INSTIDALRGKHDTAGS I G
Tim23.2_Yeast  LQNI PPNSPGKLQLNTVLNHITKRGPF LGNNAGILALS YNI INSTIDALRGKHDTAGS I G
Tim23.1_Yeast  LQNI PPNSPGKLQLNTVLNHITKRGPF LGNNAGILALS YNI INSTIDALRGKHDTAGS I G
                *****

                190        200        210        220
Tim23_Yeast    AGALTGALFKSSKGLKPMGYSSAMVAAACAVWCSVKKR LLEK
Tim23.2_Yeast  AGALTGALFKSSKGLKPMGYSSAMVAAACAVWCSVKKR LLEK
Tim23.1_Yeast  AGALTDALFKSSKGLKPMGYSSAMVAAACAVWCSVKKR LLEK
                *****

```

Abbildung 1.1: ClustalW-Alignment von Hefe Tim23 mit den Mutanten *tim23-1* (G186D) und *tim23-2* (G112E).

Dargestellt ist ein *multiple Alignment* von Tim23 (Yeast) mit den Mutanten *tim23-1* (Yeast) und *tim23-2* (Yeast). Die Aminosäuresubstitutionen sind, zur deutlicheren Darstellung, farbig markiert.

Die Mutanten *tim23-1* und *tim23-2* (Sequenz, siehe **Abbildung 1.1**) wurden durch Mutagenese erzeugt um essenzielle funktionelle Reste im TIM23-17-Komplex zu identifizieren. *tim23-2* (G112E) ist nicht mehr in der Lage einen stabilen Komplex mit Tim17 zu bilden und zeigt einen inhibierten Import von mitochondrialen Matrixproteinen mit einer spaltbaren Präsequenz (Maarse *et al.*, 1992, Dekker *et al.*, 1993, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass der Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix bei *tim23-1*-Mutanten (G186D) defekt ist (Emtage und Jensen, 1993). Weiter stellte man fest, dass Mitoplasten mit der *tim23-1*-Substitution eine geringere Spezifität gegenüber Präsequenzpeptiden besitzen.

Elektrophysiologische Messungen an in Riesenliposomen rekonstituierten Mitoplastenproteinen haben dann weiter ergeben, dass der MCC bei Mitoplasten mit der *tim23-1*-Mutation durch die Zugabe von Präpeptiden wie pCytOxIV₍₁₋₁₃₎ nicht blockiert wird (Lohret *et al.*, 1997).

Tim50 ist das erste Protein, das trotz seiner Zugehörigkeit zum Tim23-17 Komplex zwischen Matrix und IMM Proteinen unterscheidet. Es besteht aus 476 Aminosäuren (55.1 kDa) mit einem hydrophoben Segment (Reste 112-132), welches lang genug ist, um als Membrananker zu dienen. Der N-Terminus von Tim50 weist mit einem erhöhten Anteil an positiven und hydroxylierten Resten und einer amphipatischen Struktur die Charakteristika einer mitochondrialen Zielsequenz auf (Geissler *et al.*, 2002).

Der mittlere Bereich (Reste: 165-344) weist Homologien zu CDP-Phosphatasen auf (Sinossoglou *et al.*, 2000), zeigt aber selbst keine Phosphatase-Aktivität, da die eigentlichen phosphataseaktiven Reste [DXDX(T/V)] fehlen. Strukturvorhersagen für den C-Terminus (Reste: 133-476) ergeben eine in den IMS reichende *coiled-coil* Struktur. Der C-Terminus im IMS interagiert mit der IMS-Domäne von Tim23 (Geissler *et al.*, 2002). Zusätzlich gibt es noch eine mit Prolin angereicherte Region (Reste: 174-191). Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Tim50 am mitochondrialen Proteinimport über den Tim23/17 Komplex beteiligt ist (Geissler *et al.*, 2002):

- (a) F_{ab}-Antikörper gegen die IMS Domäne von Tim50 inhibieren den Proteinimport von mitochondrialen Matrixproteinen.
- (b) Tim50 ist der funktionalen Präsequenz Translokase vorhanden und kann mit Präproteinen während der Translokation vernetzt werden.
- (c) Deletion des Gens für Tim50 führt zu einer starken Inhibierung des Imports von Matrixproteinen.

Tim50 hat unterschiedlich starken Einfluss auf den Import von Matrixproteinen und IMM bzw. IMS Proteinen. Während der Import von Matrixproteinen bei Δ Tim50 fast vollständig inhibiert wird, bleibt der Import von IMM- und IMS-Proteinen durch die Deletion fast unbeeinflusst.

Proteine mit einer internen Signalsequenz werden im IMS von sich frei in Lösung befindlichen Erkennungsproteinen **Tim10** und **Tim12** (Translocase of the Inner Membrane) gebunden, wobei die Wechselwirkung zwischen dem Präprotein und einem membranständigen **Tim 22/54** Komplex vermittelt wird.

Tim22 ist wie Tim23 und Tim17 ein integrales Membranprotein mit 208 Aminosäuren (*S. cerevisiae*) aus der inneren Mitochondrienmembran und bildet mit anderen Oligomeren (siehe unten) einen 300 kDa-Komplex. Wie Tim23 besitzt es vier transmembrane Durchgänge mit bis dato unbekannter Sekundärstruktur, aber keine N-terminale IMS-Domäne wie das homologe Tim23. Dieser oligomere Komplex integriert Membranproteine in die IMM. Der Import von Carrierproteinen durch den Tim22-Komplex ist zum Einen abhängig vom Vorhandensein eines Membranpotenzials ϕ_{mem} , wobei die Funktion des Membranpotenzials bei der Insertion von polytopischen Membranproteinen noch nicht klar ist, und zum Anderen von ungeladenen hydrophoben Abschnitten in der Sequenz des zu inserierenden Carrierproteins (Endres *et al.*, 1999). Derartige Segmente wurden in einer Reihe von mitochondrialen Carrierproteinen, wie AAC1, AAC2, AAC3, OAC1, MRS3, YMC166 und DIC1 gefunden. Diese Carrier besitzen alle kurze hydroxylierte und hydrophobe Abschnitte mit einem konservierten Glyzin an gleicher Stelle in der Sequenz. Diese Abschnitte stellen *targeting*-Sequenzen für mitochondriale Carrierproteine dar (Nelson *et al.*, 1998). Tim22 liegt komplexiert mit **Tim54** vor. Tim54 ist ein polytopisches Protein in der mitochondrialen Innenmembran, und dient zur Stabilisierung des Tim22-Komplexes. Es ist nicht direkt am Import beteiligt, fungiert aber als Stabilisator für den Insertionskomplex während des Insertionsprozesses (Kerscher *et al.*, 1997).

Die Proteine **Tim10** und **Tim12** besitzen jeweils ein Zink-Finger-Motiv aus vier Cysteinen mit einem komplexierten Zinkion. Zn^{2+} gilt als essenziell für die Struktur und Funktion von Tim10 und Tim12. Zinkfinger Motive sind im allgemeinen bekannt als DNA-Bindemotive und als Motive in Transkriptionsfaktoren und dienen hier der Bindung von ungefalteten Peptidketten. Sie üben eine chaperonartige Funktion aus und geleiten IMM Proteine zum membranständigen Tim22/54 Komplex (Koehler *et al.*, 1999). Es kann gezeigt werden, dass Tim22 essenziell für die membranpotenzialabhängige Insertion von Proteinen der AAC (ADP/ATP Carrier) Familie in die IMM ist (Sirrenberg *et al.*, 1996). Am Tim22/54 Komplex

findet die $\Delta\psi$ abhängige Inkorporation von IMM Proteinen in die innere Mitochondrienmembran statt (Szabo *et al.*, 1996, Pfanner 1998).

Nach der *acid-chain-hypothesis* binden Präcursorproteine nacheinander an negativ geladene Seitenketten von integralen Rezeptorproteinen, die in den IMS (IMM) und ins Cytosol (OMM) reichen, und werden so zur äußeren und danach zur inneren Translokationspore geleitet. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von Precursor-Proteinen mit den Seitenketten einem Gradienten steigender Bindungsaffinität (Tom20 <Tom22 <Tim23) folgt (Komiya *et al.*, 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Präcursor-Proteine, die für die OM bestimmt sind, nur an Tom20 binden. Präcursor, die für die Insertion in die IMM bestimmt sind, binden an Tom20, und Tom22, nicht aber an Tim23. Demnach nehmen Präcursor an einer intramitochondrialen Sortierung teil, die den Transfer von Proteinen zu ihrem Bestimmungsort gewährleistet (Sirrenberg *et al.*, 1996). Ein mitochondriales Chaperon ist essenziell für die Bewegung von Polypeptidketten durch die Translokationspore. Das Chaperon **mtHsp70 (mitochondriales heatshockprotein, 70 kDa)** gilt als das Protein, das für den unidirektionalen Import von Präcursor-Proteinen verantwortlich ist (Schneider, *et al.*, 1994). MtHsp70 beeinflusst zum Einen die Faltung neu importierter Proteine (Horst *et al.*, 1996), und zum Anderen besteht seine Hauptfunktion im Transport von Vorläuferproteinen über die IMM. Bei Mitochondrien gibt es zahlreiche Evidenzen für eine Teilnahme eines Hsp70 Chaperons an der Translokation. Mitochondrien, die aus temperatursensitiven mtHsp70 Mutanten isoliert wurden, zeigten einen defekten Proteinimport (Kang *et al.*, 1990). Im weiteren wurde gezeigt, dass Präcursor während der Translokation mit mtHsp70 assoziiert sind (Scherer *et al.*, 1990; Ostermann *et al.*, 1990). Entzieht man Mitochondrien ATP und solubilisiert sie anschließend, so liegt das mitochondriale mtHsp70 zu 10-15% im Komplex mit Tim44 vor (Schneider *et al.*, 1994). Tim44 durchspannt die Membran und bildet wahrscheinlich einen integralen Anker für ein mtHsp70 Chaperon. Die Funktion des mtHsp70 ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Zur Zeit werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Ein Modell besagt, dass das Chaperon in Form einer molekularen Sperrklinke (engl.: *ratchet*) die Brownsche Molekularbewegung von Präcursorproteinen innerhalb der Pore unidirektional ausrichtet. Man geht davon aus, dass Vorstufenproteine in der Pore ein- und auswärts oszillieren. Wird der Präcursor in der Matrix von einem mtHsp70 gebunden, so ist seine Oszillation in Auswärtsrichtung gehemmt. Eine rasch aufeinander folgende Serie derartiger

Bindungen würde einen Import des gebundenen Präcursors nach sich ziehen. **Tim44** könnte zugleich als Membrananker und als Vermittler von Bindungen zwischen Präcursorproteinen und Chaperonen dienen. Die Hypothese von der „*Brownian ratchet*“ wird durch den Befund gestützt, dass Präcursor sich innerhalb der Importpore vorwärts und rückwärts bewegen können. Andererseits haben mathematische Analysen gezeigt, dass ein derartiger Vorgang einen Import innerhalb von Millisekunden zur Folge hätte. Tatsächlich dauert der Import aber mehrere Minuten (Ungermann *et al.*, 1996).

Eine weitere Hypothese postuliert einen durch das mtHsp70 gebildeten ATP-abhängigen Translokationsmotor, der den Präcursor über eine Abfolge von molekularen Kraftschlägen durch die Pore zieht. In Analogie zum Transport von Actin Filamenten mit Hilfe von Myosin und ATP rührt der Kraftschlag von einer ATP-abhängigen Konformationsänderung des mtHsp70 her (Horst *et al.*, 1996). Die Initiation der Bindung des mtHsp70 an den Präcursor geschieht mit der lockeren und reversiblen Bindung von mtHsp70 an Tim44 und an den in die Matrix eintretenden Präcursor. Das ATP wird anschließend vom mtHsp70 zu ADP hydrolysiert. Der entstandene ADP-mtHsp70 Komplex bindet dann fest an Tim44. Das ADP-mtHsp70 durchläuft dann eine Konformationsänderung, bei der die Präcursor weiter in die Matrix gezogen werden. Im Anschluss bindet das Co-Chaperon MGE an das mtHsp70 und bewirkt die Dissoziation von ADP, das dann durch ATP ersetzt wird. (Neupert, 1997).

Der Import von Proteinen ist abhängig vom Vorhandensein eines **Membranpotenzials** ϕ_{mem} . Zum Einen übt das Membranpotenzial einen Einfluss auf den zu translozierenden Präcursor aus, indem es ihn entfaltet (Huang *et al.*, 2002), und zum Anderen dient das Membranpotenzial ϕ_{mem} zur Aktivierung des Tim23-Importapparates (Geissler *et al.*, 2000). Des weiteren könnte die Spannung über der Membran weitere mögliche Funktionen besitzen: Sie könnte die Initiation der Translokation dadurch ermöglichen, dass sie die Peptide weit genug in die Pore treibt, um sie in den Einflussbereich des mtHsp70 zu befördern und dort ausreichend lange zu halten. Im Anschluss an den Import werden die Präsequenzen der Präcursor von der **mitochondrial matrix processing peptidase** (MPP) vom neu importierten Protein abgespalten. Danach kann das Protein seine funktionelle Konformation annehmen (Pfanner *et al.*, 1997).

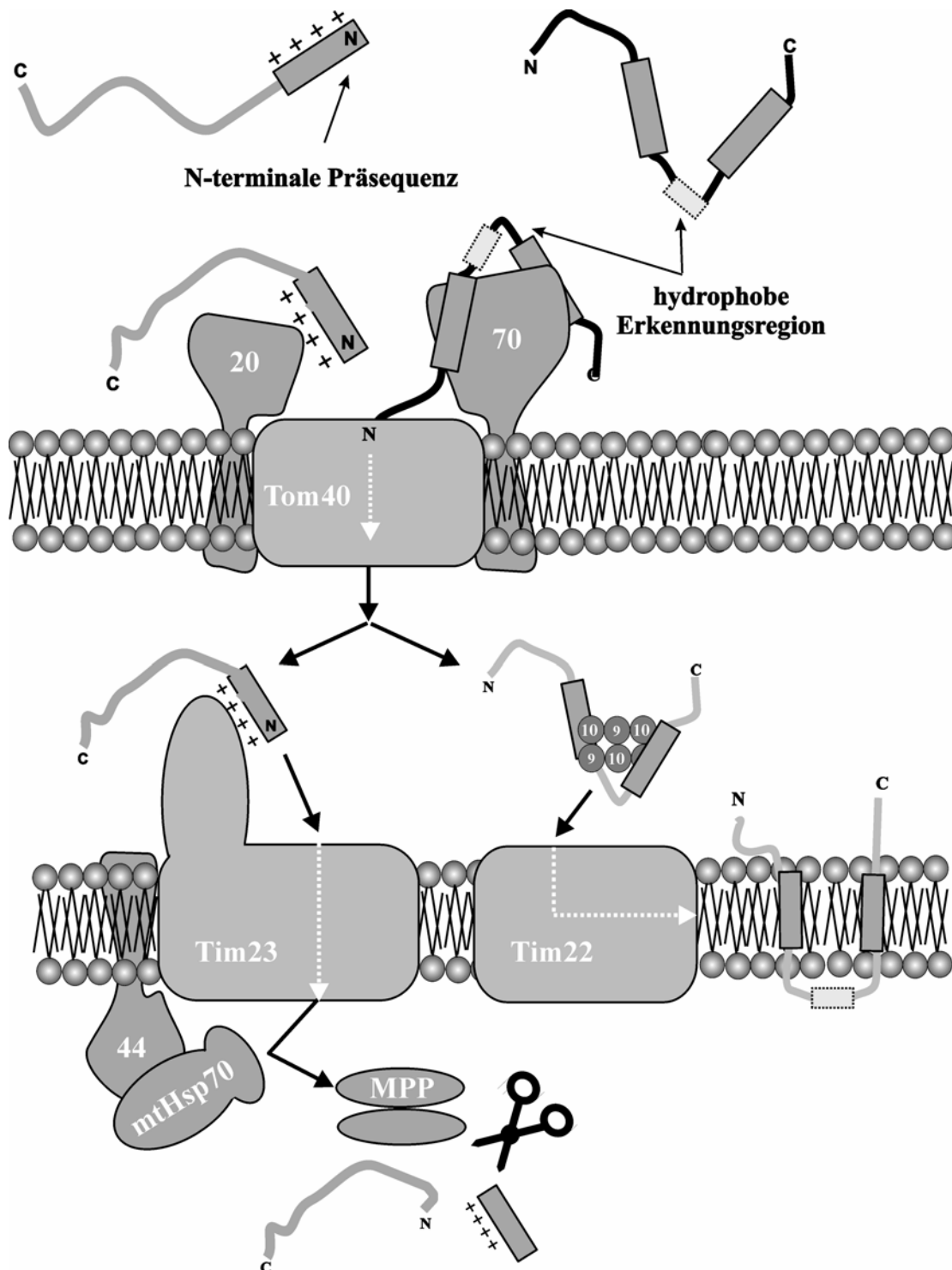


Abbildung 1.2: Modell des mitochondrialen Imports von Matrix- und von Carrierproteinen über die OMM und in/durch die IMM bei Hefe (*S. cerevisiae*, näheres: siehe Einleitung, Seite 2ff-Das Tom-Tim System).

1.3 PRAT-Proteine

Tim23 zeigt Homologien zu den Tim-Proteinen **Tim17**, **Tim22**, **OEP16** (OCE) und eine leichte Sequenzähnlichkeit zur Aminosäure-Permease **LivH** aus *E. coli*. Sowohl die Tim-, OEP-, als auch die LivH-Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Aminosäuren und Peptiden (Rassow *et al.*, 1999, Pohlmeier *et al.*, 1997, Nazos *et al.*, 1986). **Abbildung 1.3** zeigt ein Alignment von Tim23 (Accession No.#P32897), Tim22 (Accession No.#Q12328), Tim17 (Accession No.# P39515) und OEP16_{seed} (Accession No.# NP_567488).

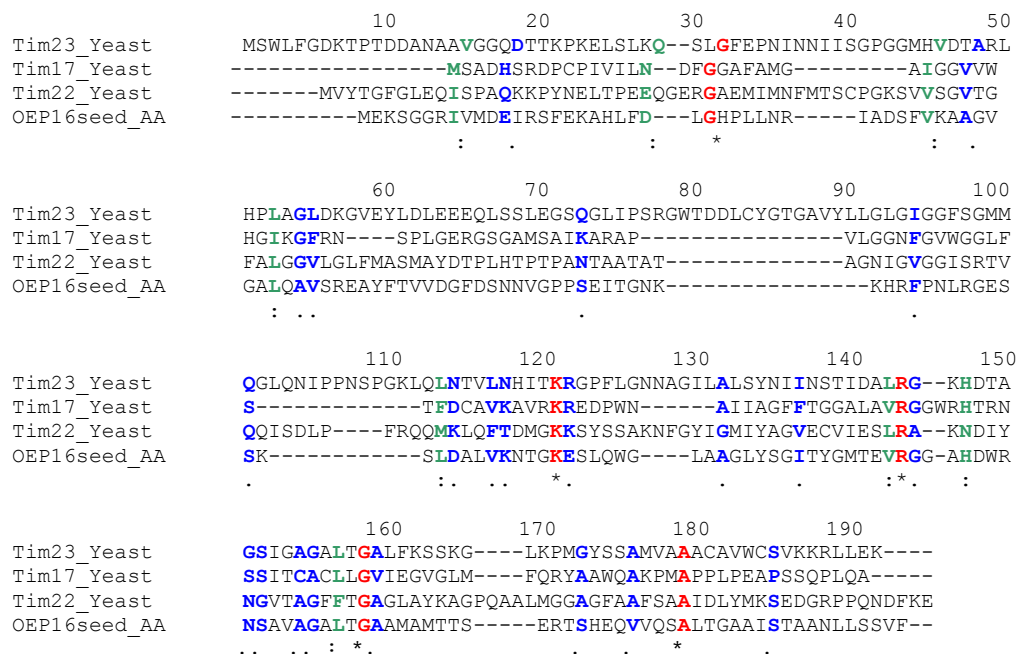


Abbildung 1.3: ClustalW-Alignment der in dieser Arbeit charakterisierten PRAT-Proteine:

Tim23 (*S. cerevisiae* Accession No.#P32897), Tim17 (*S. cerevisiae* Accession No.#P39515), Tim22 (*S. cerevisiae* Accession No.#Q12328) und OEP16_{seed} (*A. thaliana*, Accession No.# NP_567488) unter Zuhilfenahme der GONNET-Matrix (Gonnet *et al.*, 1992, siehe auch Material und Methoden). Identische Reste sind **rot** dargestellt, einander homologe Aminosäuren sind **grün** dargestellt und konservative Austausche sind **blau** gekennzeichnet.

1.4 Elektrophysiologische Hinweise auf Proteinimport-Poren in der IMM

Der mitochondriale *Multiple Conductance Channel* (MCC) gilt als die proteinimportierende Pore in der IMM (Kinally *et al.*, 1989) Der MCC ist ein leicht kationenselektiver Kanal (ohne

weitere Angabe) mit multiplen Leitwerten im Bereich von 40 pS bis in Ausnahmen zu 2 nS (Lohret *et al.*, 1995). In Hefe zeigt der MCC überwiegend Schaltamplituden im Bereich von 300-600 pS. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Tim23 für die Aktivität des MCC essenziell ist. *tim23-1*-Mutanten zeigen Störungen in ihrem Präproteintransport. (Lohret *et al.*, 1997) Weiterhin inhibieren Antikörper gegen Tim23 den Proteinimport über die IMM (Emtage und Jensen, 1993, Ryan *et al.*, 1994). Die Aktivität des MCC ist Ca^{2+} abhängig und wird durch hohe Spannungen (>60 mV) induziert (Kinally *et al.*, 1989). *Patch-Clamp* Experimente haben gezeigt, dass der MCC sensitiv gegenüber Transitpeptiden von mitochondrialen Matrixproteinen ist (Lohret *et al.*, 1995).

1.5 Aufgabenstellung

Aufgabe war diejenige Protein in der IMM zu identifizieren die die Translokationspore für Matrixproteine und die Insertionspore für Carrier konstituieren, sowie deren prinzipiellen Poreneigenschaften zu charakterisieren. Vergleichend sollte geprüft werden, ob in IMM-Vesikeln eine zu Tim23 vergleichbare Ionenkanalaktivität gefunden werden kann. Zu diesem Zweck standen IMM-Vesikel (*S. cerevisiae*) mit dem Wildtyp von Tim23 und mit den Mutanten *tim23-1* und *tim23-2*, sowie rekombinantes Tim23, *tim23-1*, *tim23-2* und Tim22 zur Verfügung. Die elektrophysiologischen Eigenschaften von rekombinantem Tim22 sollen dann mit den Charakteristika des nativen TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae* verglichen werden. Mit Hilfe von spezifischen und unspezifischen Kanalblockern sollen die Vorgänge beim Proteinimport und der Insertion von polytopischen Membranproteinen elektrophysiologisch näher charakterisiert werden. Im weiteren soll mit elektrophysiologischen Methoden untersucht werden, ob und in welcher Weise der Import und die Insertion von Proteinen abhängig sind vom Membranpotenzial ϕ_{mem} .

2 Material und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

Die Kapitel 2.1.1, 2.1.11 und 2.1.13 dargestellten Methoden wurden nicht von mir selbst, sondern von den bezeichneten Personen im Rahmen der mit den jeweiligen Arbeitsgruppen bestehenden Kooperationen durchgeführt.

2.1.1 Untersuchungsobjekte für die elektrophysiologische Charakterisierung

- **Rekombinantes Wildtyp-Tim23** aus *Saccharomyces cerevisiae* (im folgenden **Tim23_{rekom}**) besteht aus 222 Aminosäuren mit 10er His-tag, wurde in *E. coli* überexprimiert und aus „inclusionbodies“ mit einer NiNTA aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **Rekombinantes tim23-1** aus *Saccharomyces cerevisiae* (im folgenden **tim23-1_{rekom}**) besteht aus 222 Aminosäuren mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution (G186D) mit 10er His-tag, wurde in *E. coli* überexprimiert und aus „Inclusionbodies“ mit einer NiNTA aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **Rekombinantes tim23-2** (aus *Saccharomyces cerevisiae* (im folgenden **tim23-2_{rekom}**) besteht aus 222 Aminosäuren mit 10er His-tag, und einer einzelnen Aminosäuresubstitution (G112E) wurde in *E. coli* überexprimiert und aus „Inclusionbodies“ mit einer NiNTA aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **Tim23 Δ C**, eine in *E. coli* überexprimierte Tim23 Mutante mit deletiertem C-Terminus (die Aminosäurenreste 97 bis 222 fehlen, im folgenden **Tim23_N**). Tim23_N wurde wie der Wildtyp heterolog in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **Tim23 Δ N**, eine in *E. coli* überexprimierte Tim23-Mutante mit deletiertem N-Terminus (die Aminosäurenreste 1 bis 96 fehlen, im folgenden **Tim23_C**). Tim23_C wurde wie der Wildtyp heterolog in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **Wildtyp-Tim23** aus mitochondrialen Innenmembranvesikeln (IMV) (*Saccharomyces cerevisiae*) (im folgenden **Tim23_{IMV}**) besteht aus 222 Aminosäuren. Die IMV wurden

durch Trennung von OMM und IMM über Saccharosedichtegradientenzentrifugation gewonnen (siehe Truscott *et al.*, 2001).

- **Wildtyp-*tim23-2*** aus mitochondrialen Innenmembranvesikeln (IMV) (*Saccharomyces cerevisiae*) (im folgenden ***tim23-2_{IMV}***) besteht aus 222 Aminosäuren. Die IMV wurden durch Trennung von OMM und IMM über Saccharosedichtegradientenzentrifugation gewonnen (siehe Truscott *et al.*, 2001).
- **Rekombinantes Wildtyp-Tim22** aus *Saccharomyces cerevisiae* (im folgenden **Tim22_{rekom}**) besteht aus 202 Aminosäuren mit 10er His-tag, wurde in *E. coli* überexprimiert und aus „inclusion bodies“ mit einer NiNTA aufgereinigt (Truscott *et al.*, 2001).
- **TIM22-Komplex** aus mitochondrialen Innenmembranvesikeln (IMV) hat ein Molekulargewicht von ~300 kDa (*Saccharomyces cerevisiae*, im folgenden **TIM22-Komplex**). Der Komplex wurde aufgereinigt nach Rehling 2003, siehe auch 3.6.

2.1.2 Aufreinigung von SIV-Lipid

Azolectin (SIV-Lipid) wird zunächst mit Hilfe von Ultraschall (Branson Microtip Sonifier, 40% Puls, 50% duty cycle) in 10 mM Tricine/KOH pH 8.2 gelöst. Danach wird die Liposomensuspension mit dem 6-fachen Volumen MetOH/Chl (2:1) aufgefüllt. Die resultierende klare Lösung wird dann im Scheidetrichter gegen 1/3 Volumen 1 M KCl, 0.2M H₃PO₄ ausgeschüttelt und die passive Phasentrennung abgewartet. Nach der Phasentrennung wird die Lipidphase von der Wasserphase aktiv getrennt und der pH der Liposomensuspension mit KOH auf pH 8 eingestellt. Dann wird die Suspension wieder mit dem 6-fachen Volumen MetOH/Chl (2:1) versetzt und noch einmal gegen 1/3 Volumen 1 M KCl, 0,2 M H₃PO₄ ausgeschüttelt.

Im Anschluss wird dann die Suspension unter Vakuum-Einfluss eingedampft und das entstehende feste Lipid in Puffer (10 mM MOPS/Tris pH 7.0) gelöst. Um die Salzkonzentration in den Liposomen einzustellen wird die Liposomensuspension 2 h gegen 1000 ml 10 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7,0 dialysiert.

2.1.3 Herstellung von SIV-Liposomen

Die Rekonstitution von Membranproteinen wurde mit L- α -Phosphatidylcholin (SIV-S Lipid, Sigma, *soybean*) durchgeführt. Frühere Experimente haben gezeigt, dass es für die funktionelle Rekonstitution von Ionenkanälen geeignet ist (Enz *et al.*, 1993, Heiber *et al.* 1995).

Die Gewinnung unilamellarer Liposomen (ULV) wurde nach News (1990) durchgeführt. So wurde das Lipid ($50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) zunächst in 10 mM MOPS/Tris pH 6.9 gelöst, und dann 10 min mit einem Microtip (*Branson Sonifier: Cell Disruptor B 15*) bei 40% der maximalen Leistung beschallt. Während der durch Ultraschall induzierten Bildung von unilamellären Liposomen wurde die Emulsion stets unter Argon gehalten, und im Eisbad gekühlt. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotierung und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.1.4 Rekonstitution von Tim23_{IMV} und *tim23-2*_{IMV}

Die direkte Fusion von **InnenMembranVesikeln** (IMV) aus Mitochondrien mit dem planaren *Bilayer* erwies sich als ungeeignet zur elektrophysiologischen Charakterisierung. Es konnte keine reproduzierbare Kanalaktivität identifiziert werden. Dies lag daran, dass osmotische Fusionen der IMV mit dem planaren *Bilayer* nicht stattfanden. Um die osmotische Fusion von Membranproteinen zu erleichtern wurden die IMV-Proben mit SIV-Liposomen (Sigma) im Verhältnis 1:1 versetzt und bei ausreichender Kühlung 10 min im Ultraschallbad beschallt. Nach Beschallung im Ultraschallbad wurden die Proben 3 bis 4 mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und langsam aufgetaut. Nach dieser Behandlung wurden die Proben direkt für die Messung verwendet oder bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.5 Rekonstitution von Tim23_{rekom}, *tim23-1*_{rekom}, *tim23-2*_{rekom}, Tim23_C, Tim23_N, Tim22_{rekom}

Tim23_{rekom} (sowie *tim23-1*_{rekom}, *tim23-2*_{rekom}, Tim23_{C,N}, und Tim22_{rekom}) lag in Konzentrationen von $0,5\text{-}5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 6 M Urea, 10 mM Tris/HCl pH 4.5 vor. Das Detergens Mega9 (Nonaoyl-N-Methylglucamid) besitzt eine hohe CMC (*critical micellar*

concentration) von 18 mM und daher problemlos durch Dialyse zu entfernen (Neugebauer, 1997).

Das Protein/Lipid Verhältnis wurde auf 1:10 eingestellt und die Proben mit 80 mM Mega9 für 10 min versetzt. Anschließend wurden die Proben 120 min gegen 5000 ml Dialysepuffer (10 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM MOPS/Tris pH 7,5) dialysiert und anschließend ÜN bei 4 °C weiterdialysiert. Die gebildeten Proteoliposomen wurden zu je 30-40 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren.

Bis zur Verwendung der Proben erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Um den Erfolg der Rekonstitution über SDS-PAGE überprüfen zu können wurden die Proteoliposomen nach Saccharose Dichtegradiententrifugation (2.1.9) mit Aceton (2.1.10) aus den Liposomen gefällt und dann das Protein über SDS-PAGE (2.1.6) sichtbar gemacht.

2.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sichtbarmachung der Proteine aus der Acetonfällung (siehe 2.1.10) erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) ohne Zusatz von Harnstoff.

Es wurden ausschließlich Minigele (8,7,3 cm) mit einer 12,5%-igen Acrylamidkonzentration im Trenngel und 5% im Sammelgel eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einem vertikalen Elektrophorese-System von BIO-RAD (München). Der Elektrophoresepuffer setzte sich aus 3 g·l⁻¹ Tris, 14,4 g·l⁻¹ Glyzin, und 0,1% SDS (w/v) zusammen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Standardprobenpuffer (100 mM Tris/HCl, 2% SDS (w/v), 2% β -Mercaptoethanol (v/v), 12,5% Glycerin (w/v), 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau (w/v)) eingestellt.

Lösung	Ansatzvorschrift	Bemerkungen
Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl pH 6.8	
Standartprobenpuffer	100 mM Tris/HCl pH 7.6, 1,6 % SDS (w/v), 1 % β - Mercaptoethanol (w/v), 12,5 % Glycerin (w/v), 0,013 % Bromphenolblau (w/v)	Lagerung bei 4°C
Elektrodenpuffer (5x)	15 g Tris, 72 g Glyzin, 50 ml SDS (10%) auf 1000 ml H ₂ O _{bidest}	(1x) Puffer kann maximal 3x verwendet werden, Lagerung bei RT
Sammelgel	5,0 %	
Trenngel	12,5 %	

Tabelle 2.1: Aufstellung über die verwendeten Lösungen bei der SDS-PAGE (nach Laemmli).

2.1.7 Färbung von SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue G-250

Der Rekonstitutionserfolg wurde über SDS-PAGE überprüft. Zunächst werden die Proteine im Gel mit 10% TCA (Trichloressigsäure) gefällt und fixiert und danach für 45 min in Coomassie Brilliant Blue (50% Methanol, 5% Essigsäure, 0,05% Coomassie Blue G-250) eingefärbt. Anschließend wird das Gel dann in *Destain* (25% Methanol, 5% Essigsäure) entfärbt, bis die Banden auf dem Gel zurückbleiben.

2.1.8 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach Literaturmethoden (Blum,1987) durchgeführt.

Blum *et al.*, 1987

Nach der Elektrophorese werden die Gele ÜN fixiert (10% Essigsäure; 30% Ethanol) und einmal 20 min in 20% Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Gel für 10 min mit H₂O_{bidest} gespült. Die Inkubation erfolgt für 60-90 min in Imprägnierlösung (11,8 mM AgNO₂; 0,05% Formaldehyd). Im folgenden werden die Gele noch zweimal in H₂O_{bidest} gespült und dann in den Entwickler (566 mM Na₂CO₃; 31,8 mM Na₂S₂O₃*5H₂O; 0,05%

Formaldehyd) überführt. Bei ausreichender Signalstärke wird die Entwicklungsreaktion durch eine einmalige $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ -Spülung und Zugabe der Stopplösung (50% Methanol; 12% Essigsäure) unterbrochen.

2.1.9 Diskontinuierliche Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Die Abtrennung von **nicht** in Liposomen integrierten Proteinaggregaten erfolgte mittels diskontinuierlicher Saccharosedichtegradientenzentrifugation (nach Francou *et al.*,1972). Ausgehend von einer 1,6 M Stocklösung erzeugt man durch sequenzielle Überschichtungen einen Stufengradienten von 1,6; 1,0; 0,4; 0,2; 0,1 M (Beckmann, 5 ml Tube). Die Probe (100 μl) wird dann oben auf dem Gradienten aufgetragen und 16 h bei 36.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Beckmann) abzentrifugiert. In einem von oben nach unten zunehmendem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten sammelt sich eine oben aufgetragene Liposomenfraktion im Bereich um etwa 0,3 M Saccharose. Die Dichtegradientenzentrifugation wird zur Überprüfung des Rekonstitutionserfolgs bei den untersuchten rekombinanten Proteinen eingesetzt. Dazu werden die Liposomenbande bei 0,3M mit einer Spritze abgesaugt und die Proteine dann mit Aceton gefällt (2.1.10) und diese über SDS-PAGE sichtbar gemacht.

2.1.10 Aceton Fällung

Um rekonstituierte Proteine wieder aus Liposomen herauszufällen, werden sie mit bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühltem Aceton (Reinheitsgrad: $>99,5\%$) versetzt (200 μl Liposomen ($30\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) auf 800 μl Aceton). Dieses Gemisch wird geschüttelt und 10 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ bei 10.000 rpm abgedreht (Tischzentrifuge, Eppendorf). Nach der Zentrifugation wird der Überstand soweit wie möglich abgesaugt und die Probe im Vakuum getrocknet (SpeedVac, Savant). Im Anschluss an die Trocknung werden die Proben in Standardprobenpuffer aufgenommen.

2.1.11 Blaue native Polyacrylamid-Elektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE Methode wurde von Schägger und Jagow entwickelt (Schägger *et al.*, 1991) um die Atmungskettenkomplexe der inneren Mitochondrienmembran zum untersuchen. Das Prinzip beruht darauf, dass Detergens durch Coomassiefarbstoff ersetzt wird. Die Färbung führt zu einer Nettonegativladung der Proteinkomplexe. Dies hat zur Folge, dass die Proteine, obwohl sie nicht in Detergensmizellen vorliegen, dennoch löslich bleiben. Um TIM22-Komplexe zu isolieren wurde folgendes, von der Originalvorschrift nach Schägger abweichendes Protokoll verwendet: Mitochondrien (50-100 µg) werden in 50 µl Digitonin (1% Digitonin (Merck)); 20 mM Tris/Cl pH 7.4; 0,1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10% Glycerol, 1 mM PMSF) solubilisiert und das unisolubierte Material wird dann über Zentrifugation (15' bei 100.000 g) entfernt. Nach Zugabe von 5 µl Standardprobenpuffer (5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 100 mM Bis-Tris pH 7.0; 500 mM 6-Aminocaprinsäure) wird der Überstand auf das BN-PAGE Gel (Gradientengel: 6-16.5% Polyacrylamid mit 4% Sammelgel) aufgetragen.

2.1.12 Rekonstitution von TIM22-Komplexen

TIM22-Komplex wurde in Detergenspuffer aus BN-PAGE Gelen eluiert (1% n-Heptyl-β-thioglucopyranosid (HPTG, C₁₃H₂₆O₅S), 25 mM Tris und 192 mM Glyzin). Die nachfolgende Dialyse erfolgte gegen das ~5000-fache Volumen an Dialysepuffer (10 mM KCl, 1 mM CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0).

2.1.13 Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie

Sowohl der isolierte TIM22-Komplex, als auch die korrespondierende Kontrolle (TOM-Komplex) wurden in Solubilisierungspuffer (0.3% (w/v) Digitonin, 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 10% (w/v) Glycerol, 0.1 mM EDTA) auf glühenden, ungeladenen und kohlenstoffbeschichteten Kupfergrids gespreitet, und gefärbt (2% Uranylacetat). Die Präparation erfolgte nach Literaturangaben (Stoops *et al.*, 1992). Die Oberflächen wurden mit einem Phillips CM120 Elektronenmikroskop (100 kV) bei einer Verstärkung von 53.800x in einem Fokus von 0.7-2.1 µm gescannt.

Die resultierenden Aufnahmen wurden mit einem Flachbett-Scanner (Zeiss-SCAI) digitalisiert. Im Maßstab entspricht 1 Pixel (21 μm) jeweils 0.36 nm. Die Analyse der Aufnahmen wurde mit der SPIDER/WEB Software (Frank *et al.*, 1996) und Erweiterungen dieses Programmes (XMIPP) durchgeführt. Die Integration der erhaltenen Ansichten des Komplexes wurden dann einer Multifaktorenanalyse (van Heel *et al.*, 1981, Frank *et al.*, 1982) unterzogen. Die ermittelten Strukturklassen wurden dann mit Hilfe eines Mustererkennungsalgorithmus in einem neuronalen Netzwerk (Marabini *et al.*, 1994) charakterisiert. Die Auflösung der erhaltenen Strukturklassen wurde mit Hilfe einer Ringkorrelation bestimmt (Böttcher *et al.*, 1997).

Die Elektronenmikroskopie in wurde von **Kirstin Model** (MPI Frankfurt) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner Kühlbrandt durchgeführt. Die Ergebnisse wurden uns freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2 Multiple Alignments

2.2.1 FASTA Format

FASTA-Sequenzen dienen als universeller Sequenzcode für Nucleinsäuren und Proteine und kann von den in dieser Arbeit verwendeten Programmen ausgelesen werden. Eine FASTA-Sequenz beginnt immer mit einer einzeiligen Beschreibung des Proteins, gefolgt von Sequenzdatenzeilen. Die Beschreibungszeile unterscheidet sich von den Sequenzzeilen durch ein „>“ am Beginn der Zeile. Dabei darf die Länge der einzelnen Zeile 80 Zeichen nicht überschreiten. Beispiel: FASTA Sequenz mtPiC (Aminosäure – Code, siehe Anhang).

```
>gi|127277|pir|P23641|mtPiC
MSVSAAPAIPQYSVSDYMKFALAGAIGCGSTHSSMVPIDVVKTRIQLEPTVYNKGMVGSF
KQIIAGEGAGALLTGFGPTLLGYSIQGAFKFGGYEVFKKFFIDNLGYDTASRYKNSVYMG
SAAMAEFLADIALCPLAETRIRLVSQPQFANGLVGGFSRILKEEGIGSFYSGFTPILFKQ
IPYNIKFLVFERASEFYGFAGPKEKLSSTSTLLNLLSGLTAGLAAAIVSQPADTLLS
KVNKTKKAPGQSTVGLLAQLAKQLGFFGSFAGLPTRLVMVGTLTSLQFGIYGLKSTLGC
PPTIEIGGGGH
```

Abbildung 2.1: Exemplarisches Beispiel für eine Proteinprimärsequenz im FASTA-Format (nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/fasta.html>, Sequenz des mitochondrialen Phosphat-Carriers PiC aus *S. cerevisiae*, Accession No.# P23641).

2.2.2 Suche nach sequenzähnlichen Proteinen mit PSI-BLAST

Der Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) dient zur schnellen Suche nach sequenzähnlichen Proteinen (-oder Nucleotidsequenzen) in großen Datenbanken. Sie beruhen auf der Suche nach kurzen übereinstimmenden Sequenzen („*local alignments*“). Nur wenn eine signifikante Übereinstimmung in einem kleinen Sequenzabschnitt entdeckt wird, wird der Vergleich auf die gesamte Sequenz ausgedehnt, um den übereinstimmenden Sequenzbereich zu identifizieren. Die Wahrscheinlichkeit in den großen Datenbanken irgendeine übereinstimmende Sequenz zu finden ist heutzutage relativ hoch. Es lässt sich jedoch eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit durchführen, mit der eine bestimmte Übereinstimmung per Zufall in einer Datenbank bei gegebener Größe beobachtet wird. Diese

Wahrscheinlichkeit wird als *E-Score* bezeichnet und erlaubt eine schnelle Beurteilung der erhaltenen Treffer. Die PSI-BLAST Erweiterung vereinigt in einem nächsten Schritt alle Treffer in einer Matrix, die die Aminosäurehäufigkeiten an jeder gegebenen Position beschreibt.

2.2.3 Swissprot und TrEMBL Datenbanken

Die Datenbank Swisprot/TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot>) ist eine gut gewartete Protein-Primärstrukturdatenbank mit wenigen redundanten Sequenzen. Die Swissprot-Datenbank ist über zahlreiche *links* mit weiteren Datenbanken verbunden und eignet sich gut zur Ermittlung von Proteinprimärstrukturen (Bairoch *et al.*, 2000).

2.2.4 Alignments mit ClustalW

Die Alignments wurden mit ClustalW durchgeführt (<http://clustalw.genome.ad.jp/>, Higgins *et al.*, 1996). Dieses Programm erlaubt die Berechnung von Sequenzalignments bei zahlreichen Proteinen. Dabei werden die Proteine zunächst paarweise verglichen und dann iterativ zu Clustern zusammengefasst und *aligned*. Hierbei sind verschiedene Aminosäure-Ersetzungsmodelle (*Matrices*) einsetzbar (siehe unten). Weiter besteht die Möglichkeit den "gap penalties" verschiedene Parameter zuzuordnen. Das *multiple alignment* von P2 wurde mit Hilfe der BLOSUM62-Matrix (**B**locks **S**ubstitution **M**atrix) durchgeführt. Diese Matrix wurde 1992 entwickelt und bildet *Alignments* aufgrund von Aminosäuresubstitutionen in konservierten Blöcken („*local alignment*“ einer konservierten Region) innerhalb einer Proteinfamilie (Henikoff und Henikoff 1992). Der Vorteil gegenüber der PAM-Matrix (Dayhoff *et al.*, 1978) besteht darin, dass auch weniger sequenzähnliche Proteine miteinander verglichen werden können, wobei jeweils zusammenhängende konservierte Blocks untersucht werden. Zu diesem Zweck werden Sequenzen zuerst miteinander *aligned* und konservierte Bereiche (ohne Sequenzlücken) identifiziert. Weiter werden dann die Substitutionspaare spaltenweise ausgezählt und die beobachtete Wahrscheinlichkeit a_{ij} für ein Substitutionspaar berechnet. Aus der Datenbank werden dann die Erwartungswerte e_{ij} für die einzelnen Substitutionen bestimmt, und das LOD- (*logarithm of odds ratios*) Verhältnis s_{ij} errechnet: s_{ij}

$s_{i,j} = 2 \cdot \log_2 (a_{i,j}/e_{i,j})$. Dabei gilt, dass wenn die Aminosäuresubstitution i durch j , so häufig vorkommt wie statistisch erwartet ist $s_{i,j}=0$, kommt sie jedoch häufiger vor, so ist $s_{i,j}>0$, oder seltener, so ist $s_{i,j} < 0$. In die BLOSUM-Matrix werden dann die $s_{i,j}$ -Werte gerundet aufgenommen. *Alignments* der PRAT-Familie wurden ebenfalls mit ClustalW unter Zuhilfenahme der GONNET-Matrix erstellt (Erweiterung des Dayhoff-Algorithmus, Gonnet *et al.*, 1992).

2.3 Elektrophysiologie

Die **Spannungsklemme** (*voltage clamp*) wurde in den dreissiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts von Kenneth S. Cole und H. J. Curtis entwickelt, und stellt eine elektrische Schaltung dar, deren Aufgabe es ist Potenziale über die Membran auszugleichen. Dazu erzeugt sie einen Kompensationsstrom, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt. Ein Verstärker misst an seinen beiden Eingängen die vom Experimentator vorgegebene Sollspannung U_{soll} (Minus-Eingang) und die Spannung an der Messelektrode U_{elektr} (Pluseingang). Im Falle einer Differenz zwischen dem Elektrodenpotenzial und der Sollspannung entsteht am Ausgang des OPA (*operational amplifier*, Axon Instruments, siehe 2.3.7) eine Spannung U_{Δ} , deren Größe proportional zur Abweichung ist. Da die Spannungen verschieden stark sind, muss der Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f fließen. Dabei entsteht am Rückkopplungswiderstand eine Spannung, die proportional zur Größe des fließenden Stroms ist ($U_f = R_f \cdot I$). Die Spannung stellt also eine indirekte Messgröße für den über die LDS fließenden Strom dar. Mit geeigneten Verstärkern können so Membranströme im pA-Bereich (10^{-12} A) detektiert werden. Sowohl die *Patch-Clamp* Technik, als auch die *Bilayer*-Messtechnik sind Weiterentwicklungen der Spannungsklemmen- und der Stromklemmen-Technik (*current clamp*). Die *Patch-Clamp* Technik wurde 1976 erstmals von Erwin Neher und Bert Sakmann beschrieben. Sie erlaubt die Beobachtung und Analyse von Einzelkanalströmen mit Amplituden im pA-Bereich und Zeitauflösungen im ms-Bereich bei vorgegebenen Haltepotenzialen (Neher, E. und Sakmann, B., 1976). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Einzelkanalmessungen wurde stets die Spannungsklemme verwendet.

2.3.1 Elektrophysiologische Messungen am planaren *Bilayer*

Das *Bilayer*-Messprinzip stellt eine reproduzierbare Methode zur elektrischen Charakterisierung von rekonstituierten Kanalproteinen dar. Diese Methode ist eine Abwandlung der Spannungsklemmenteknik (engl.: *voltage clamp*) bei der Ionenströme zwischen den Messkammern über eine künstliche LDS (**L**ipid**D**oppel**S**chicht) gemessen werden. Diese LDS wird auch als „planarer *Bilayer*“ bezeichnet und bildet einen Abdichtwiderstand (*seal*) in Gigaohm-Bereich, der zwei flüssigkeitsgefüllte Messkammern voneinander trennt. Die Integration von Kanalproteinen in den planaren *Bilayer* erfolgt über

Fusion von Proteoliposomen mit dem *Bilayer* nach der in der Literatur beschriebenen Methode der **“Ca²⁺-vermittelten osmotischen Fusion von Lipidvesikeln mit planaren *Bilayern*,”** (nach Miller und Racker, 1976, siehe **Abbildung 2.3**). Dabei bewirkt ein künstlicher Salzgradient zwischen den beiden Kammern, einen gerichteten H₂O-Strom von der Niedrig- zur Hochsalzseite (siehe auch **Abbildung 3.2**). Mit Kanalproteinen beladene, negativ geladene Proteoliposomen binden über ein divalentes Kation (Ca²⁺) am planaren *Bilayer*. Der Unterschied der Salzkonzentrationen innerhalb und ausserhalb der Proteoliposomen führt zu einem Ioneneinstrom durch die konstituierten Kanäle in die Liposomen hinein. Bei Überschreiten eines bestimmten Innendruckes platzen die Vesikel, und in der Nähe des planaren *Bilayers* befindliche Liposomen fusionieren mit der Lipiddoppelschicht. Um die Fusion von Kanalproteinen zu erreichen wurde standardmäßig ein 250 : 20/20 : 250 mM KCl Gradient in den Messkammern erzeugt. Die osmotische Fusion wurde bei den IMM-Vesikeln in Anwesenheit von 100 µM, bei Tim23 (sowie Tim23-1, 23.2, 23m, und 22)-Liposomen über die Zugabe von 10 mM CaCl₂ auf der Hochsalzseite (*cis*) . Der Vorteil der *Bilayer*-Methode gegenüber der *Patch-Clamp*-Technik liegt im ungehinderten Zugang zu beiden Seiten der Membran und einem relativ unproblematischen Lösungsmittelaustausch in den beiden Kammern. Durch eine Variation der Calciumkonzentration in der *cis*-Kammer kann die Fusionsrate der Liposomen mit dem *Bilayer* reguliert werden. Mit der *Bilayer*-Technik lassen sich nicht nur Summenströme durch viele Kanäle charakterisieren, sondern auch Einzelkanalmessungen durchführen.

Ein Nachteil der Methode ist, daß für den zugrundeliegenden Mechanismus der Fusion von Liposomen mit dem *Bilayer* (vgl. Kapitel 2.2.1.8.2) die Kanäle, die im *Bilayer* charakterisiert werden sollen, ohne eine Spannung im offenen Zustand vorliegen müssen. Befinden sich die Kanäle im geschlossenen Zustand und öffnen z.B. nur spannungsaktiviert, so gestaltet sich eine Fusion der Liposomen mit dem *Bilayer* weitaus schwieriger.

2.3.2 Messplatz

Die Aufgabe des Messplatzes ist es, den planaren *Bilayer* gegen mechanische, und elektrische Störungen abzuschirmen. Daher ist der Messplatz von einem Faraday-Käfig umgeben, der aus einem auf vier Standbeinen stehendem Metallkäfig aus Leichtmetall besteht

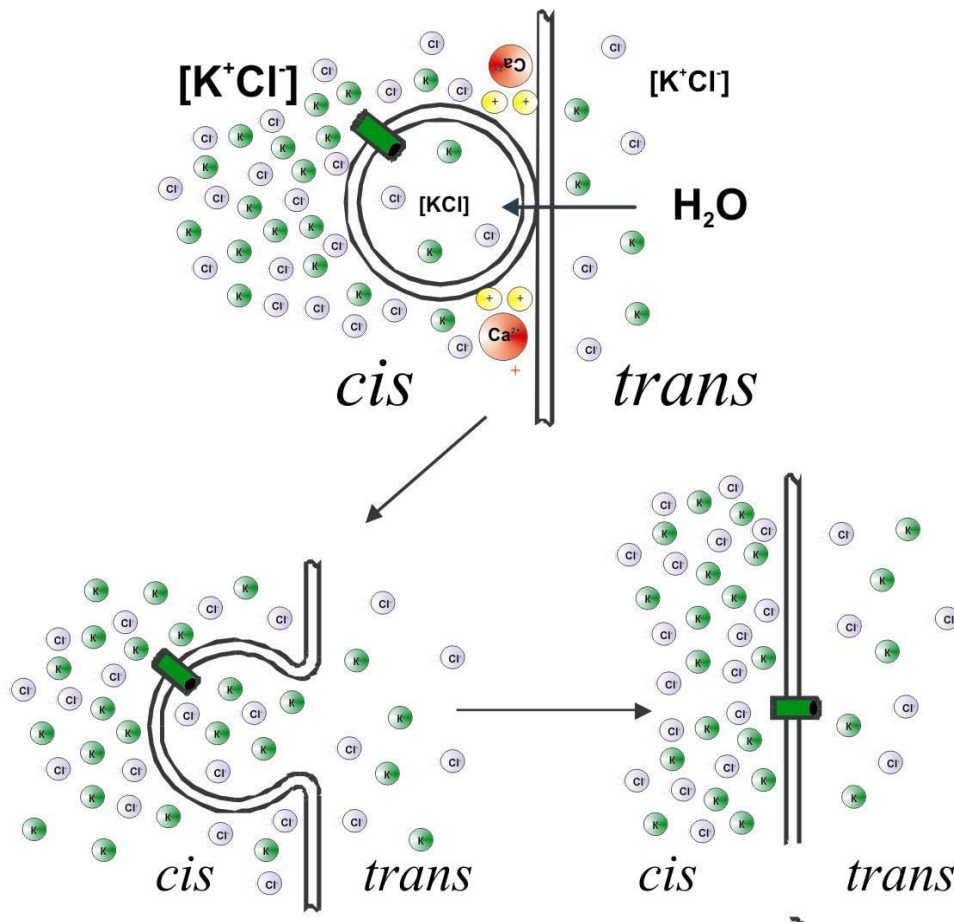


Abbildung 2.2: Calcium induzierte Fusion von Proteoliposomen mit dem planaren *Bilayer* (siehe dazu Text, Schema nach Miller *et al.*, 1976; siehe 2.4.1).

Die Messkammer selbst ruht im Stand auf einer durch Schwingungsdämpfer (Luigs & Neumann) abgesicherten Platte (Gewicht: 50 kg, Luigs & Neumann) um die Kammer vor Erschütterungen zu bewahren. Als Kammersockel dient ein Magnetrührer (Eigenbau, Feinmechanik-Werkstatt, Universität Osnabrück) der auf den Tisch montiert ist. Die *headstage* des Verstärkers (Axon Instr.), die Halterungen für die Elektroden (siehe Elektroden 2.3.6) und die Perfusionseinrichtung (siehe 2.3.5) sind ebenfalls auf dem Tisch montiert.

Im Faraday-Käfig, vom schwingungsgedämpften Tisch entkoppelt, ist ein Binokular zur Überwachung des *Bilayers* angebracht. Eine Lichtquelle ist dem Binokular gegenüber angebracht, und erlaubt dem Experimentator die optische Überwachung der *Bilayermembran*.

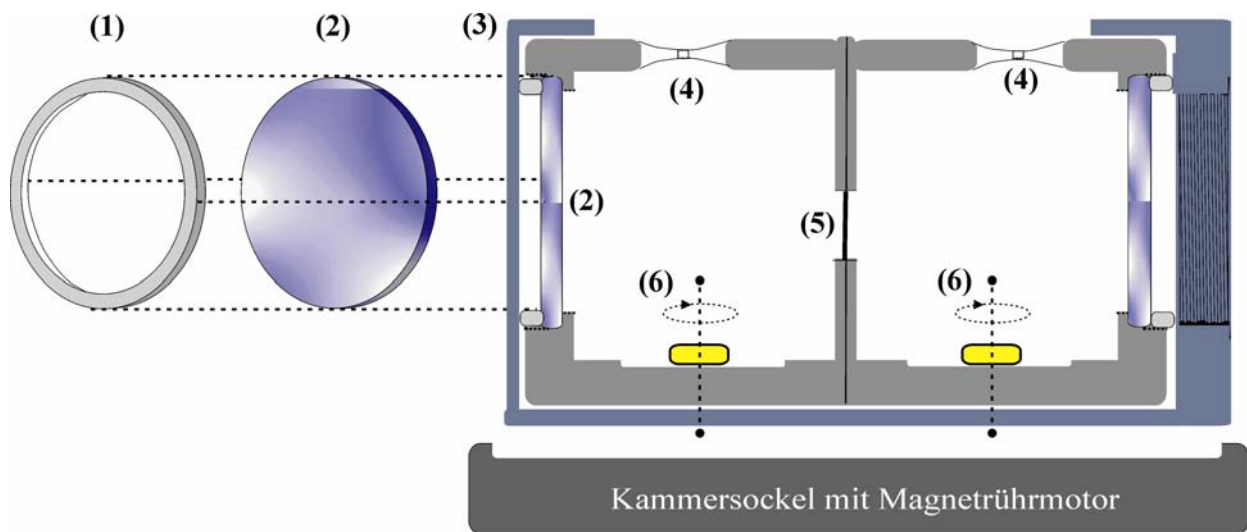


Abbildung 2.3: mechanischer Aufbau der *Bilayer*-Messkammer. (1) Klemmring (Teflon), (2) Scheibchen (Plexiglas), (3) Metallchassis, (4) Öffnungen für die Zufuhr von Messlösungen und die Elektroden, (5) Septum (Teflonfolie mit Loch, Durchmesser~200 μm), (6) Magnetührstäbchen, (Universität Osnabrück, Abt. Biophysik, siehe 2.3.3).

2.3.3 Messkammer

Die Messkammer besteht aus zwei halbzylindrischen Halbkammern aus Teflon, die von einem Edelstahlrohr zusammengehalten werden und deren Außenseiten von kreisförmigen Plexiglasplättchen verschlossen werden, die die Vorder- und Rückwand der Messkammer bilden

Diese Plättchen werden über Teflonringe fixiert und dabei mit Parafilm abgedichtet. Das Septum wird anschließend zwischen die beiden Kammern geklemmt, und zur sicheren Abschirmung der Messkammern voneinander wird der Zwischenraum zwischen der Teflonfolie und den Kammerwänden mit Silikonfett (Wacker-Chemie GmbH, München) isoliert. Jede der beiden Messkammern kann 3 ml Messlösung aufnehmen. Nach Benutzung werden die Messkammern bei -20°C gelagert, und vor dem nachfolgenden Gebrauch mit Aceton im Ultraschallbad gereinigt. Ist die Messkammer in den Messstand (siehe oben) integriert, so wird sie von *trans* her mit einem Strahler durchleuchtet. Während der Messung

kann der Experimentator so die Bildung eines planaren *Bilayers* über ein Binokular (Olympus) mit verfolgen (siehe **Abbildung 2.3**). Die Kammer kann mit Hilfe von Stellschrauben (Luigs & Neumann) justiert werden.

2.3.4 Septum und *Bilayer*

Das Septum wird aus einer 30 µm dicken Teflon Folie (Dielectix Corporation) hergestellt. Dazu wird ein etwa 1,5·1,5 cm großes Stück Folie zurecht geschnitten und an einer Stelle in der Mitte leicht angestoßen. Mit einer Funkenstrecke (Kfz-Zündspule, Eigenbau der Elektronikwerkstatt des FB 04 der Universität Osnabrück) wird dann die Stelle bis auf ~0,2-0,3 mm kreisrund erweitert. SIV (SIV Lipid Sigma) wird als Stammlösung gelöst in (2:1) Methanol/Trichlormethan (Chloroform), bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wird das Chloroform und das Methanol mit einer Vakuumpumpe entfernt (65 µl), und das zurückbleibende Lipid in 85 µl Dekan (C₁₀H₁₂, Merck) aufgenommen und dann für *Bilayer*-Experimente verwendet.



Abbildung 2.4: Herstellung eines *Bilayers*.

links: Lipidpropfen über dem Loch im Teflon-Septum, *rechts*: Lipiddoppelschicht (*Bilayer*).

Um einen *Bilayer* zu erzeugen wird etwas Lipid auf das Septum gebracht und durch alternierendes Heben und Senken des Lösungsspiegels mit einer Glaspipette eine Lipiddoppelschicht erzeugt (*painting techn.*, nach Mueller *et al.* 1962, siehe **Abbildung 2.4**) Die Aufbewahrung erfolgt gelöst in MeOH/Chl (2:1, Reinheitsgrad: pro analysi, 1 mg·ml⁻¹, -

20°C). Die kapazitiven Eigenschaften der Membran (C_M) sind weitgehend konstant (für biologische Membranen gilt: $C_M \cong 1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$).

2.3.5 Perfusion

Der Austausch von Messlösungen in einer oder beiden Kammern wird als Perfusion (Lösungswechsel) bezeichnet und wird über eine Zug- und Druck-Apparatur (Eigenbau) mit zwei Spritzen (60 ml) vorgenommen. Diese Spritzen tauchen jeweils über Silikonschläuche (Fa. Jürgens, Bremen) mit aufgesetzten Glasrohr-Enden in die Messlösung ein. Der Lösungswechsel wird über ein Absaugen der alten Messlösung und ein gleichzeitiges Ersetzen durch neue Messlösung erreicht. Bei der Perfusion ist darauf zu achten, dass beide Spritzen während des Lösungswechsels synchron betätigt werden, um ein Überlaufen oder rapides Absinken des Lösungsspiegels in der Kammer zu verhindern. Unterschiedlich gefüllte Kammern erzeugen einseitige hohe hydrostatische Drücke am *Bilayer* und können diesen extrem beanspruchen und zu einem Verlust der Membran führen. Nach Perfusion von 60 ml Messlösung (zwanzigfaches Kammervolumen) ist der Lösungswechsel im Allgemeinen vollzogen. Um die Gefahr der Zerstörung des *Bilayers* während der Perfusion zu minimieren, muss die *headstage* über einen FET kurzgeschlossen werden (siehe 2.4.7).

2.3.6 Elektroden

Die Verbindung von elektrischer Messeinrichtung und Messlösung wird über **Ag/AgCl₂-Drähte** und die Elektroden umgebende Salzbrücken etabliert. Im Idealfall treten dabei nur geringe, zeitlich konstante Elektrodenpotenziale auf. *Ag/AgCl₂*-Elektroden die über Salzbrücken mit dem Elektrolyten in Verbindung stehen erfüllen diese Forderungen. Dieses System besteht aus metallischem Silber, festem *AgCl₂* und einer Lösung aus *Ag⁺* und *Cl⁻* Ionen. An der Elektrode werden den metallischen Silberatomen Elektronen entzogen (*Ag_{Metall} → Ag⁺ + e⁻*). Das Potenzial einer derartigen Elektrode ist mit $E = E_{0+} + (R \cdot T) / (z_{Ag} \cdot F) \cdot \ln [Ag^+]$ gegenüber einer Standard-Normalelektrode gegeben. Weil jedoch das Löslichkeitsprodukt $K_L = [Ag^+] \cdot [Cl^-] \vee [Ag^+] = K_L \cdot [Cl^-]^{-1}$ ist kann man dieses Verhältnis einsetzen (siehe unten): Man sieht das sich die *Ag/AgCl₂*-Elektrode wie eine Chloridelektrode verhält. Die Elektroden werden in Agarose (peqLab, Erlangen) gefüllten Glasröhrchen (Filament Glas, Dagan Corp.) zur Messung verwendet. Zur Herstellung der Elektroden wird ein dünner Silberdraht bei einer

angelegten Spannung von 10 V in einer 1 M NaCl-Lösung für ca. 15 Minuten chloriert, was zu einer Ablagerung einer Silberchloridschicht auf der Elektrodenoberfläche führt. Dann wird Agarose (2% w/v in 2 M KCl) erhitzt und durch Kapillarkräfte in ein Glasröhrchen eingesogen, in dem sich der chlorierte Silberdraht befindet.

$$\begin{aligned}
 E &= E_{0+} + (R \cdot T) / (z_{Ag} \cdot F) \cdot \ln K_L \cdot [Cl^-]^{-1} \\
 \Leftrightarrow E &= ((E_{0+} + (R \cdot T) / (z_{Ag} \cdot F) \cdot \ln K_L)) - ((R \cdot T) / (z_{Ag} \cdot F) \cdot \ln [Cl^-]) \\
 \Leftrightarrow E &= \hat{E}_{0+} + (R \cdot T) / (z_{Cl} \cdot F) \cdot \ln [Cl^-] \\
 &\Leftrightarrow
 \end{aligned}$$

Legende: R=Gaskonstante [8,31447 J/Kmol] ; T=Temperatur [K]; K_L = Löslichkeitsprodukt [(mol²)·[l²]]; z_x =Wertigkeit von Ion x [dimensionslos]; E_0 =Standartelektrodenpotenzial [V]

2.3.7 Kopfverstärker (*headstage*) und Hauptverstärker

Die Verstärkungseinheit besteht aus zwei separaten Teilen. Die Verbindung der Messelektronik mit den Messkammern wird über eine *headstage* etabliert, die den empfindlichsten Teil des Verstärker darstellt. Die unmittelbare Nähe zu den Messkammern führt dabei zu einer zusätzlichen Verringerung von Messverfälschungen. In dem Kopfverstärker findet die Umwandlung des Stromes durch die Kammern in eine Spannung statt, gleichzeitig wird das Potenzial der Elektroden auf den gewünschten Wert fixiert (*voltage clamp*). Nach dieser Vorverstärkung werden die Signale zur Verstärkerkonsole (**Abbildung 2.6**) geleitet, der die Signale weiterverstärkt. Die Bedienungskonsole des Verstärkers dient dazu die entgültige Verstärkung einzustellen und das Membranpotenzial ϕ_{mem} manuell zu justieren. Als Messverstärker wurde ein GeneClamp500 (Axon Instruments, USA) verwendet. Die Aufgabe des Verstärkers besteht darin, eine Potenzialdifferenz zwischen den beiden Messelektrolyten (*cis* und *trans* Kammer) zu erzeugen, und den resultierenden Strom zu ermitteln, dazu ist der OP sowohl an seinem invertierenden (-), als auch an seinem nicht-invertierenden (+) Eingang mit derselben Spannung beschaltet (hier Masse, siehe dazu **Abbildung 2.5**). So wird einer Übersteuerung des invertierenden Eingangs (-) mit einer Kompensation der Ausgangsspannung entgegengewirkt. Dabei muss gewährleistet sein, dass die Spannung U_A am Ausgang sich proportional zur Eingangsspannung U_E verhält und keine ekzessive Verstärkung stattfindet. Diese Abhängigkeit wird über eine Widerstandsrückkopplung des Ausgangs mit dem invertierenden (-) Eingang des OPA erreicht. Der Strom der durch den Rückkopplungswiderstand R_f fließt, ist dabei

immer betragsgleich dem Strom $I_{Bilayer}$ der über den *Bilayer* fließt und somit ist $U_A \sim I_{Bilayer}$ oder: $U_A = I_{Bilayer} \cdot R$. Für die elektrischen Messungen an planaren *Bilayern* wurde eine *headstage* mit einer Vorverstärkung von $1 \text{ mV} \cdot \text{pA}^{-1}$ bei $I_{max} = \pm 10 \text{ nA}$) verwendet. Um Lösungswechsel in den Messkammern vornehmen zu können, mussten die Verstärker modifiziert werden, da sie sonst auf Änderungen des Ionenmilieus, also auf Potenzialänderungen, extrem sensitiv reagieren und derartige auftretende Spannungsänderungen mit mehreren Volt an Kompensationsspannungen beantworten. Solche Potenziale führen unweigerlich zur Ruptur des *Bilayers*. Um dies zu verhindern wurde eine Kurzschlusschaltung nachgerüstet, die die *headstage* über einen FET kurzschliesst. Diese Schaltung ermöglicht eine langsame stetige Erhöhung des Transistorwiderstandes und verhindert starke Spannungsbeeinträchtigungen des *Bilayers*. In den Versuchen wurde der GeneClamp500 verwendet. Er bietet einen implementierten Rechteckpuls-Generator für Testpulse, und eine Unterdrückung von kapazitiven transienten Strömen (*capacitive current cancellation*) direkt nach Spannungssprüngen. Dem Verstärkerausgang ist ein 8-Pol Bessel-Tiefpaßfilter vorgeschaltet, der eine Einstellung der Eckfrequenz erlaubt.

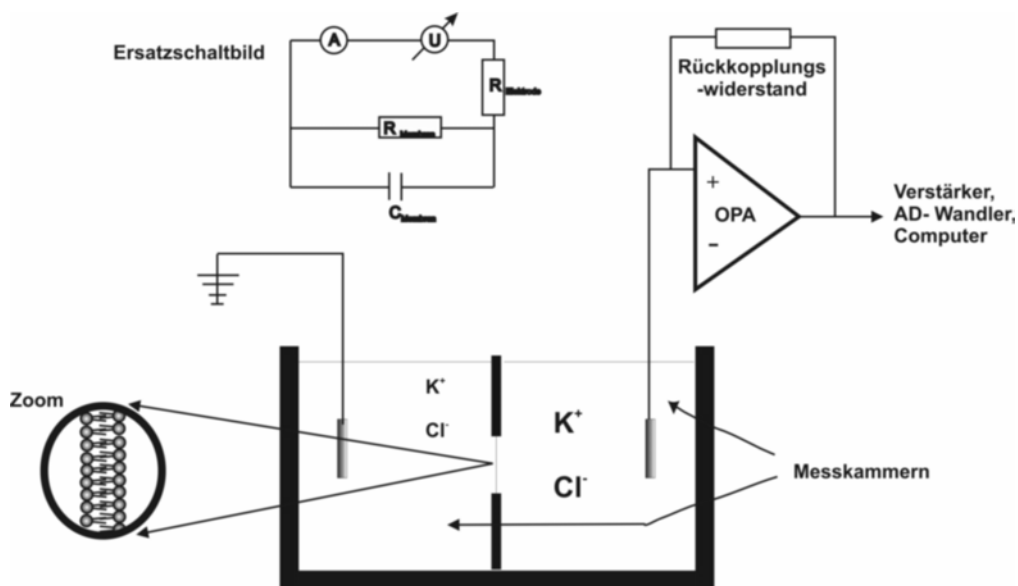


Abbildung 2.5: Schematisches Schaltbild einer *Bilayer*messkammer. Zu beiden Seiten der Membran (Zoom~1:6000.000) befinden sich wässrige Salzlösungen. Elektroden, Kopfverstärker und Bilayermembran sind dargestellt. **Ersatzschaltbild:** Die Membrankapazität wird als Kondensator C_M dargestellt, der Kanal durch den Widerstand $R_{Membran}$, der Widerstand der Elektroden und des Elektrolyten sind zu $R_{elektrode}$ zusammengefasst.

2.3.8 AD/DA Wandler

Der AD/DA Wandler (Axon Instruments) wandelt analoge Signale mit einer Abtastrate von 10 kHz in digitale Impulse um, und umgekehrt.

2.3.9 Datenspeicherung

Die Aufnahme und Speicherung der Daten erfolgte auf einem handelsüblichen PC586.

2.4 Elektrophysiologische Grundlagen

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten elektrophysiologischen Grundbegriffe eingeführt.

2.4.1 Vorzeichenkonvention am planaren *Bilayer*

Um das Potenzial über der *Bilayer*membran auf eine bestimmte Stärke zu fixieren (*voltage clamp*) wird die Klemmspannung an der Elektrode der *trans*-Kammer relativ zu der auf „Masse“ gelegten *cis*-Kammer angelegt. Ein positiver Strom bedeutet also einen Fluss von Kationen von der *trans*-Kammer in die *cis*-Kammer oder einen Fluss von Anionen von *cis* nach *trans*.

2.4.2 Selektivität

Die Bestimmung der Selektivitätseigenschaften eines Kanals erfolgt aus dem ermittelten Umkehrpotenzial U_{rev} unter asymmetrischen Konzentrationsbedingungen (in der Praxis: 250:20 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0). Sollte ein Kanal wirklich nur für eine Ionensorte permeabel sein, so entspricht sein Umkehrpotenzial U_{rev} dem Gleichgewichtspotenzial des permeierenden Ions. Das Umkehrpotenzial berechnet sich nach Nernst dann zu:

(Formel 2.1)

$$E_s = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{[Ion_2]}{[Ion_1]} = 58mV \cdot \log \frac{[Ion_2]}{[Ion_1]}$$

T= absolute Temperatur [K] ; R=Gaskonstante [8,3147 JK⁻¹ mol⁻¹]; F=Faraday Konstante [9,64 x 10⁴ C mol⁻¹]; z_s=Ladung des permeierenden Ions ; [Ion_{1/2}]=Ionenkonzentrationen beider Ionenspezies beiderseits der Membran [mol/l]

Bei unseren Standardkonzentrationen (250:20 mM KCl) würde sich bei einem rein kaliumselektiven Kanal ein Umkehrpotenzial von $U_{rev} = +63,6$ mV einstellen. In Ionenkanälen findet aber in der Regel sowohl ein Kationen-, als auch ein Anionenstrom statt. Der resultierende Nettostrom ist ein Nettostofftransport der beteiligten Ionenspezies und das Umkehrpotenzial entspricht nicht mehr dem Gleichgewichtspotenzial nach Nernst.

Um die Selektivität von Kanälen zu bestimmen verwendet man in der Regel die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichungen. (GHK-Strom-/Spannungsgleichung, siehe Hille, 1992, S.341 ff). Die Verwendung dieser Gleichungen ist aber nur mit Einschränkungen möglich, da sie von 2 Grundannahmen ausgehen. Zum einen soll keine Interaktion zwischen den permeierenden Ionen bestehen, und zum Anderen gilt diese Gleichung nur dann, wenn das elektrische Feld in der Membran konstant ist. Die Membran wird dabei als homogenes Medium betrachtet, in das die permeablen Ionen frei eindiffundieren können. Kanäle bzw. Poren werden nicht berücksichtigt. Unter den Annahmen, dass die Ionen *unabhängig* voneinander die Membran mit der Permeabilität P_S durchqueren und dass das elektrische Feld innerhalb der Membran konstant ist, erhält man die GHK-Stromgleichung für die Ionensorte S : Die GHK-Gleichungen sind entwickelt worden, um Ströme über Membranen zu beschreiben. Damals war das heute gängige Modell das Ionenkanäle als Poren durch Lipiddoppelschichten postuliert, noch nicht allgemein anerkannt, und daher in diesen Gleichungen unberücksichtigt. In der Praxis eignet sich die GHK-Spannungsgleichung (Formel 2.2) jedoch gut zur Beschreibung von Strömen durch Kanäle und zur Bestimmung der Selektivität von Ionenkanälen (Cowan *et al.*,1992).

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_{X_2^+} [X_2^+] + \sum P_{Y_1^-} [Y_1^-]}{\sum P_{X_1^+} [X_1^+] + \sum P_{Y_2^-} [Y_2^-]} \quad (\text{Formel 2.2})$$

$X_{1,2}$ = Kation 1,2; $Y_{1,2}$ =Anion 1,2; R=Gaskonstante 8,31447 JK⁻¹mol⁻¹; T= Temp in K; P=Permeabilität [m²s⁻¹]

Sind das Umkehrpotenzial U_{rev} und die Konzentrationen der beteiligten Ionen bekannt, so kann das Permeabilitätsverhältnis der beteiligten Ionensorten nach Gleichung (2.3) bestimmt werden.

$$\frac{P_{X^+}}{P_{Y^-}} = \frac{c_{trans} - c_{cis} \cdot e^{\left(\frac{E_{rev} \cdot R \cdot |z| \cdot F}{RT}\right)}}{c_{trans} \cdot e^{\left(\frac{E_{rev} \cdot |z| \cdot F}{RT}\right)} - c_{cis}} \quad (\text{Formel 2.3})$$

Legende: siehe oben

Im Falle bi-ionischer Messungen (siehe unten) in denen die Permeabilitätsverhältnisse von Kationen untereinander gemessen werden und das gemeinsame permeable Anion schlecht permeabel ist vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$\frac{P_{Kation_cis}}{P_{Kation_trans}} = \frac{c_{Kation_trans}}{c_{Kation_cis}} \cdot e^{\left(\frac{zFE_{rev}}{RT}\right)} \quad (\text{Formel 2.4})$$

P=Permeabilität des jeweiligen Kations

2.4.3 Bi-ionische Messungen

Um die Permeabilitäten von Kationen gegeneinander zu untersuchen wird in einer der beiden Kammern die Lösung durch eine andere Ionensorte gleicher Konzentration ersetzt. Das resultierende Umkehrpotenzial U_{rev} gibt dann Aufschluss darüber, welche der beiden Ionensorten bevorzugt permeiert. Bei der Auswertung sind die gemessenen Permeabilitäten mit den jeweiligen Äquivalenzleitfähigkeiten zu vergleichen. Stimmen diese überein, so spiegeln die Messungen nur die Äquivalenzleitfähigkeiten der beteiligten Ionensorten wieder. In diesem Fall ist keine genauere Aussage möglich, da der Kanal höchstwahrscheinlich zwar zwischen Kationen und Anionen unterscheidet, aber nicht in der Lage ist einzelne Ionensorten zu diskriminieren oder zu bevorzugen.

Für Kationenkanäle ergibt sich nach Hille (1992) jeweils eine Eisenmann Reihe (I-XI). Sie liefert Informationen über die Eigenschaften der Selektivitätsbarriere im Kanal. Wenn der Kationenradius für die Diskriminierung einzelner Kationensorten verantwortlich ist (*strong-field-strength-site*) ergibt sich Eisenmann Reihe XI (siehe auch Tabelle 4.1). Bei Bevorzugung von leicht zu dehydratisierenden Ionen (*weak-field-strength-site*) ergibt sich Eisenmann Reihe I.

Eisenmann - Reihe	Permeabilitätseigenschaften
Nr. I (<i>weak - field - strength - site</i>)	Es werden leicht zu dehydratisierende Ionen bevorzugt $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$
Nr. XI (<i>high - field - strength - site</i>)	Kationen mit kleinen Radius werden bevorzugt, da sie in engeren Kontakt mit den negativen Ladungen treten können. $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$

Tabelle: 2.2 Die Eisenmannreihen (nach Hille, 1992)

Ionenspezies	Äquivalenzleitfähigkeit λ_0	
	[(S/cm)/(equiv/cm ³)]	Quotient $\frac{x^+}{K^+}$
Lithium	38,7	0,53
Natrium	50,1	0,68
Kalium	73,5	1,0
Rubidium	77,8	1,04
Cäsium	77,3	1,05

Tabelle 2.3: Äquivalenzleitfähigkeiten monovalenter Alkaliionen im Vergleich.

2.4.4 Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit

Ein Kanal kann in der Regel mehrere stabile Zustände einnehmen. Er kann sowohl „offen“ und „geschlossen“, als auch partiell geöffnet vorliegen. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des „offen“ Zustandes ist abhängig von der thermischen Bewegung des Kanals, und somit nach Boltzmann bestimmbar:

(Formel 2.5)

$$\frac{P_O}{P_C} = e^{\left(\frac{E_O - E_C}{kT}\right)}$$

$P_{O/C}$ =Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Kanal im „Offen-, oder „Geschlossenzustand“ befindet; $E_{O/C}$ =Energiezustand des „Offen-, oder „Geschlossenzustands“; k =Boltzmannkonstante $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

(Formel 2.6)

$$P_O + P_C = 1 \Rightarrow P_O = \frac{P_O}{P_O + P_C} = \frac{1}{1 + e^{\frac{E_O - E_C}{kT}}}$$

Legende wie oben.

Die Offenwahrscheinlichkeit P_{offen} ist direkt abhängig von der Energiedifferenz zwischen Offen- und Geschlossenzustands ΔE ($E_O - E_C$) und ist so über das Membranpotenzial beeinflussbar. Bei spannungsregulierten Ionenkanälen wird das Schalten über fest mit dem Kanal assoziierten Ladungen gesteuert. Diese *gating charges* bewegen sich durch das elektrische Feld und sind somit membranpotenzialabhängig translozierbar. Mit Hilfe von Formel 2.7 können auch symmetrische Offenwahrscheinlichkeitsfunktionen mit zwei unabhängigen *gates* rechnerisch angepasst werden und Parameter, wie die Spannung, bei der die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit für einen Kanal vorliegt und somit die Anzahl der *gating charges* ermittelt werden (Strong *et al.*, 1993, Akabas *et al.*, 1998, Jap und Walian 1996).

(Formel 2.7)

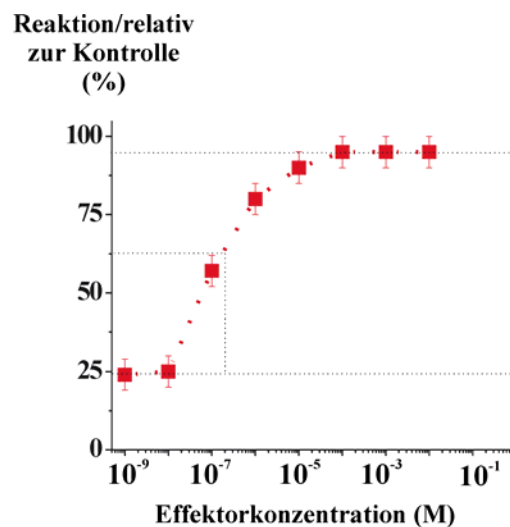
$$P_{\text{open}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{q_e}{kT}(U - U_1)Nq_1}} \cdot \frac{1}{1 + e^{\frac{q_e}{kT}(U - U_2)Nq_2}}$$

Legende: N=Anzahl der *gating charges*; $U_{1,2}$ =Spannung bei der die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit erreicht wird; sonst wie oben.

Im Experiment wurde die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit über Spannungssprung-Experimente ermittelt. Zunächst wurden einminütige Spuren nach einem Spannungssprung aufgezeichnet und der maximale Strom I_{max} und der mittlere Strom I_{mean} bestimmt. Werden die Quotienten $I_{\text{mean}} \cdot I_{\text{max}}^{-1}$ gegen die Spannungen in einem Diagramm abgetragen, ergibt sich eine Approximation der Offenwahrscheinlichkeitsfunktion, die mit Hilfe von Formel 3.6 angepasst werden kann. Nur durch Einhaltung von minutenlangen Pausen zwischen den Messungen ist gewährleistet, dass alle im Bilayer befindlichen Kanäle bis kurz nach dem Spannungssprung geöffnet sind. Standardmässig wurden die Offenwahrscheinlichkeiten in symmetrischer 250 mM KCl, 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 Elektrolytlösung gemessen.

2.4.5 Dose-response Funktionen

Dose-response Kurven werden in vielen Experimenten zur Darstellung von dosis abhängigen Effekten verwendet. Auf der X-Achse wird die Effektorkonzentration gegen den erzielten Effekt (z. B. Inhibierungen, Blockierungen, Enzymaktivität, Hormonsekretion etc.) auf der Y-Achse aufgetragen. Hierbei ist lediglich die verabreichte Dosis bekannt, jedoch nicht die effektive Konzentration, da *Dose-response* Funktionen oftmals an lebenden Systemen ermittelt werden. Für unsere Experimente eignet sich der Terminus *concentration-response curves* besser, da die Effektor-Zugabekonzentrationen bekannt sind. Ein Effektor ist eine Droge bzw. ein Molekül, das nach Zugabe einen dosisabhängigen Effekt erzielt. Dabei unterscheidet man totale Effektoren von partiellen Effektoren. Abhängig vom Experiment und den gewählten Bedingungen können *dose response curves* unterschiedliche Verläufe nehmen. Im Allgemeinen folgen sie einer Sättigungskurve (siehe **Abbildung 2.6**), die durch folgende Funktion beschrieben werden kann:



$$f(x) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{-(\log x_c - x)p}} \quad (\text{Formel 2.8})$$

Abbildung 2.6: Dose-response Funktion. a) sigmoidaler *Dose-response*-Kurvenverlauf b) Funktion zu a) ($A_{1,2}$ = Asymptote 1 und 2, p = Hill Koeffizient. Der EC_{50} repräsentiert die halbmaximale Effektorkonzentration.

2.4.6 Messungen bei asymmetrischen Bedingungen

Messungen mit asymmetrischer Ionenverteilung (im folgenden: Asymmetrische Bedingungen) auf beiden Seiten der Membran dienen zur Bestimmung des Permeabilitätsverhältnisses (P_{Kation}/P_{Anion}) nach der GHK-Spannungsgleichung. In der Praxis wird meist 250:20 mM KCl in 10:10 mM MOPS/Tris pH 7.0 eingesetzt (*cis/trans* oder *trans/cis*, siehe 2.7.2). Diese Konfiguration erlaubt die Detektion von spannungsunabhängigen Blöcken und wird zur Untersuchung der Effekte von Transitpeptiden, wie pCytOxIV, auf Poren eingesetzt. In Anlehnung an die Konzentrationsverhältnisse bezeichnet man die Messkammern auch als **Hoch-/Niedrigsalzseite**.

2.4.7 Messungen bei symmetrischen Bedingungen

Messungen bei symmetrischen Ionen-Konzentrationen (im folgenden: Symmetrische Bedingungen) auf beiden Seiten der Membran dienen zur Bestimmung der Leitfähigkeit. In der Praxis wird meist 250:250 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 eingesetzt (*cis/trans* oder *trans/cis*, siehe 2.7.2). Diese Konfiguration erlaubt die Detektion von asymmetrischen Strom-Spannungskennlinien. Messungen bei symmetrischen Bedingungen dienen auch als Grundlage für die Porengrößenbestimmung mit PEG (siehe 2.4.13).

2.4.8 Strom-Spannungsdiagramm (U~I Plot)

Die Größe der Stromamplituden ΔI (pA) bei Schaltereignissen ist häufig eine annähernd lineare Funktion der angelegten Spannung. Die Beträge der Stromamplituden werden aus den aufgezeichneten Spuren ermittelt, und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Die erhaltenen Datenpunkte können dann über eine Regression linearisiert oder polynomisch angenähert werden. Bei asymmetrischen Bedingungen repräsentiert der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse das Umkehrpotenzial U_{rev} (mV), also die Spannung, bei der kein Nettostrom fließt. Aus der Steigung der Geraden kann dann der Leitwert ($G=I/U$ [Siemens, S]) des Kanals berechnet werden. Standardmäßig wird in symmetrischer 250 mM KCl, 10 mM MOPS/Tris pH 7 Elektrolytlösung gemessen (siehe 2.4.7).

2.4.9 Unterleitwerte

In vielen Fällen verfügen Kanäle über verschiedene Offenzustände O_1, O_2, \dots, O_n mit unterschiedlichen Unterleitwerten $\Lambda_1, \Lambda_2, \dots, \Lambda_n$. Bei einer Fusion eines Vesikels mit dem *Bilayer* kam es in der Regel zu gleichzeitigen Aktivitäten von mehreren Poren. Bei einem simultanen Auftreten von verschiedenen Kanälen sind die auftretenden Unterleitwerte schwer zu unterscheiden. Das sog. „Durchschalten über mehrere Offenzustände“ dient als Kriterium zur Unterscheidung, denn das komplette Durchschalten vom Offen-in den Geschlossenzustand innerhalb eines ms-Zeitfensters ist ein Indiz dafür, dass es sich bei Zwischenzuständen um Unterleitwerte eines einzigen Kanals handelt. Bei *sampling*-Raten von 10 kHz ist das gleichzeitige Schalten von zwei Kanälen in einem Zeitfenster von 0,1 ms extrem unwahrscheinlich. Das häufige Auftreten solcher Schaltereignisse kann als Hinweis für die Existenz eines Unterleitwertes herangezogen werden (Fox *et al.*, 1987, Crouzy und Sigworth, 1993, Laver und Gage 1997).

2.4.10 Mean-Variance-Darstellung

Die *Mean-Variance*-Darstellung stellt eine geeignete Methode dar, um Leitwerte und Unterleitwerte eines Ionenkanals zu detektieren (Patlak *et al.*, 1998). Innerhalb eines gleitenden Berechnungsfensters von n Datenpunkten (z. B. $n=5$) wird der jeweilige mittlere Strom I_{mittel} und die dazu gehörige Varianz σ^2 ermittelt. Berechnet wird die Varianz aus der Summe der quadrierten Abweichungen aller Messwerte vom arithmetischen Mittel, dividiert durch die Anzahl aller Messwerte.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Formel 2.8})$$

Die sequenzielle Auftragung der Varianzen gegen die mittleren Ströme I ergibt häufig eine für den Ionenkanal charakteristische Verteilung. Ein Kanal zeigt im „Offenzustand“ eine geringe Varianz, während ein schaltender Kanal starke Varianzänderungen innerhalb der Berechnungsfenster ergibt. Ein zum Zeitpunkt t geschlossener Kanal würde einen mittleren Strom I mit einer niedrigen Varianz σ^2 zeigen, während ein geöffneter Kanal für eine

bestimmte Zeit einen konstanten Stromfluss bei einer geringen Varianz σ^2 einnimmt. Gleitet das Berechnungsfenster innerhalb seiner Flanke in den unmittelbaren Bereich einer Schaltamplitude, also zwischen zwei distinkten Stromniveaus, so nimmt der Strom I_{mittel} einen Wert zwischen den Stromniveaus ein und zeigt eine Varianz $\sigma^2 > \sigma^2_{Rauschen}$. Bei Einzelkanalableitungen ergibt sich eine annähernd parabolische Kurve mit einem Ursprungs- und einem Zielpunkt, die beide jeweils ein Stromniveau des Kanals repräsentieren. Da elektrophysiologische Messungen von einem unvermeidlichen Rauschen überlagert werden benötigt man ein Kriterium zur Unterscheidung von Rauschverhalten und distinkten Stromniveaus eines Ionenkanals. Dies Kriterium ist erfüllt, wenn $\sigma^2 \leq \sigma^2_{Rauschen}$. Das Auftreten von Unterleitwerten erzeugt weitere Knotenpunkte, die von den Hauptniveaus aufgrund ihrer Abundanz unterschieden werden können. Bei häufig geschalteten Übergängen spiegelt die Anzahl der parabolischen Übergänge direkt die Übergangswahrscheinlichkeit von einem Stromniveau auf das jeweils andere Niveau wieder. Bei Öffnungs- oder Schließereignissen die kürzer als das Berechnungsfenster sind entstehen unvollständige abgeschnittene Kurven. In **Abbildung 2.7** ist ein Beispiel für einen *Mean-Variance*-Plot dargestellt.

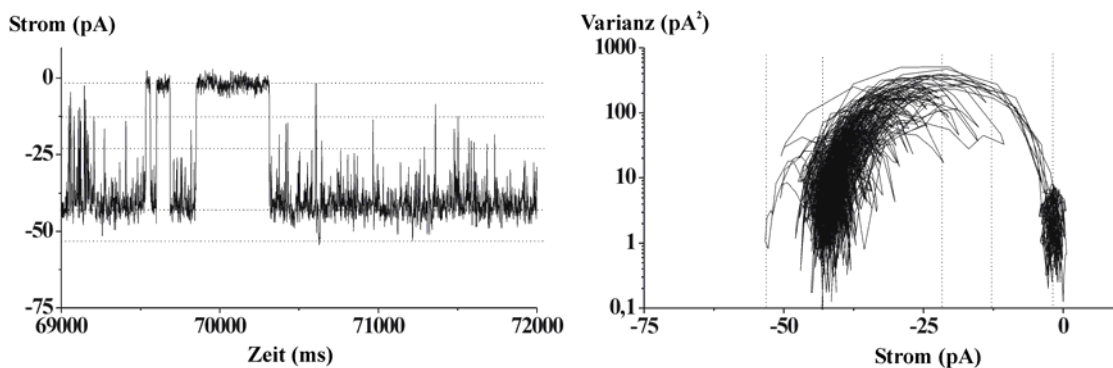


Abbildung 2.7: Beispiel für eine Mean-Variance Darstellung (oben) Stromspur eines *Bilayers* mit einem aktiven Ionenkanal bei asymmetrischen Bedingungen bei einem Haltepotenzial ϕ_{mem} von -125 mV, aufgetragen sind der erhaltene Strom I (pA) gegen die Zeit t (in 0.1 ms), (unten) *Mean-Variance* Darstellung der oben gezeigten Stromspur, aufgetragen sind hier die ermittelten Varianzen aus einem Zeitfenster von $0,5$ ms gegen die jeweiligen mittleren Ströme I_{mean} .

Sie zeigt die Stromspur eines Ionenkanals bei einem negativen Haltepotenzial ϕ_{mem} von -125 mV. Die Spur zeigt einen Geschlossenzustand einen voll geöffneten, und einen partiell geöffneten Zustand. Zusätzlich sind noch schnell angesteuerte kurzlebige Unterleitwerte erkennbar. Die *Mean-Variance*-Darstellung spiegelt dieses Bild wieder. Es treten 3 häufige

frequentierte Stromniveaus auf, die durch die mittleren Ströme repräsentiert werden. während der voll geöffnete Zustand nur einmal angesteuert wird kommt der partiell geöffnete Zustand am häufigsten vor. Die *Mean-Variance*-Darstellung zeigt Übergänge vom partielle in den geschlossenen Zustand und zurück. Damit repräsentiert dieser Übergang einen Hauptleitwert der untersuchten Pore. Außerdem zeigt dieser Kanal extrem kurzlebige Unterleitwerte, deren Auftreten von kürzerer Dauer als das Berechnungsfenster ist.

2.4.11 Der *cis/trans*-Effekt

Nach der Zugabe von Effektoren von *cis* oder *trans* reagieren Kanäle auf ihrer *cis*- und *trans*-Seite in vielen Fällen unterschiedlich. Diese Befunde werden als *cis/trans*-Effekt bezeichnet und werden im Allgemeinen auf Unterschiede der topologischen Eigenschaften von *Poreneingang* und *Ausgang* zurückgeführt. Bei den nachfolgend präsentierten elektrophysiologischen Untersuchungen beziehen sich *cis* und *trans* auf die Seiten der *Bilayerkammer* relativ zum Betrachter.

2.4.12 Spannungsrampen

Eine lineare positive oder negative Veränderung der Kommandospannung U_{com} wird als **Spannungsrampe** bezeichnet. Hierbei wird die Stromantwort auf lineare Spannungsrampen gemessen. Durch Vergleich von Kontrollrampen und Messungen mit veränderten Umgebungsparametern kann man Unterschiede in Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeiten, sowie Änderungen der Selektivität, bei Ionenkanälen detektieren. In der Regel werden die Spannungsrampen mit 10 bis 12 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ angelegt.

Zur Aufzeichnung der Spannungsrampen wurde ein *Labview*-Script von Dr. Alexander Mehrle (AG Prof. Richard Wagner, Biophysik, Osnabrück) verwendet, bei dem die Stromantwort wird mit einer Frequenz von 2 kHz abgetastet wird.

2.4.13 Schaltereignisse

Die Schaltaktivitäten wurden mit Hilfe eines Sprungdetektors (Origin Pro 7., Dr. Roland Hemmler) ermittelt. Dabei wurde ein Schaltereignis als solches gezählt, wenn eine halbe Amplitude des Hauptleitwertes angesteuert wurde. Es wurde jeweils die Spannungsabhängigkeit der Schaltfrequenz aus drei *Bilayern* bestimmt. Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm „AxoScope 8“ (Axon Instruments) im Falle konstanter Klemmspannungen und „Clampex“ (Dr. Alexander Mehrle, Universität Osnabrück) bei „Spannungsrampen“ (d.h. linearer Verlauf der Klemmspannung zwischen -50 und +50 mV mit einer Steigung von 5 mV/s und einer Abstrate von 5-10 kHz). Damit ist gewährleistet, dass auch Schaltereignisse im ms-Sekundenbereich aufgelöst werden können.

2.4.14 Bestimmung der Porendurchmesser (nach Hille 1992)

Nach Hille (1992) lässt sich der Porendurchmesser über die Leitfähigkeit G des Kanals bestimmen. Dabei wird hypothetisch eine zylindrische Pore mit dem Radius r und der Länge l angenommen, die mit einer wässrigen Lösung mit dem spezifischen Widerstand ρ gefüllt ist. Die kurze Pore ist von weiten Vestibülen flankiert, welche die Leitfähigkeit der Pore nicht beeinflussen. Der Widerstand des Kanals ergibt sich aus dem Widerstand der Pore (R_{pore}) und dem Widerstand der Vestibüle, bzw. dem Zugangswiderstand für die Ionen (R_{access}). Da der Leitwert G des Kanals reziprok zum Widerstand R_c ist, lässt sich der Durchmesser d der Pore folgendermaßen berechnen:

$$R_c = R_{pore} + R_{access} = \left(l + \frac{\pi r}{2} \right) \frac{\rho}{\pi r^2} \quad (\text{Formel 2.9})$$

$$d = \frac{\rho G}{\pi} \left(\frac{\pi}{2} + \sqrt{\left(\frac{\pi}{2} \right)^2 + \frac{4\pi l}{\rho G}} \right) \quad (\text{Formel 2.10})$$

Legende: R_c =Kanalwiderstand (Ω), R_{pore} =Poren, R_{access} =Zugangswiderstand (Ω), d =Durchmesser (nm), \square =Leitfähigkeit (S oder $1/\Omega$), l =Länge der Verengungszone, ρ =Lösungswiderstand ($\Omega \cdot \text{cm}$).

Für den Lösungswiderstand (250 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0) ergibt sich ein Wert von 49,5 Ω -cm. Es muss jedoch ein Korrekturfaktor (~ 5) in die Rechnung miteinbezogen werden (247,5 Ω -cm), denn in der Pore besteht aufgrund des geringen Abstandes der vorhandenen Ladungen ein hohes elektrisches Feld, so dass die Leitfähigkeit der Elektrolytlösung in der Pore durch Wechselwirkung mit den Wasserdipolen und Ladungen verringert wird (Chen und Eisenberg, 1993, Nonner *et al.*, 1999, Sansom *et al.*, 2000, Smart *et al.*, 1997, siehe 4.2.1). Für die Porenlänge l wird jeweils ein Wert zwischen $l=0,5$ nm und $l=3$ nm angenommen.

2.4.15 Bestimmung des Porenradius mit Hilfe der PEG-Methode

Nach Krasilnikov (1992) und Sabirov (1993) lässt sich der Porenradius einer Membranpore über sequenzielle Perfusion mit Polyethylenglykolen, mit jeweils ansteigendem hydrodynamischen Radius r_{PEG} , ermitteln. Die Methode beruht darauf, dass das Vorhandensein von ungeladenen PEG-Molekülen die Äquivalenzleitfähigkeit der am Stromfluss beteiligten Ionen herabsetzt. Dies gilt im Besonderen für Ionen innerhalb einer wässrigen Membranpore. Die Leitfähigkeit des Kanals wird durch PEG-Moleküle herabgesetzt, solange $r_{\text{PEG}} < r_{\text{Pore}}$.

PEG (MW in Da)	hydrodynamischer Radius (nm)	Leitfähigkeit der Meßlösung [mS]*
100 mM KCl		1043
200	0,47 \pm 0,002	59
300	0,60 \pm 0,002	59
400	0,70 \pm 0,002	58
600	0,75 \pm 0,003	58
1000	0,94 \pm 0,003	58
1450	1,05 \pm 0,01	58
2000	1,22 \pm 0,01	58
3350	1,64 \pm 0,04	58
4000	1,92 \pm 0,03	58
6000	2,50 \pm 0,03	58
8000	3,10 \pm 0,03	58

Tabelle 2.4: Aufstellung der verwendeten PEG's und mittleren hydrodynamischen Molekülradien (nm).

Das Vorhandensein von PEG-Molekülen mit $r_{\text{PEG}} > r_{\text{Pore}}$ führt zu einer weitgehenden Wiederherstellung der Ursprungsleitfähigkeit innerhalb der Pore. Eine Auftragung der relativen Leitfähigkeit in Anwesenheit von PEG von der Ursprungsleitfähigkeit gegen die hydrodynamischen Radien der eingesetzten PEG-Moleküle führt zu einer sigmoidalen Sättigungskurve, aus deren Extremstellen der 2. Ableitung ($f''(r_{\text{PEG}})$) der minimale Kanalradius und der maximale Vestibülradius einer Pore bestimmt werden kann (Bezrukov, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde eine logistische Wachstumsfunktion zur Anpassung der Daten verwendet (OriginPro7.0).

$$f(x) = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x_0 / x)^p}$$

Formel (2.11)

Legende: A_1 und A_2 : Asymptote 1 und 2; x_0 =Zentrum, p =Fitparameter

2.4.16 Auswertung der elektrophysiologischen Daten

Die Aufzeichnung und Speicherung der elektrophysiologischen Daten erfolgt auf einem handelsüblichen PC. Für die Aufnahme von Stromspuren nach Spannungsprüngen wurde das Programm Axoscope (Axon Instruments) verwendet. Die Vermessung von Strom-Amplituden wurde mit Ephys5a durchgeführt (C-Programm von Thomas Steinkamp). Die Dokumentation von Spannungsrampen erfolgt mit Clampex (LabView-Script von Alexander Mehrle) und die Auswertung von Stromspuren erfolgte mit dem Programm Ephys5 von Thomas Steinkamp. Die Spannungsrampen wurden als Ascii Codes in Origin (Microcal Inc., Importscript von Roland Hemmler) importiert und dort bearbeitet werden. Strom-Spannungsdiagramme und Mean-Variance-Darstellungen wurden mit Excel 2000 (Microsoft Corp.) und Microcal Origin 7.0nPro (*Mean Variance*-Script und Sprungdetektor von R. Hemmler, Microcal Inc.) erzeugt. Die Abbildungen wurden mit Corel Draw 11.0 (Corel Corp.) und Adobe Illustrator 10.0 (Adobe Systems Inc.) erstellt.

2.4.17 Anpassung von Funktionen an die Messdaten

Die Anpassung von Funktionen mit den Parametern $P_1, P_2 \dots P_i$ an die Messwerte erfolgte mit „OriginPro 7.0“ (Microcal) um diejenige Funktion zu finden, welche die Messdaten am

besten beschreibt. Nach manueller Auswahl der anzupassenden Funktion und der Initialisierung der Startwerte für die P_j ($j \in \{1..i\}$) variiert der verwendete Levenberg-Marquard Algorithmus automatisch die Parameter P_j so, dass die quadratische Summe der Abweichungen zwischen den Funktionswerten und den Messdaten minimal wird („*least-squares-fit*“).

2.4.18 Signalpeptide

Die unten aufgelisteten Signalpeptide und Antikörper wurden in asymmetrischer Messung (siehe 2.7.2) jeweils auf der Niedrigsalzseite des *Bilayers* zugegeben und der Effekt auf den Strom I und das Umkehrpotenzial U_{rev} mit Spannungsrampen untersucht. Die Präsequenzpeptide, ihre Analogons und die verwendeten Antikörper wurden zusätzlich in symmetrischer Messung beidseitig zugeführt, und der Effekt auf den Strom I und die Schaltaktivität (Schaltereignisse·s⁻¹) untersucht. Das synthetische Präsequenzpeptid **pCytOxIV** wurde in unserer Arbeitsgruppe ursprünglich zur Untersuchung der Eigenschaften der Protein Importpore Tom40 aus der äußeren Mitochondrien Hüllmembran verwendet (Hill *et al.*, 1998), und freundlicherweise auch für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. pCytOxIV ist die Zielsequenz der Cytochrom Oxidase Untereinheit IV, besteht aus 23 Aminosäureresten und trägt 4 positive Ladungen bei neutralem pH. Das Peptid enthält 39% aus polaren- und zu 30% aus hydrophoben Aminosäureresten. Die Sekundärstruktur bildet sich analog zur typischen Sekundärstruktur mitochondrialer Transitpeptide als amphipatische α -Helix aus. Das pCytOxIV hat eine Länge von etwa 4 nm, und einen Durchmesser d_{Helix} von 1,8 nm. Nur wenn künstlich synthetisiertes pCytOxIV mit CoxIV (Cytochrom-Oxidase Untereinheit IV, ohne Präsequenzpeptid) fusioniert wird, kann das Protein in die Mitochondrien importiert werden. Es eignet sich daher auch für Importstudien. Das Präsequenzpeptid **SynB₂** hingegen erwies sich als unwirksam in Importexperimenten. **SynB₂** ist eine künstliche Aminosäuresequenz mit 23 Resten. Dieses Peptid wurde mit 4 positiven Ladungen bei neutralem pH, analog zu der Anzahl von positiven Ladungen bei pCytOxIV entworfen. Der Anteil an polaren Aminosäureresten (61%) ist jedoch deutlich höher als bei pCytOxIV. In wässriger Lösung liegt es, aufgrund seiner starken Polarität in einer *random coil* Konformation vor. Die Abmessungen dieses Peptides betragen ca. 3,1-3,7 nm (Allison und Schatz 1986).

M L S L R Q S I R F F K P A T R T L S S S R Y
 + + + + +

Abbildung 2.8: Sequenz von pCytOxIV₁₋₂₃; hydroxylierte Reste (Serin, Threonin) sind rot dargestellt, positiv geladene Reste (Arginin, Lysin) sind mit Symbolen (+) markiert.

M L S R Q Q S Q R Q S R Q Q S Q R Q S R Y L L
 + + + + +

Abbildung 2.9: Sequenz von SynB_{2,1-23}; hydroxylierte Reste sind rot dargestellt, positiv geladene Reste sind mit Symbolen (+) markiert.

Das Protein **b₂-167-Δ-DHFR** ist ein Fusionsprotein aus der Präsequenz von Cytochrom (b₂) und der Dihydrofolat Reduktase (Hill *et al.*, 1998). Dieses Protein stellt eine Chimäre dar, deren Import keinen physiologischen Hintergrund hat und lediglich von der verwendeten Präsequenz (hier: b₂) abhängt. In elektrophysiologischen Studien dient es daher als Kontrollprotein (Hill *et. al.*, 1998). Dieses Volllängenprotein (8,1 µM) wurde in 20 mM MOPS/KOH pH 8,0 mit 1 mM EDTA und 300 mM NaCl bei -80°C gelagert und bei RT für Messungen am planaren Bilayer verwendet.

2.4.19 Peptidfragmente des Phosphat-Carriers aus der IMM

Die nachfolgend aufgelisteten Peptide repräsentieren lineare Aminosäuresequenzen des Phosphat Carriers aus der IMM (PCP → *Phosphate-Carrier-Protein* aus *Saccharomyces cerevisiae*; synonym zum *Mitochondrial import receptor1* (Mir1p). Der PiC ist ein nicht essenzielles Protein bei Hefe und kann für Importexperimente verwendet werden (Zara *et al.*, 1991). Der PiC wird über Tim22 in die IMM importiert (Hier werden die Fragmente für elektrophysiologischen Experimente verwendet.

Sequenz: P1	I P Y N I A K F L V F E R
Sequenz: P2	T S T T L L N L L S G L T
Sequenz: P3	S Q P A D T L L S K V N K
Sequenz: P4	G I Y G S L K S T L G C P
	+ + + + +

Abbildung 2.10: Aminosäuresequenzen von P1 bis P4; hydroxylierte Reste sind rot dargestellt, positiv geladene Reste sind mit Symbolen (+) markiert.

2.4.20 Verwendete Antikörper

Bei den immunologischen Untersuchungen zur Identifizierung von Tim23 wurden polyklonale Antiseren aus Kaninchen (engl.: *rabbit, rab*) verwendet. Diese Antikörper, und die dazugehörigen Preimmunserums Kontrollen, wurden mir freundlicherweise von Dr. Kaye Truscott (Arbeitsgruppe Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

Ig 133

Dieser Antikörper bindet speziell an die amino-terminalen 15 Aminosäuren der IMS-Domäne von Tim23:

M S W L F G D K T P T D D A N
+

Abbildung 2.11: Zielsequenz von Ig133 ; hydroxylierte Reste sind rot dargestellt, positiv und negativ geladene Reste sind mit Symbolen (+/-) markiert.

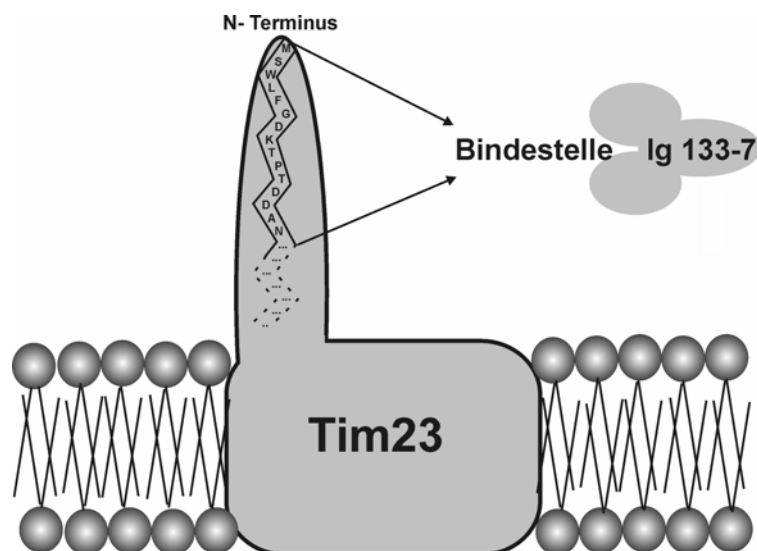


Abbildung 2.12: Bindestelle von Ig133-7.

Ig 239

Dieser Antikörper bindet ebenfalls an die IMS-Domäne von Tim23 (siehe auch 1.6.1). Seine Spezifität ist jedoch eingeschränkt auf einen langen Sequenzbereich zwischen der Aminosäure 1 und 96. Dieser Antikörper wurde durch eine Injektion der gesamten IMS-Domäne von Tim23 in Kaninchen erzeugt.

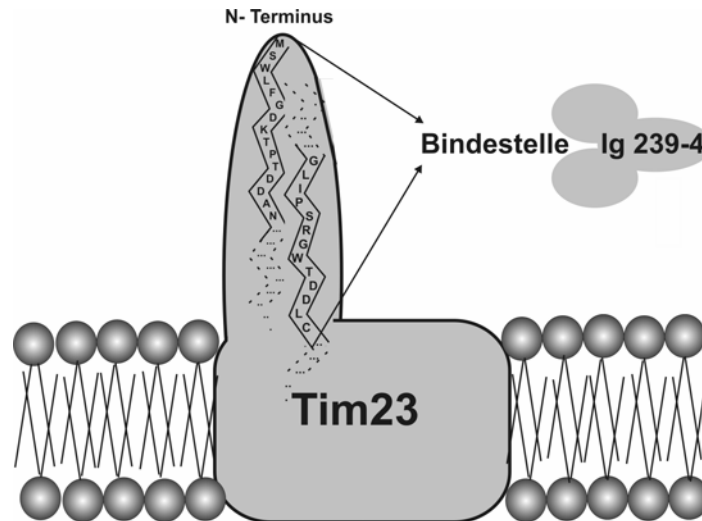


Abbildung 2.13: Bindestelle von Ig239-4.

2.5 Verwendete Geräte und Chemikalien

Die in den Experimenten benutzten Chemikalien wurden aus handelsüblichen Quellen bezogen und entsprachen den analytischen Reinheitsanforderungen. Die Lösungen und Messpuffer wurden mit $H_2O_{Bideist}$ aus einer Milli-Q-Water-System Filteranlage angesetzt.

Präparation

Ultrazentrifuge

Beckmann L5-65B, L-70 K

Tischzentrifuge

Eppendorf 5402

Ultraschallgerät

Branson Sonifier Cell Disruptor_{B15}

Gelapparatur

vertikales Minigelsystem (Biorad)

Speed Vac

Savant

Bilayermesstand und Auswertung

Funkenstrecke	Eigenbau, Elektronikwerkstatt
Messstand (Faraday Käfig)	Eigenbau, Elektronikwerkstatt
Schwingungsdämpfer	Luigs und Neumann
Doppelkammermesssystem	Eigenbau, Feinmechanikwerkstatt
Binokular	Olympus
Messverstärker	Gene Clamp 500, Axon Instruments
Headstage	Axon Instruments CV-5
Filter	920, Frequency Devices
Perfusion	manuell mit Spritzen
AD/DA Wandler	Axon Instruments, Digidata 1200
Computer und Datenspeicher	PC 586/350 II, Intel Corp., USA

2.5.1 Messpuffersysteme für die Elektrophysiologie

Osmotische Fusion:

250:20 mM KCl, 10:0 mM CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 (alle Proteine außer IMV, 100 μM CaCl₂)

1000:20 mM KCl, 10:0 mM CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

Leitwerte:

250:20 mM KCl, 100 μM CaCl₂ in 10 mM MOPSTris pH 7.0 (asymmetrische Bedingungen)

100:100 mM KCl, 100 μM CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

250:250 mM KCl, 100 μM CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 (symmetrische Bedingungen)

Selektivität:

250:20 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

20:250 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

250:20 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 4.0

20:250 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 4.0

250:20 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 9.0

20:250 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 9.0

250:20 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 5.0

20:250 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 5.0

Einfluss von Signalpeptiden:

250:20 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 (asymmetrische Bedingungen, Zugabe *trans*)

20:250 mM KCl in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0 (asymmetrische Bedingungen, Zugabe *cis*)

250:20 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 4.0 (asymmetrische Bedingungen, Zugabe *trans*)

20:250 mM KCl in 10 mM Na/HAc pH 4.0 (asymmetrische Bedingungen, Zugabe *cis*)

Porengrößenbestimmung

Kontrolle:

100:100 mM KCl, 100 μ M CaCl₂ in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

PEG:

100:100 mM KCl mit 15% (w/v) PEG x in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

100:100 mM KCl mit 20% (w/v) PEG x in 10 mM MOPS/Tris pH 7.0

2.5.2 Chemiekalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (AA)	Sigma, Deisenhofen
Adenosindiphosphat (ADP)	Merck, Darmstadt
Agarose (peq GOLD)	peqLAB, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
Bisacrylamid (Bis)	Sigma, Deisenhofen

Cäsiumchlorid (CsCl)	Roth, Karlsruhe
Chloroform (CHCl ₃)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R – 250	Serva, Heidelberg
Essigsäure (HAc)	Roth, Karlsruhe
Glyzin (G)	Biomol, Hamburg
Heptyl- β-thioglucopyranosid (HPTG)	Calbiochem
3-(N-(Morpholino-)propansulfonsäure (MOPS)	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid(KCl)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Methanol (CH ₃ OH)	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykole	Sigma, Deisenhofen
SIV-S Lipid (L-α-Phosphatidylcholin)	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TMEDA, TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	

Die verwendeten Chemikalien stammen aus handelsüblichen Quellen und waren vom Reinheitsgrad pro analysi. Das Detergens Mega9 (Nonaoyl-5-Methylglucamid) wurde überwiegend aus laboreigener Synthese verwendet. Die Membranproteine Tim23_{rekom}, tim23-1_{rekom}, tim23-2_{rekom}, Tim23_C und Tim22_{rekom} wurden von Dr. Kaye Truscott (Arbeitsgruppe von Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) rekombinant in *E. coli* angereichert, aufgereinigt und uns für die *Bilayer*-messungen zur Verfügung gestellt. Die BN-PAGE Auftreinigung von TIM22-Komplexen wurde von Dr. Peter Rehling (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt. Das künstliche Präpeptid der Cytochrom Oxidase Untereinheit IV₍₁₋₂₃₎ (pCytOxIV) wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. Nikolaus Pfanner (Universität Freiburg) für die Messungen an den IMM-Vesikeln und Tim23_{rekom} zur Verfügung gestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Tim23

3.1.1 Biochemie

3.1.1.1 Isolation von Tim23_{rekom}

Tim23_{rekom} wurde mit einem amino-terminalen His₁₀-tag von einem pET10N-Plasmid in *E. coli* (C43) exprimiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen lysiert, die Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) isoliert und anschließend denaturiert (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0). Das His₁₀-Tim23-Protein wurde danach mit Hilfe einer NiNTA-Agarose-Säule abgetrennt. **Abbildung 3.1** zeigt die dazugehörige SDS-PAGE (Erklärungen, siehe Legende).

Die Expression und Aufreinigung von Tim23_{rekom} wurde von Dr. Kaye Truscott (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt.

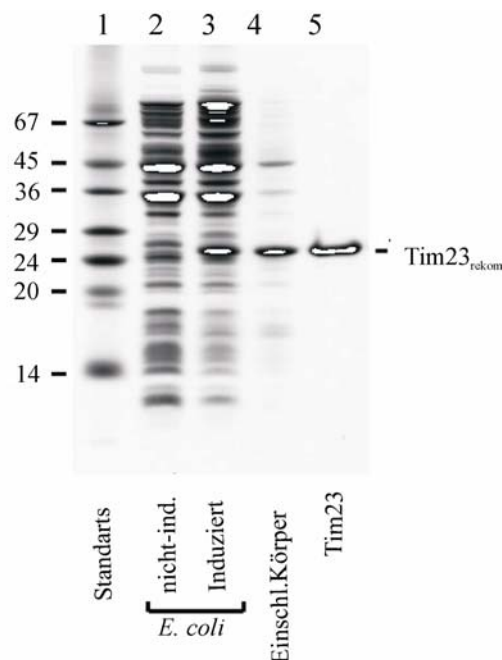


Abbildung 3.1: SDS-PAGE Analyse der Expression und Aufreinigung von Tim23_{rekom}. Die Färbung der SDS-PAGE wurde mit Coomassie Brilliant Blue R-450 durchgeführt (entnommen aus Truscott *et al.*, 2001).

3.1.1.2 Trennung von OMM und IMM

Die Trennung der OMM von der IMM aus isolierten Hefemitochondrien wurde von Dr. Andreas Geissler (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt. Die Mitochondrien ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Protein) wurden für 30 min auf Eis osmotisch geschwollen (10x Verdünnung mit 20 mM HEPES-KOH pH 7.2, 1 mM PMSF) und damit in Mitoplasten überführt. Danach wurde der isotonische Zustand wiederhergestellt und die Mitoplasten zur Erzeugung von Membranvesikeln mit Ultraschall behandelt.

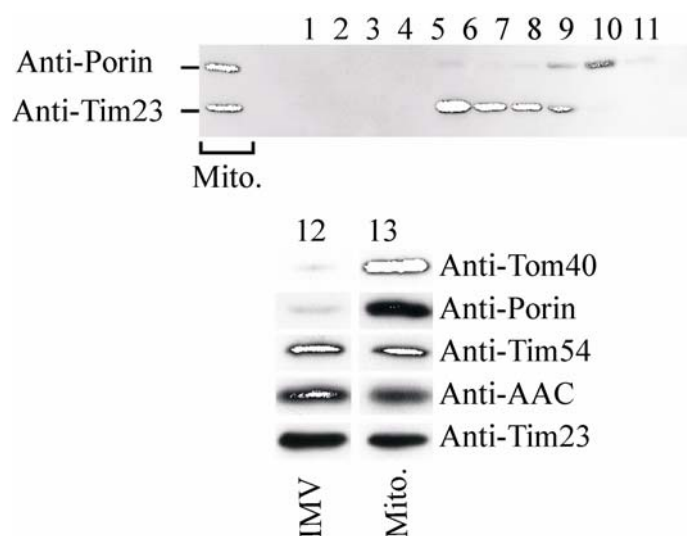


Abbildung 3.2: Trennung von OMV und IMV bei *S. cerevisiae*. (oben) SDS-PAGE der Saccharose-Dichtegradientenfraktionen 1-11. (unten) Kontrolle der Trennung von OMV und IMV über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse mit Hilfe von membranspezifischen Markern (entnommen aus Truscott *et al.*, 2001).

Die Rohvesikel wurden dann über differentielle Zentrifugation ($20.000 \times g$) isoliert und die Pellets resuspendiert (5 mM HEPES-KOH pH 7,2 mit 10 mM KCl, 1 mM PMSF). Innenmembran- (IMV) und Außenmembran-Vesikel (OMV) wurden auf einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (0,85%-1,6% Saccharose) durch eine 16 h Zentrifugation bei $100.000 \times g$ voneinander getrennt. Die Gradientenfraktionen wurden nachfolgend über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (**siehe Abbildung 3.2**). Die Isolation der Hefemitochondrien und die Trennung der OMV von der IMV wurden von Dr. Andreas Geissler (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt.

3.1.1.3 Isolation von Tim54_{rekom} and Tim18_{rekom}

Die Aufreinigung erfolgte nach Hill (1998). Nach dreistündiger Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen lysiert und die *inclusion bodies* gesammelt. Anschließend wurden die Tim54- und Tim18-Proteine denaturiert (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), und über NiNTA-Chromatographie isoliert (Gele nicht gezeigt).

3.1.2 Elektrophysiologische Messungen an Tim23_{IMV} und Tim23_{rekom}

3.1.2.1 Fusion von IMV-Vesikeln mit planaren *Bilayern*

Um die Eigenschaften von Tim23_{IMV} zu charakterisieren kann man IM-Vesikel unter Ultraschall mit Liposomen vermischt, bei asymmetrischen Bedingungen mit dem planaren *Bilayer* fusionieren (siehe Puffersysteme 2.7.2). Die Selektivitätseigenschaften werden unter 3.4.4. weiter untersucht. Im Folgenden wird immer wieder auf die IMV zurückgegriffen um die Relevanz der zu Tim23_{rekom} ermittelten Daten zu überprüfen.

3.1.2.2 Leitwerte und Schaltverhalten von Tim23_{IMV}

Um die Leitfähigkeit und das Schaltverhalten von Tim23_{IMV} aus *S. cerevisiae* näher zu charakterisieren wurden Spannungssprünge unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2.) aufgezeichnet und das Schaltverhalten mit Hilfe einer *Mean-Variance* Darstellung (siehe 2.4.9.) sowie einer Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität näher beschrieben. **Abbildung 3.3** zeigt exemplarische Stromspuren Tim23_{IMV}. Der Kanal besitzt einen Hauptleitwert von 448 ± 10 pS und zahlreiche Unterleitwerte von ~ 75 pS. In der **Abbildung 3.3 a)** ist zu erkennen, dass neben großen 450 pS-Amplituden auch kleinere 75 pS-Inkrementen und ihre Vielfache (bis zu 6) auftreten.

In der *Mean-Variance*-Darstellung kann man zeigen, dass es nur selten zum vollen Durchschalten über 450 pS kommt. Tim23_{IMV} zeigt eine rege Schaltaktivität mit 10 bis 50 Schaltereignissen $\cdot s^{-1}$. Dabei zeigt sich bei den vorliegenden Bedingungen keine

spannungsabhängige Erhöhung der Schaltaktivität (siehe **Abbildung 3.3b**), aber ein vom Membranpotenzial abhängiges Öffnen der im *Bilayer* befindlichen Kanäle (siehe **Abbildung 3.3c**).

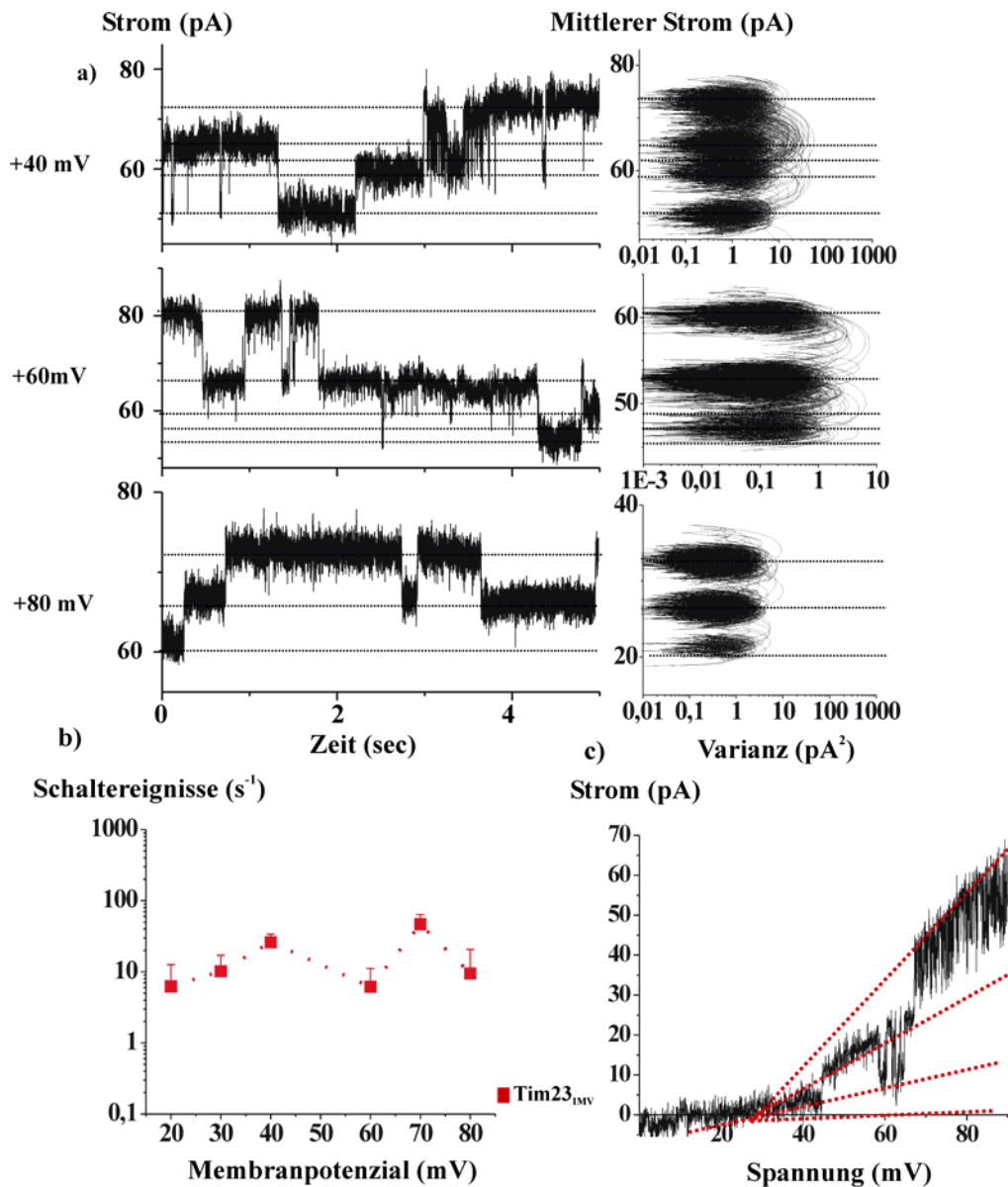


Abbildung 3.3: Schaltverhalten von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$. a) Stromspuren von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ unter symmetrischen Bedingungen (250 mM KCl, siehe 2.7.2) mit korrespondierenden *Mean-Variance* Darstellungen. b) Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$. c) Spannungsrampe mit $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ bei symmetrischen Bedingungen. [Filter: a) 10 kHz, c) 2 kHz].

3.1.2.3 Selektivität von Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV}

Die Selektivität von Tim23_{rekom} wurde durch Messungen des Umkehrpotenzials U_{rev} in asymmetrischen Hochsalzpuffern bestimmt (siehe 2.7.2). Dabei zeigt Tim23_{rekom} ein Umkehrpotenzial von $U_{rev}=49\pm 5$ mV ($n>10$). Nach der GHK-Spannungsgleichung ergibt sich ein Permeabilitätsverhältnis von 16:1 für Kalium gegenüber Chlorid. Für die Strom-Spannungskennlinie vom am häufigsten auftretenden Leitwert ergibt sich ein Betrag von 260 ± 5 pS. Um die Diskriminierung oder Bevorzugung einzelner Kationenspezies zu untersuchen, können im Rahmen bi-ionischer Messungen alle monovalenten Alkalimetalle mit Kalium verglichen werden. (siehe 2.4.3.) Die Permeabilität kann aus der GHK-Spannungsgleichung (siehe 2.4.2) berechnet werden, wobei $P_K^+=1$ gesetzt wird. **Tabelle 3.1** zeigt die ermittelten Umkehrpotenziale und die errechneten jeweiligen Permeabilitäten der Alkaliionen gegenüber Kalium (Formel 2.4). Zum Vergleich sind auch die Diffusionskoeffizienten der Alkaliionen und deren Quotienten D_K^+/D_X^+ aufgeführt.

Ionenspezies	E_{rev}	P_K^+/P_X^+	$D_{20,w}^0 (\cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1})$	D_K^+/D_X^+	Anzahl Versuche
Lithium	$14 \pm 1,4$ mV	$0,6 \pm 0,1$	1,03	1,9	(n=4)
Natrium	$3,9 \pm 0,6$ mV	$0,9 \pm 0,1$	1,33	1,47	(n=3)
Kalium	± 0 mV	1	1,96	1	(n>100)
Rubidium	$-3,2 \pm 0,4$ mV	$1,1 \pm 0,1$	2,07	0,95	(n=2)
Cäsium	$-4,8 \pm 0,3$ mV	$1,2 \pm 0,1$	2,06	0,95	(n=3)

Tabelle 3.1 : Ergebnisse der bi-ionischen Messungen an Tim23_{rekom} mit monovalenten Alkaliionen (siehe Material und Methoden 2.4.3.).

Aus den Permeabilitäten ergibt sich für den durch Tim23_{rekom} konstituierten Kanal die Eisenmann Reihe I ($\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$). Nach Eisenmann stellt der Selektivitätsfilter also eine „*weak-field-strength-site*“ dar, d.h. die Dehydratisierungsenergie beeinflusst die Diffusion der Ionenspezies durch die Pore (siehe 2.4.3), denn die Mobilität der Ionen entspricht weitgehend ihren Äquivalenzleitfähigkeiten (vergleiche mit **Tabelle 2.2** und **2.3**).

3.1.2.4 Selektivität von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$

Die Selektivität von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ wurde durch Messungen des Umkehrpotenzials U_{rev} in asymmetrischen Hochsalzpuffern bestimmt (siehe 2.8.1). **Abbildung 3.4** zeigt die Strom-Spannungskennlinie von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$. Dabei zeigt der durch $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ konstituierte Kanal ein Umkehrpotenzial von $U_{\text{rev}}=45\pm 5\text{ mV}$ ($n > 10$). Nach der GHK-Spannungsgleichung ergibt sich ein Permeabilitätsverhältnis von $\sim 11:1$ für Kalium gegenüber Chlorid. Für den Hauptleitwert ergibt sich ein Betrag von $280\pm 10\text{ pS}$.

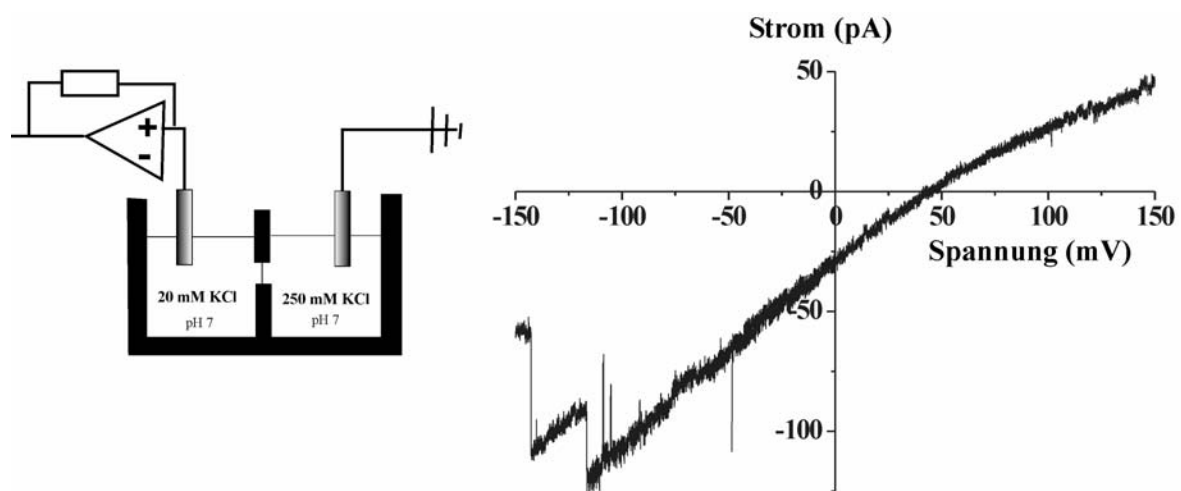


Abbildung 3.4: Selektivität von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$.

Spannungsrampe eines Bilayers mit einer aktiven Einheit von $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ unter asymmetrischen Bedingungen (siehe Abbildung der Messkonfiguration in 3.9, siehe auch 3.4.4. und 2.7.2)[Filter: 2 kHz]

3.1.2.5 Leitwerte und Schaltverhalten von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$

Um die Leitfähigkeit sowie das Schaltverhalten von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ näher zu charakterisieren können Spannungssprungexperimente unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) durchgeführt, und die erhaltenen Schaltmuster in eine *Mean-Variance* Darstellung überführt werden (siehe 2.4.9). **Abbildung 3.5** zeigt den linearen Verlauf der Strom-Spannungskennlinie des prominentesten Leitwertes Λ bei $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$. Sowohl bei positiven, als auch bei negativen Potenzialdifferenzen zeigt $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ unter symmetrischen

Bedingungen (250 mM KCl, siehe 2.7.2) einen Hauptleitwert von 450 ± 11 pS und ganzzahlige Vielfache ($1 \leq n \leq 6$) eines Unterleitwertes mit 75 ± 5 pS ($n=5$, siehe **Abbildung 3.6**). Daraus berechnet sich der Porenradius nach Hille (1992) zu $\sim 1,5$ nm (Länge des Restriktionsbereiches 0,5 nm, siehe Übersicht in **Tabelle 4.3**). Dabei traten minimal 3 Hauptleitwerte pro Pore auf (Strom $\sim 1,3$ nS).

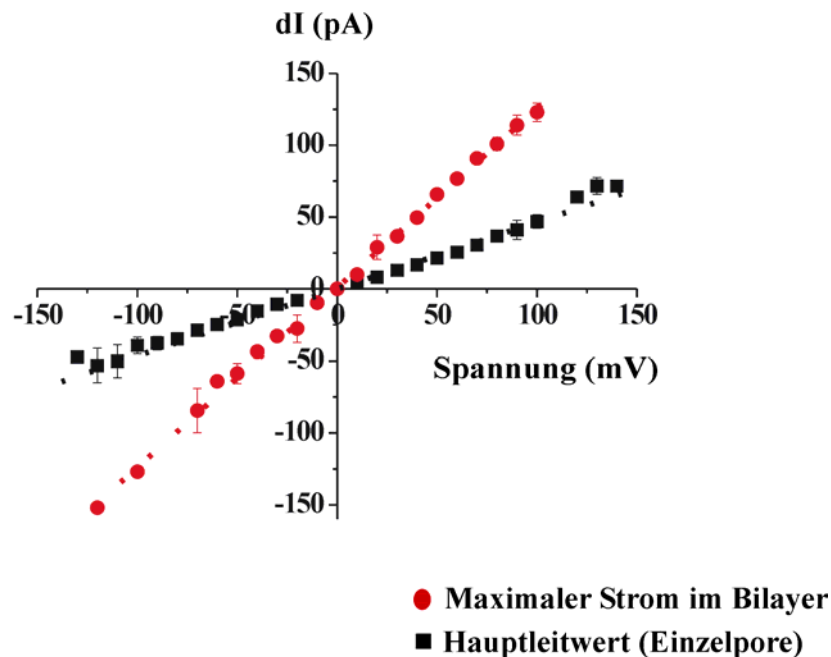


Abbildung 3.5: Leitfähigkeit von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$.

Strom-Spannungskennlinie des Hauptleitwertes von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Die Strom-Spannungskennlinie verläuft linear und zeigt einen Hauptleitwert von 450 pS und einen maximalen Strom von 1,3 nS ($n=5$ *Bilayer*).

Unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) zeigt der Kanal einen erniedrigten Hauptleitwert von ~ 280 pS. Eine *Mean-Variance*-Darstellung der erhaltenen Stromspuren aus *Bilayer*-messungen unter symmetrischen Salzbedingungen (siehe **Abbildung 3.6**) weist auf unabhängiges Schalten von Einzelporen mit je einem Hauptleitwert Λ von 450 ± 10 pS hin. Trotz einzelner gekoppelter Übergänge ist eine Kopplung der beteiligten Poren nicht zu beobachten. Bei einer Ionenkonzentration von 100 mM KCl zeigt der Kanal einen Hauptleitwert von 255 ± 5 pS, angesteuert durch sechs 42,5 pS Inkremente (siehe PEG-Messungen in 3.4.13). Eine graphische Auftragung der Anzahl geöffneter Kanäle kurz nach dem Spannungssprung gegen die angelegte Klemmspannung ergibt einen parabolischen

Zusammenhang zwischen der Öffnungswahrscheinlichkeit und dem angewendeten Haltepotenzial (siehe **Abbildungen 3.7a, b**). Mit zunehmender Spannung kommt es im *Bilayer* zu einer Zunahme an offenen Kanälen. Physiologische Spannungen induzieren das Öffnen aller im *Bilayer* befindlichen Kanäle, während länger angewendete hohe Spannungen ein allmähliches Schließen der Poren bewirken.

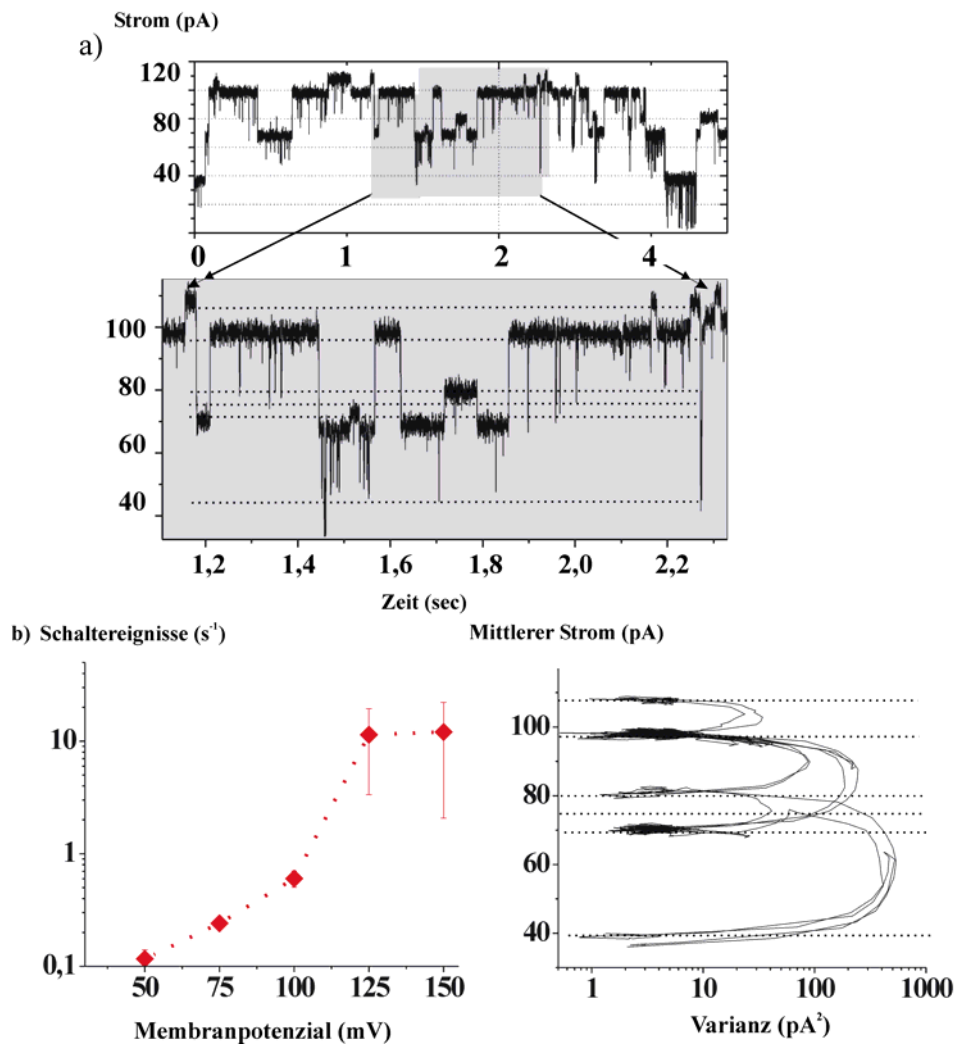


Abbildung 3.6: Schaltverhalten von Tim23_{rekom} bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2).

a) Stromspur von Tim23_{rekom} ($\phi_{mem} = +120$ mV) die grau unterlegten Bereiche sind zusätzlich zeitexpandiert dargestellt. Zusätzlich ist die expandierte Spur noch einmal in der *Mean-Variance* Darstellung abgebildet. **c)** Spannungsabhängigkeit der Schaltfrequenz von Tim23_{rekom} **c)** *Mean-Variance* Darstellung der zeitexpandierten Stromspur aus a. [Filter: 10kHz].

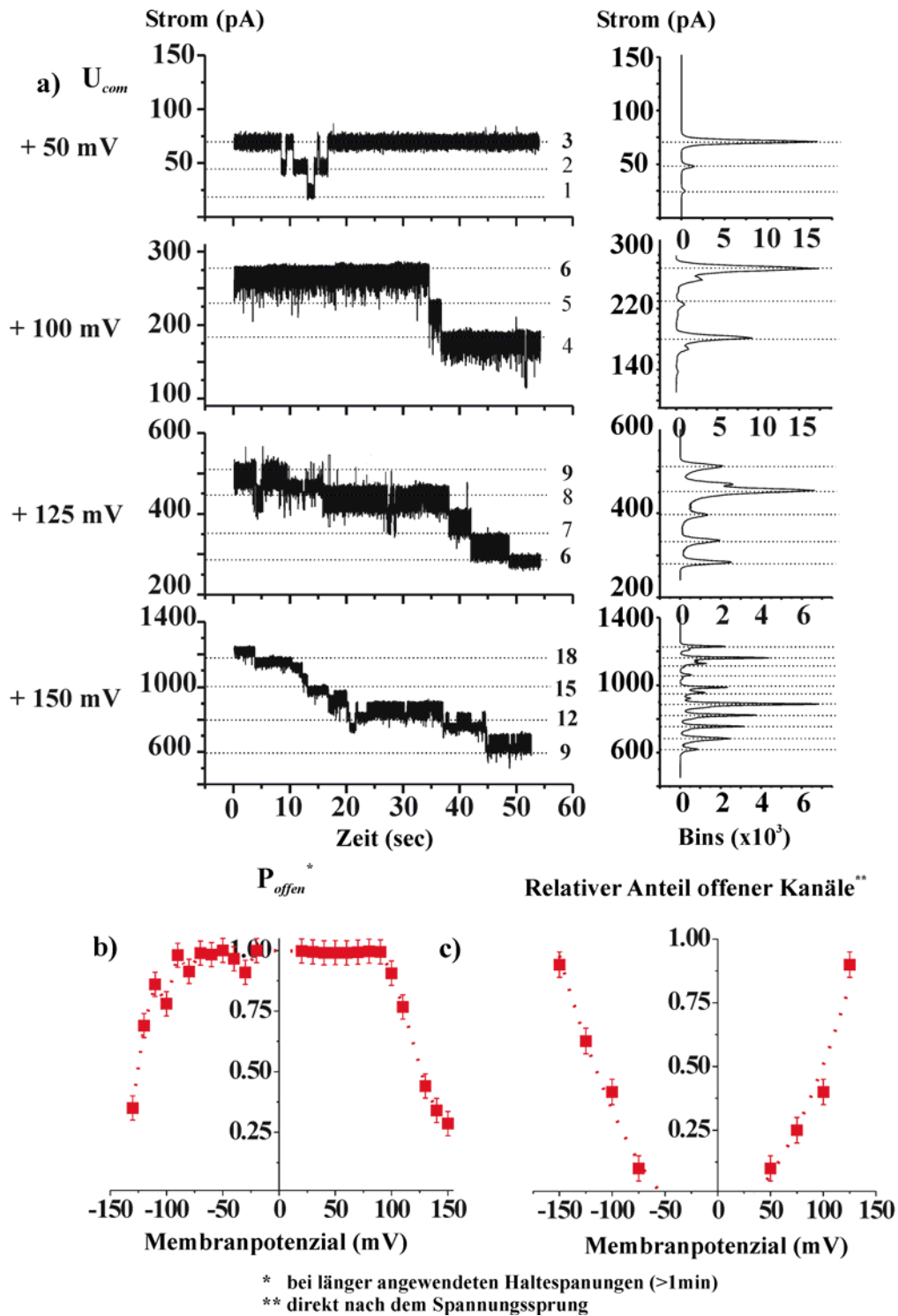


Abbildung 3.7: Spannungsaktivierung von $Tim23_{rekom}$.

a) Stromspuren eines *Bilayers* mit 18 Kopien von $Tim23_{rekom}$ unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) bei unterschiedlichen Klemmspannungen. b) Spannungsabhängigkeit von P_{offen} bei $Tim23_{rekom}$ unter symmetrischen neutralen Bedingungen bei länger angewendeten Spannungen (siehe 2.7.2, $n=5$). c) Spannungsaktivierung von $Tim23_{rekom}$ [Filter: a) und b) 10 kHz] (3.13a entnommen aus Truscott *et al.*, 2001).

3.1.2.6 Anzahl Poren von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$.

Um die Porenanzahl einer einzelnen Einheit von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ zu bestimmen wurde aus $n=84$ Spannungssprüngen aus 14 Bilayern auf positive und negative Haltespannungen ($\pm 75, \dots, \pm 175$ mV) die maximale Anzahl Einzelkanäle bestimmt. Die Anzahl der Poren $\cdot \text{Bilayer}^{-1}$ sind in einem Histogramm aufgetragen. **Abbildung 3.8** zeigt die Ergebnisse als Histogramm (Klassenbreite: 1). In 50% der untersuchten Fälle traten *Bilayer* mit 3er Poren auf und in 37,5 % *Bilayer* mit 6 Poren. Jeweils weitere 7,1 % der untersuchten *Bilayer* wiesen 9 bzw. 18 Poren auf. Da die 3 Porenkombination mit 50 % weitaus am häufigsten auftrat, und die anderen Kombinationen lediglich Vielfache einer 3er Einheit darstellen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die 3er Poren Kombination eine $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ Einheit repräsentiert.

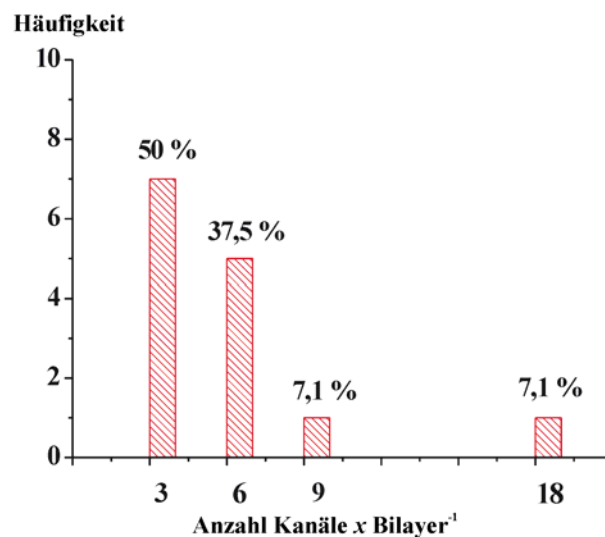


Abbildung 3.8: Histogramm zur Bestimmung der Anzahl Poren $\cdot \text{Tim23}_{\text{rekom}}$ -Einheit⁻¹.

Dargestellt sind die Anzahl Poren $\cdot \text{Bilayer}^{-1}$ aufgetragen gegen die Anzahl *Bilayer*. Die Klassenbreite beträgt 1 mit bei 14 Bilayern.

3.1.2.7 Offenwahrscheinlichkeit von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$

Um den Einfluss des Membranpotenzials ϕ_{mem} auf die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit P_{offen} von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ zu untersuchen, wurde es über

Spannungssprünge vermessen. **Abbildung 3.7 b)** zeigt die Offenwahrscheinlichkeit als Funktion des Membranpotenzials. $Tim23_{rekom}$ zeigt eine symmetrische Offenwahrscheinlichkeitsabhängigkeit mit einem weiten Maximum bei Spannungen kleiner ± 100 mV. Bei Spannungen unter ± 100 mV ($P_{offen} \leq 0,9 \pm 0,05$ bei $+100$ mV und $P_{offen} \leq 0,78 \pm 0,05$ bei -100 mV) liegt $Tim23_{rekom}$ fast immer vollständig geöffnet vor. Nach Überschreiten der ± 100 mV Schwelle beginnt der Kanal allmählich zu schalten ($P_{offen} \sim 0,75$, bei ± 110 mV). Im Spannungsbereich ab ± 100 mV zeigt $Tim23_{rekom}$ Schaltaktivität und liegt bei ± 125 mV halbmaximal geschlossen vor. Daraus berechnet sich die Anzahl der *gating charges* zu 2,9 (~ 3) Ladungen (siehe Material und Methoden. Unter mitochondrialen Ruhepotenzialbedingungen ($\phi_{resting\ potenzial} \sim \pm 150$ bis 180 mV) bleiben die Poren meist geschlossen ($n=5$ *Bilayer*). Dies gilt jedoch nur bei länger angewandten hohen Haltespannungen (≥ 1 min). Dieser Befund zeigt, dass das Membranpotenzial ϕ_{mem} einen starken Einfluss auf das Schaltverhalten von $Tim23_{rekom}$ ausübt, und dass der Kanal zwischen ± 100 und ± 25 mV, also bei niedrigen Spannungen, am inaktivsten ist. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit von $Tim23_{rekom}$ zu untersuchen, wurde $Tim23_{rekom}$ bei verschiedenen pH Werten unter asymmetrischen Bedingungen vermessen, (siehe 2.7.2), und dann Stromspuren aus Spannungssprüngen analog zu den Offenwahrscheinlichkeitmessungen in 3.4.7 ausgewertet. Nach Perfusion auf pH 4,0 (*cis* und *trans*) zeigt $Tim23_{rekom}$ eine asymmetrische Offenwahrscheinlichkeit (siehe **Abbildung 3.9a**). $Tim23_{rekom}$ zeigt eine starke Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Kommandospannungen. Es wurde untersucht ob die Asymmetrie der Offenwahrscheinlichkeitsfunktion auch bei stetigen schnellen Spannungsänderungen detektierbar ist. Es zeigt sich, dass $Tim23_{rekom}$ bei niedrig-pH beiderseits der Membran eine ausgeprägt asymmetrische Strom-Spannungskennlinie aufweist (Abbildung nicht gezeigt). Bei niedrig-pH Bedingungen beginnt der Kanal schon ab -50 mV zu schließen, während er bei positiven Spannungen auch im hohen Spannungsbereich geöffnet bleibt. Um den Effekt eines pH-Gradienten über die Membran auf die Offenwahrscheinlichkeit von $Tim23_{rekom}$ zu untersuchen, wurden zusätzlich Spannungsrampen unter symmetrischen Bedingungen bei unterschiedlichem pH zu beiden Seiten der Membran untersucht (siehe 2.7.2). $Tim23_{rekom}$ zeigt in auch in Anwesenheit eines pH-Gradienten über die Membran eine ausgeprägt asymmetrische Strom-Spannungskennlinie (Daten nicht gezeigt).

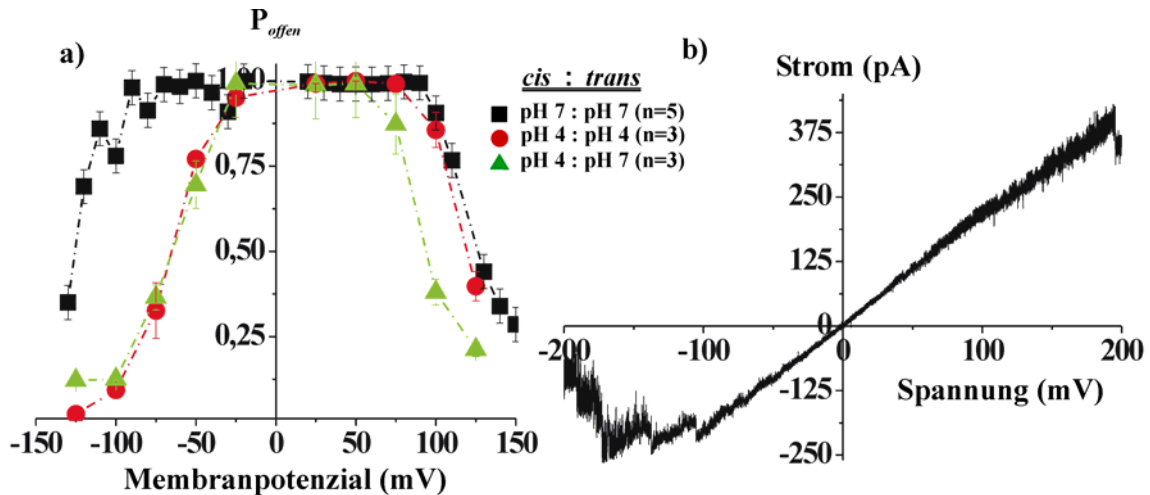


Abbildung 3.9: a) pH-abhängige Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von Tim23_{rekom}

Gemessen bei verschiedenen pH Bedingungen (250 mM KCl). Entgegen der Situation bei pH 7,0 zeigt sich ein starker Abfall der Offenwahrscheinlichkeit bei Spannungen ab -50mV und negativer. b) Kontrollrampen mit Tim23_{IMV} unter symmetrischen Bedingungen bei Bedingungen wie in a) (siehe 2.7.2) [Filter: b) 2kHz].

Es wurde untersucht ob die Asymmetrie des spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeitsverlaufs auch bei stetigen schnellen Spannungsänderungen detektierbar ist. Es zeigt sich, dass Tim23_{rekom} bei niedrig-pH beiderseits der Membran eine ausgeprägt asymmetrische Strom-Spannungskennlinie aufweist (Abbildung nicht gezeigt). Bei niedrig-pH Bedingungen beginnt der Kanal schon ab -50mV zu schließen, während er bei positiven Spannungen auch im hohen Spannungsbereich geöffnet bleibt. Um den Effekt eines pH-Gradienten über die Membran auf die Offenwahrscheinlichkeit von Tim23_{rekom} zu untersuchen, wurden zusätzlich Spannungsrampen unter symmetrischen Bedingungen bei unterschiedlichem pH zu beiden Seiten der Membran vermessen (siehe 2.7.2). Tim23_{rekom} zeigt in auch in Anwesenheit eines pH-Gradienten über die Membran eine ausgeprägt asymmetrische Strom-Spannungskennlinie (Daten nicht gezeigt). Bei niedrig-pH Bedingungen beginnt der Kanal schon ab einem Membranpotenzial von -70mV zu schließen, während er bei positiven Spannungen auch im hohen Spannungsbereich voll geöffnet bleibt. Sowohl die Offenwahrscheinlichkeitsmessungen, als auch die Spannungsrampen zeigen deutlich, dass Tim23_{rekom} von der *cis*-Seite (Matrixseite) her durch den pH beeinflussbar sein könnte. Die *trans*-Seite (IMS-Seite) zeigt sowohl bei den Offenwahrscheinlichkeitsmessungen, als auch bei den Spannungsrampen keine Veränderung der Offenwahrschein-

lichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Kontrolle wurden Strom-Spannungskennlinien von Tim23_{IMV} bei symmetrischen niedrig-pH Bedingungen untersucht (2.7.2). Zu diesem Zweck wurden mitochondriale Innenmembranen (IMV) mit Hilfe von Ultraschall und Gefriertauzyklen (siehe 2.1.3.) mit SIV-Liposomen fusioniert und mit Hilfe Spannungsrampen vermessen. Der Tim23_{IMV} besitzt bei pH 4,0 eine Strom-Spannungskennlinie mit einer ausgeprägten Asymmetrie. Die Reaktion des Kanals ist vergleichbar mit den Ergebnissen zum Tim23_{rekom}. Bei positiven Spannungen und niedrig-pH bleibt der Kanal auch bei hohen Spannungen noch voll geöffnet, wohingegen die Anwendung von Spannungsrampen im negativen Bereich ab Membranpotenzialen $\phi_{mem} \geq -100$ mV zu einem Schließen von Tim23_{IMV} führt.

3.1.2.8 Einfluss von pCytOxIV und SynB₂ auf Tim23_{rekom}

Der Einfluss von pCytOxIV und SynB₂ auf Tim23_{rekom} wurde in asymmetrischer Messung mit Spannungsrampen und kontrollierten Spannungssprüngen untersucht (siehe Material und Methoden 2.4.10 und 2.4.14).

Tim23_{rekom} zeigt nach Zugabe von pCytOxIV sowohl eine seitenspezifischen und von hohen Spannungen abhängige Aktivierung, als auch eine seitenabhängige Reduktion des Umkehrpotenzials U_{rev} . Die Zugabe von SynB₂ hingegen führt zu einem Verschluss der Pore. Die **Abbildung 3.10 a)** zeigt den Effekt von pCytOxIV auf Tim23_{rekom}, vor und nach Zugabe des Präsequenzpeptids (0,5 μ M). Während der Kanal in Abwesenheit der Peptide bei niedrigen Spannungen meist im Offenzustand vorliegt, so zeigt er nach Zugabe von pCytOxIV einen verminderten Gesamtstrom I_{max} ($35 \pm 10\%$, $n=10$) und ein spannungsabhängig beschleunigtes Schaltverhalten. Dann kommt es zu keiner vollständigen Kanalöffnung mehr. Spannungsrampen von Tim23_{rekom}, vor und nach Zugabe von definierten Konzentrationen an Präsequenzpeptiden, zeigen den Unterschied des Einflusses von pCytOxIV bzw. SynB₂ auf Tim23_{rekom}. Mikromolare Konzentrationen (10 μ M) der angewandten Peptide verursachen jeweils eine spannungsabhängige Blockierung ($n>10$). Während die Aktivierung durch pCytOxIV erst ab höheren Haltespannungen einsetzt, setzt der Verschluss durch SynB₂ direkt bei Überschreitung des Umkehrpotenzials ein. Im Gegensatz zu pCytOxIV ruft SynB₂ keine Erhöhung der Schaltaktivität hervor. Das Umkehrpotenzial U_{rev} bleibt nach Zugabe von

submikromolaren Konzentrationen an pCytOxIV fast unbeeinflusst. Im mikromolaren Bereich beginnt das Umkehrpotenzial stärker zu sinken, dabei zeigt die *trans*-Seite von Tim23_{rekom} eine stärkere Verminderung von U_{rev} gegenüber der *cis*-Seite. Deutlich wird dieser Effekt aber erst bei hohen Peptidkonzentrationen (10 μ M). (siehe **Abbildung 3.10b**). Die Zugabe von submikromolaren Konzentrationen an SynB₂ führt hingegen beidseitig zu keiner Änderung des Umkehrpotenzials U_{rev} , aber verschließt Tim23_{rekom} spannungsabhängig. Im Gegensatz zu pCytOxIV aktiviert SynB₂ Tim23_{rekom} jedoch nicht. Die Blockierung setzt mit dem Überschreiten des Umkehrpotenzials ein. Untersuchen bei niedrig-pH Bedingungen haben gezeigt, dass pCytOxIV auch bei pH 4,0 noch seitenspezifisch mit Tim23_{rekom} interagiert, während SynB₂ keine Wirkung zeigt (Daten nicht gezeigt).

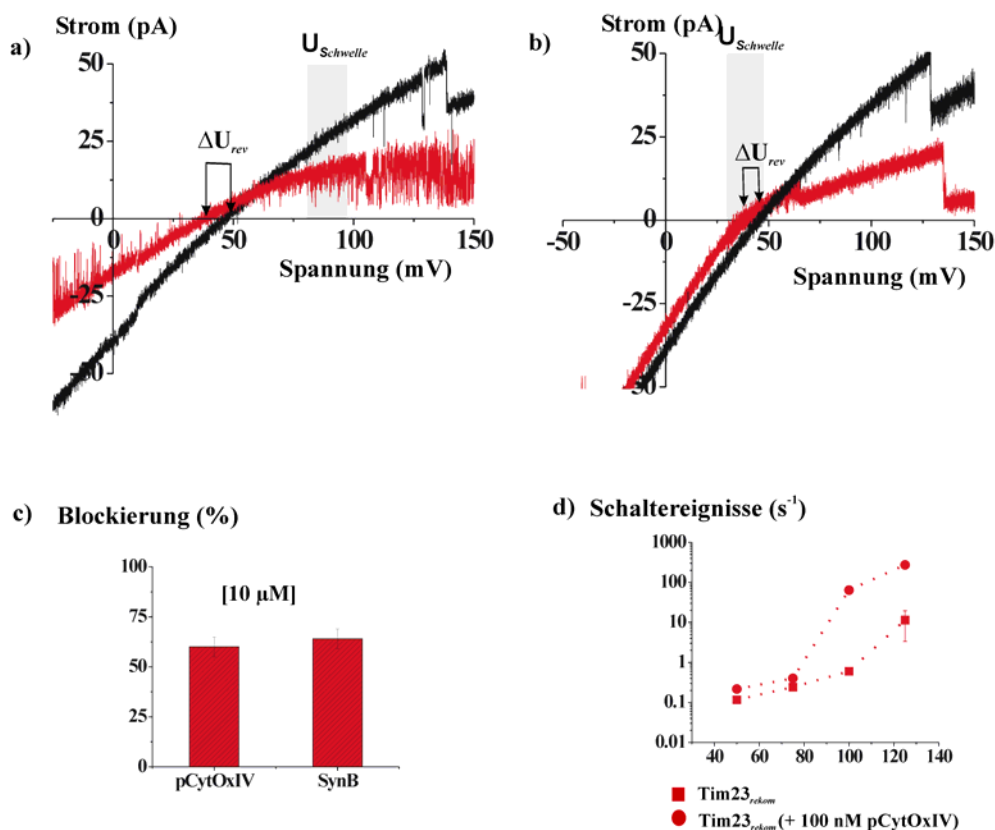


Abbildung 3.10: Einfluss von pCytOxIV und SynB₂ auf Tim23_{rekom}.

a) und **b)** Spannungsrampen vor und nach Zugabe von 10 μ M pCytOxIV (**a**) und SynB₂ (**b**), unter asymmetrischen Bedingungen. **c)** relative Stromreduktion (%) nach Zugabe von 10 mM Peptid in asymmetrischer Messung (siehe 2.7.2). **d)** Umkehrpotenziale von Tim23_{rekom} nach Zugabe von nano- und mikromolaren Konzentrationen an pCytOxIV bei asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Die Bereiche der Schwellenpotenziale $U_{schwelle}$ in a sind grau unterlegt [Filter a), b): 2 kHz, d) 5 kHz].

3.1.2.9 Einfluss von pCytOxIV auf Tim23_{IMV}

Um die Sensitivität von Tim23_{rekom} gegenüber Präsequenzpeptiden mit dem Effekt von pCytOxIV auf Tim23_{IMV} zu vergleichen wurden im Folgenden der Einfluss von pCytOxIV in asymmetrischer Messung, auf mit Liposomen fusionierte IMV untersucht.

Nach Zugabe von 1 μM pCytOxIV zeigt Tim23_{IMV} eine Abnahme des Umkehrpotenzials ($\Delta U_{rev} = -7 \pm 1 \text{ mV}$ ($n=3$)) und eine spannungsabhängige Aktivierung ab Kommando-
spannungen U_{com} von 40 mV (Abbildung hier nicht gezeigt, siehe hierzu Truscott *et al.*, 2001, Abbildung 4c). Spannungssprung-Experimente zeigen das Tim23_{IMV} nach Zugabe von 10 μM pCytOxIV (*cis* und *trans*) einen starke Zunahme der Schaltaktivität zeigt ($500\text{-}600\text{s}^{-1}$, $n=5$) Tim23_{IMV} ist schon bei niedrigen Spannungen durch pCytOxIV aktivierbar (ab +20 mV, siehe **Abbildung 3.11**).

3.1.2.10 Einfluss von b₂- Δ DHFR und P2 auf Tim23_{rekom}

Um den Einfluss eines Vollängenproteins auf Tim23_{rekom} zu untersuchen wurden Spannungsrampen unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) auf Tim23_{rekom} angewendet. Nach Kontrollmessung unter asymmetrischen Bedingungen wurde dann 8 nM b₂- Δ DHFR auf der Niedrigsalzseite hinzugefügt und die resultierenden Strom-Spannungskennlinien mit der Kontrolle verglichen. **Abbildung 3.12a** zeigt den Vergleich von Strom-Spannungskennlinien, vor und nach Zugabe von 8 nM b₂- Δ DHFR. Direkt nach der Zugabe zeigt der Kanal eine Änderung des Umkehrpotenzials U_{rev} auf $+40,5 \pm 1,3 \text{ mV}$ ($n=12$) und ein spannungsabhängiges Abknicken der Strom-Spannungskennlinie nach Überschreiten des Umkehrpotenzials U_{rev} . b₂- Δ DHFR blockiert den Kanal stark ($I_{DHFR} = 38,7 \pm 11,8\%$ des Ausgangsstromes I_{Tim23} , Schwellenwertpotenzial von $45 \pm 5 \text{ mV}$). Weiter wurde der Einfluss von P2 (siehe Material und Methoden 2.4.14) auf Tim23_{rekom} untersucht. Nach Zugabe von mikromolaren Konzentrationen (10 μM P2), unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2), auf der Niedrigsalzseite zeigt Tim23_{rekom} einen Verminderung des Stromes. Das Umkehrpotenzial ist nicht mehr genau bestimmbar, da der Kanal bei niedrigen positiven Spannungen nicht mehr öffnet.

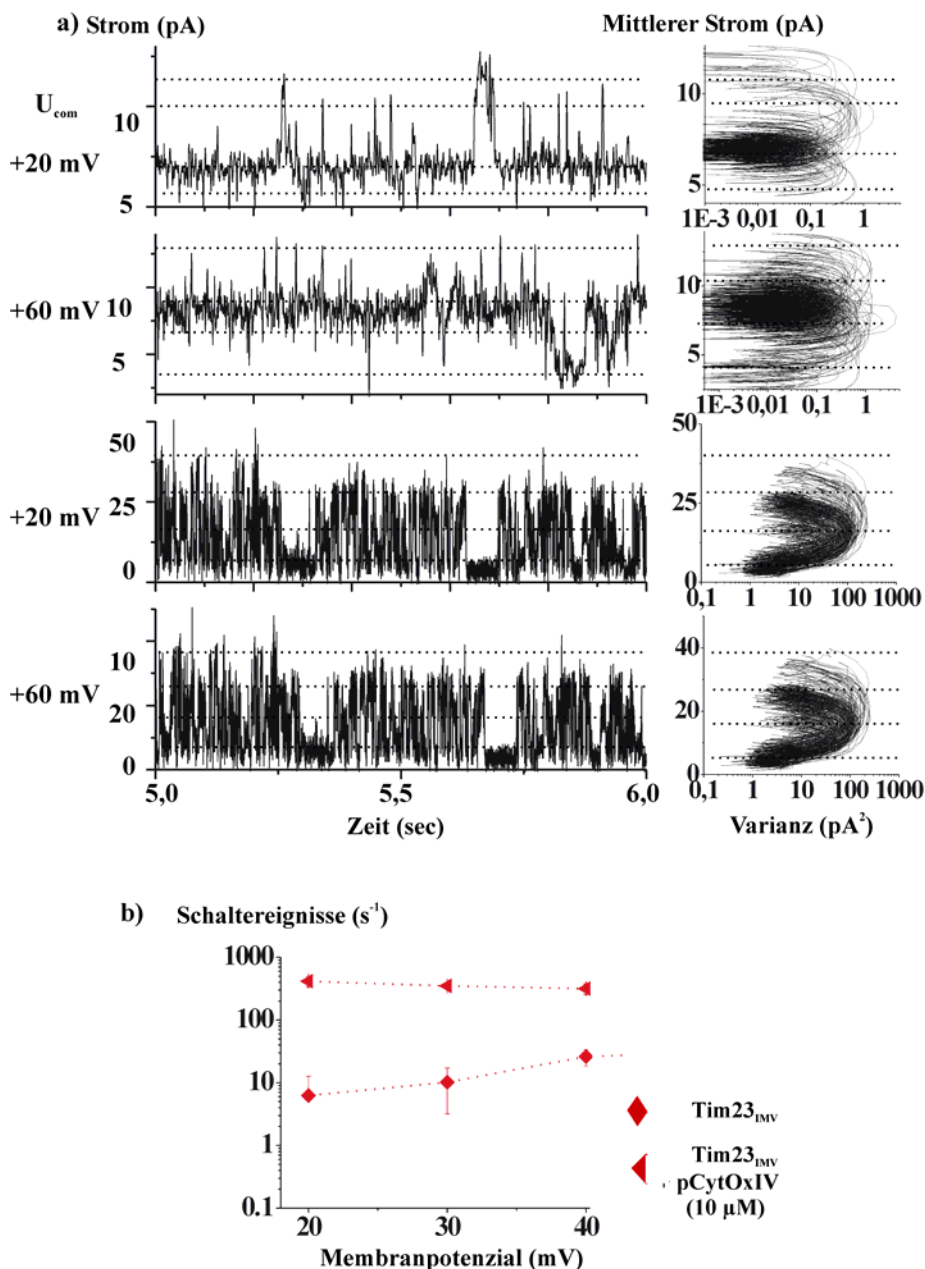


Abbildung 3.11: Einfluss von pCytOxIV auf Tim23_{IMV}.

a) Stromspuren eines *Bilayers* mit Tim23_{IMV} vor (obere zwei Graphen) und nach (untere zwei Graphen) Zugabe von 0,5 μM pCytOxIV von *trans*, unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). **b)** Spannungsabhängigkeit der Schaltfrequenz nach Zugabe von 100 nM pCytOxIV in asymmetrischer Messung nach Zugabe auf der Niedrigsalzseite (siehe hierzu 2.4.14.) [Filter: a) 5 kHz, 5 kHz].

Die **Abbildung 3.12b** zeigt Spannungsrampen mit Tim23_{rekom} vor und nach Zugabe von 10 μM P2 von *trans*. Die Rampen sind sequenziell koloriert (schwarz, grün, blau, türkis und pink). Dabei zeigt Tim23_{rekom} keine Änderung des Umkehrpotenzials U_{rev} , obwohl das Peptid

durch die Spannung in die Pore gedrückt werden kann. Auch nach Verschluss der Pore durch P2, ist es möglich das Peptid mit Hilfe einer hohen Spannung wieder aus der Pore herauszudrücken. Dabei interagiert Tim23_{rekom} mit P2 schon bei Überschreitung des Umkehrpotenzials (Schwellenwertpotenzial: 48 ± 5 mV unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2)).

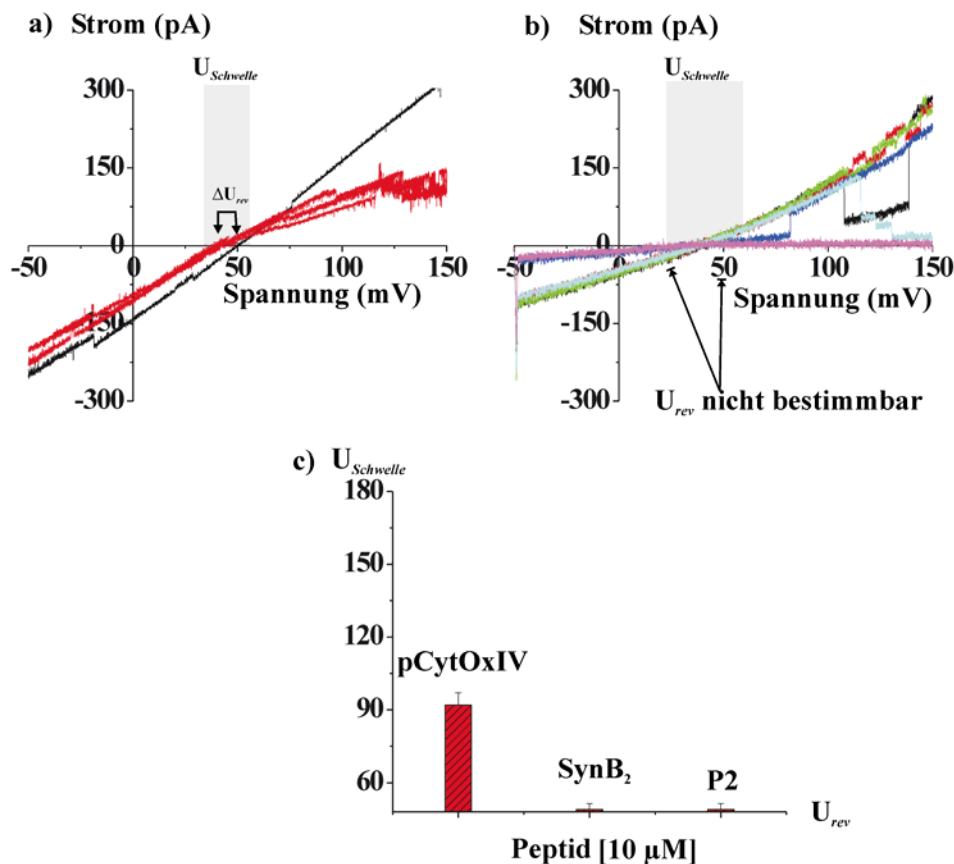


Abbildung 3.12 : Vergleich des Einflusses von b₂-ΔDHFR und P2 auf Tim23_{rekom}.

a) Effekt von b₂-Δ-DHFR [μM] auf Tim23_{rekom}. Spannungsrampen eines *Bilayers* mit 7-8 aktiven Kopien von Tim23_{rekom} vor (schwarz, 1 Kontrollspur) und nach (rot, 3 Rampen) Zugabe von 8 nM b₂-Δ-DHFR von *trans* unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). **b) Effekt von P2 [μM] auf Tim23_{rekom}.** Spannungsrampen eines *Bilayers* mit 2 aktiven Kopien von Tim23_{rekom} vor (schwarz) und nach (sequenziell koloriert) Zugabe von 10 μM P2 von *trans* (schwarz, rot, grün, cyan blau, Bedingungen wie in a)). **c) Schwellenpotenziale der Interaktion von Tim23_{rekom} mit Peptiden** [Filter: a) und b) 2 kHz].

3.1.2.11 Porendurchmesser von Tim23_{rekom}

Der Porendurchmesser von Tim23_{rekom} wurde mit der Polyethylenglykolausschluss-methode bestimmt (Krasilnikov *et al.*, 1987; Smart *et al.*, 1997, siehe Material und Methoden 2.4.13). Zusätzlich wurde der ungefähre Porendurchmesser mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen nach Hille (Hille 1992) bestimmt In **Tabelle 4.3** sind die aus dem Leitwert bestimmten Porendurchmesser vergleichend für alle untersuchten Proteine dargestellt. Die **Abbildung 3.13** zeigt die relative Leitfähigkeit von Tim23_{rekom} bei PEG-Anwesenheit in Abhängigkeit zu den verschiedenen hydrodynamischen Radien der verschiedenen PEG-Moleküle.

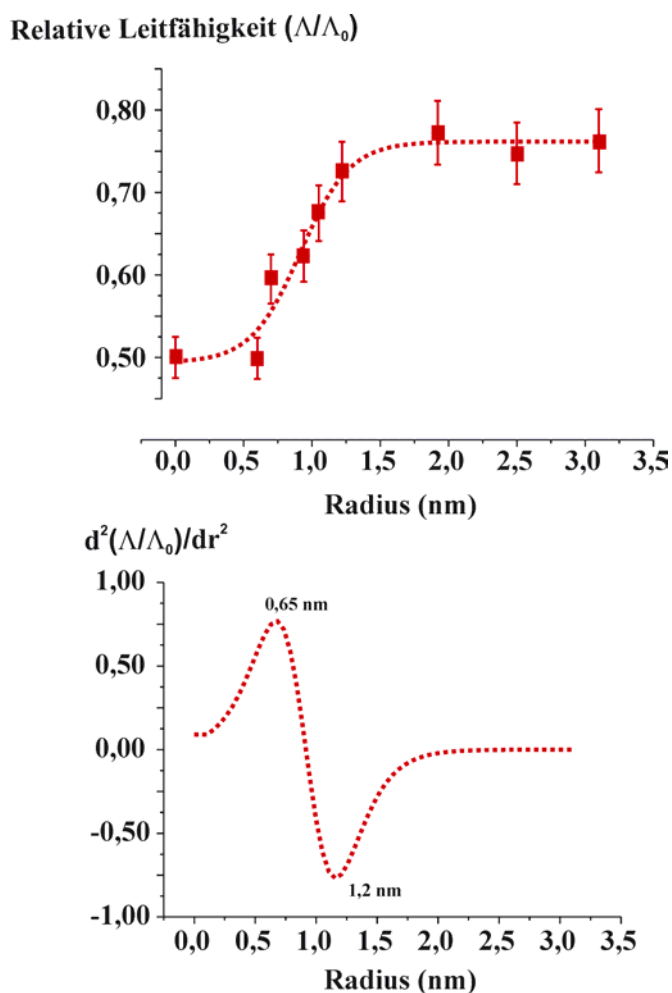


Abbildung 3.13: Bestimmung des Porenradius von Tim23_{rekom} mit der Polyethylenglykolausschlussmethode.

Dargestellt ist die relative Leitfähigkeit von Tim23_{rekom} vor (Λ_0) und nach Zugabe von PEG (Λ_{PEG}) mit verschiedenen hydrodynamischen Radien (oben), rechnerisch angepasst mit einer sigmoidalen Boltzmannfunktion (Microcal, Origin) und den Extremstellen der 2. Ableitung.

Für den voll geöffneten Kanal wurde ein Vestibül-Durchmesser von $\sim 2,4$ nm und ein Restriktionsdurchmesser im Inneren des Kanals von $\sim 1,4$ nm ermittelt. Leitfähigkeitsmessungen, ergeben einen Hauptleitwert von 450 ± 10 pS (250 mM, siehe auch 2.7.2). Dies entspricht nach Hille (1992) einem Kanaldurchmesser von $\sim 1,8$ nm (siehe Übersicht in **Tabelle 4.3**) Sowohl über die Leitfähigkeitsmessungen, als auch über die PEG-Ausschlussmethode konnten Porendurchmesser gleicher Größenordnung bestimmt werden.

3.1.2.12 Antikörper

Es wurden Kontrollexperimente mit den Antikörpern Ig 133-7 und Ig 239-4 durchgeführt, um nachzuweisen, dass es sich bei den Messungen um eine Kanalaktivität von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ handelt (siehe 3.5.1). Hierzu wird eine Membranspannung ϕ_{mem} von +75 mV angelegt und während der laufenden Messung beiderseits der Membran jeweils 6 μl Antikörperserum appliziert und die Lösung durchmischt. **Abbildung 3.15** zeigt die Messung vor (a) während (b) und nach (c) Zugabe des 133-7 Antikörpers. Bei einem Membranpotenzial von +75 mV sind alle drei Poren von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ geöffnet. Die Zugabe des Immunglobulins führt dabei zum Auftreten von schnellen Schließereignissen und so zu einer Stromreduktion von $15 \pm 5\%$. In einem weiteren Versuch soll die Seitenspezifität der Applikation von Immunglobulinen, welche spezifisch an die Spitze der N-terminalen extramembranösen Domäne des Tim23 -Kanals binden, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Spannungsrampen unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vor und nach Zugabe des Antikörpers Ig 239-4 auf der Niedrigsalzseite untersucht. Die **Abbildung 3.14a** zeigt $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ jeweils vor und nach Zugabe von je 6 μl Präimmenserum von *cis* und *trans*. Sowohl die Spannungsrampen vor, als auch die Spannungsrampen nach Zugabe des Präimmenserums von *cis* und *trans*, zeigen keine Veränderungen in Bezug auf die Kontrollspur. $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ zeigt weder eine Veränderung des Umkehrpotenzials noch einen reduzierten Strom. Die Anwendung des Antikörpers auf der *cis* Seite führt dabei zu keiner Veränderung des Stromflusses in Bezug auf die Kontrollspur, während die Zugabe von 6 μl Ig 239-4 auf der *trans* Seite zu einem sofortigen Selektivitätsverlust ($\Delta U_{\text{rev}} = -8$ mV) und zu einem stark verringerten Strom (relative Blockierung $29 \pm 2\%$ mit $n=2$) führt. Um den Effekt der Antikörperanwendung auf $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ mit der Wirkung des Antikörpers auf MCC-Aktivitäten aus IMV vergleichen zu können wurden mit Liposomen fusionierte IMV-Membranen mit Spannungsrampen vor

(schwarz) und nach (rot) Zugabe von Ig239-4 vermessen. Die **Abbildung 3.14b** zeigt Spannungsrampen des MCC-Kanals aus IMV in asymmetrischer Messung (2.7.2) vor und nach der Zugabe von Ig239-4 beiderseits der Membran. Nach Anwendung des Antikörpers zeigt sich ein starker Abfall der Selektivität ($\Delta U_{rev} = -14$ mV, $n=5$) und ein drastisch reduzierter Strom (relative Stromreduktion: 80 ± 10 %, $n=5$) durch den kationenselektiven IMV-Kanal.

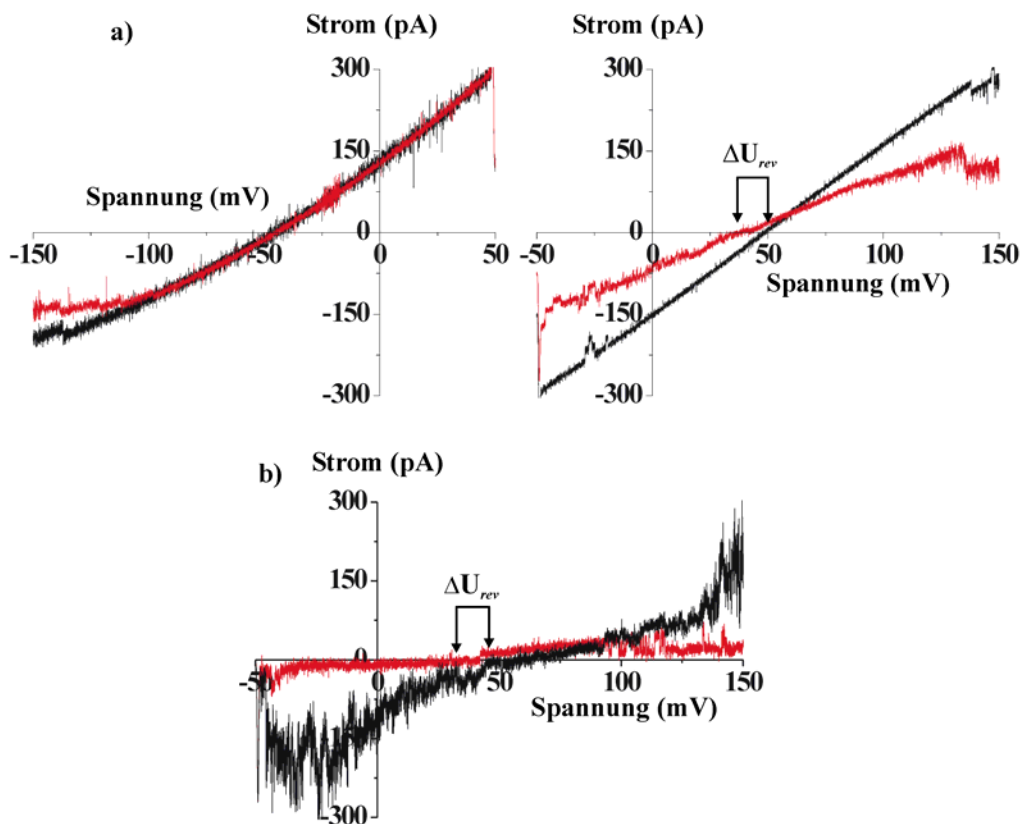


Abbildung 3.14: Effekt von Ig239-4 auf $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$. (a) und $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$. (b).

a) Spannungsrampen mit $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von $6 \mu\text{l}$ Ig239-4 von *trans* (rechts) und *cis* (links) unter asymmetrischen Bedingungen. **b)** Einfluss von Ig239-4 auf $\text{Tim23}_{\text{IMV}}$ (Bedingungen wie in a, 3.20a-c entnommen aus Truscott *et al.*, 2001) [Filter: a) und b) 2 kHz].

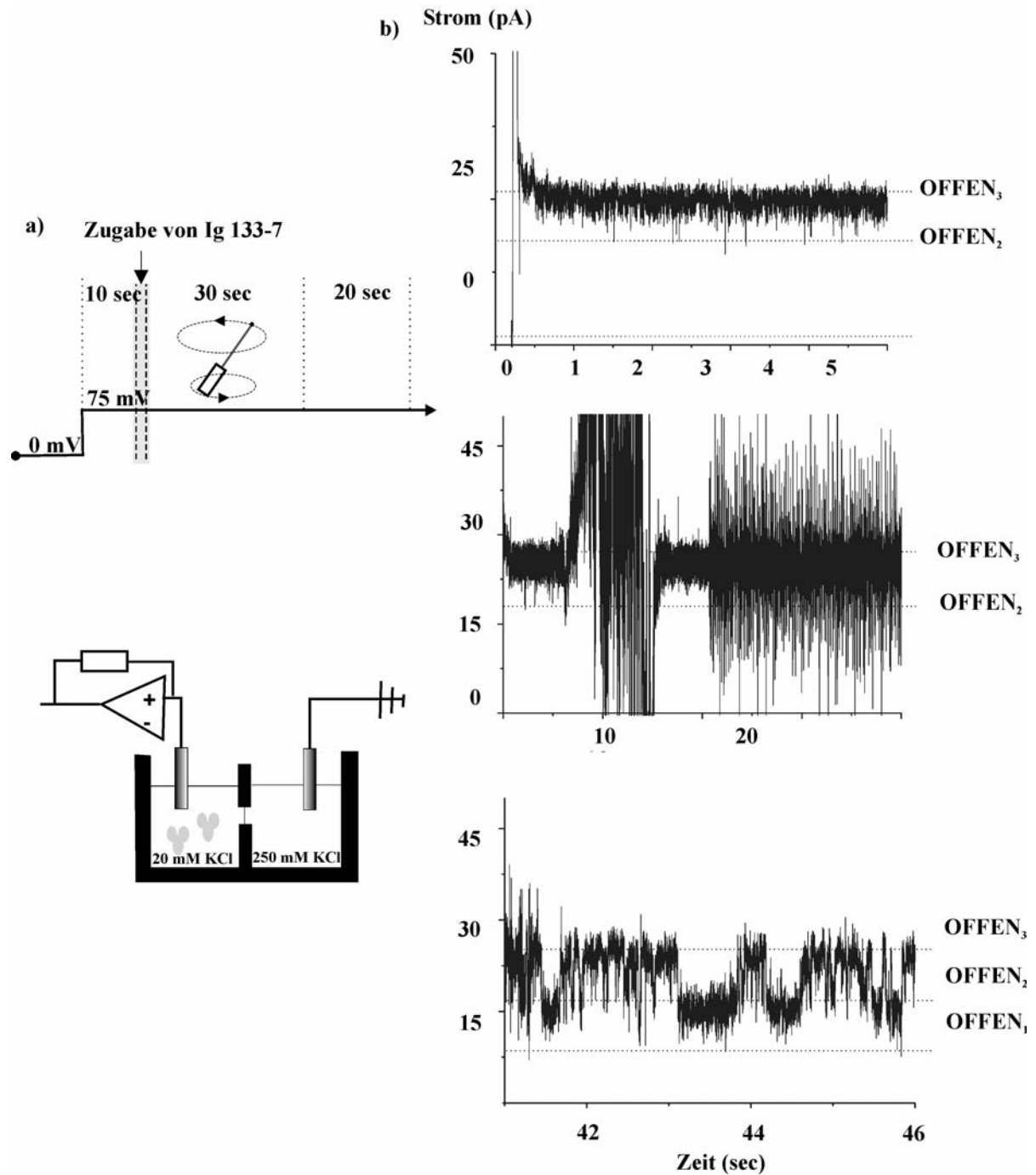


Abbildung 3.15: Wirkung von Ig 133-7 auf Tim23_{rekom}.

a) Versuchsprotokoll und Messkonfiguration. b) Versuchsablauf, Stromspur eines *Bilayers* mit einem aktiven Tim23_{rekom} vor (oben), während (mittig) und nach Zugabe (unten) von 6 μ l anti-Tim23 (Ig133-7) von *trans*, bei asymmetrischen Bedingungen ($U_{com} = +75$ mV für 60 sec). Man erkennt, dass die Zugabe von Ig133-7 nach Durchmischung der Messkammer bei einer unphysiologisch niedrigen Spannung (+75 mV) sofort zu einem verminderten Strom durch ein schnelles Schließverhalten führt (Ig133-7) [Filter: 10 kHz].

3.2 Charakterisierung von Tim23_C

3.2.1 Biochemie

3.2.1.1 Isolation von Tim23_C und Tim23_N

Um die Funktion der Sequenzabschnitte von Tim23_{rekom.} in planaren *Bilayern* näher zu charakterisieren, können sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus getrennt voneinander heterolog exprimiert, danach in SIV-Liposomen rekonstituiert und mit dem planaren Bilayer fusioniert werden. Tim23_C (Reste 92-222) und Tim23_N (Reste 1-96) werden hierfür jeweils über pET10N-Plasmide mit einem C-terminalen His₁₀-tag in *E. coli* (BL21-Codon Plus, C43) exprimiert. Die Isolation erfolgte analog zu 2.1.1. (Daten nicht gezeigt, siehe Truscott *et al.*, 2001).

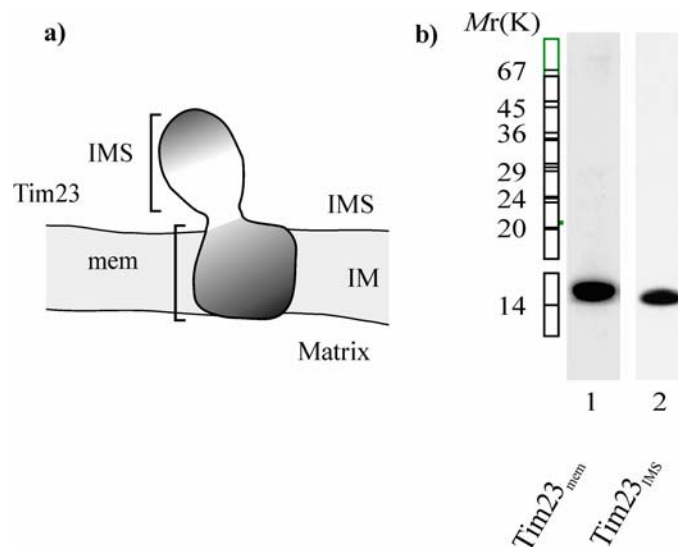


Abbildung 3.16: Tim23_N und Tim23_C.

a) Domänenstruktur von Tim23. **b)** SDS-PAGE-Analyse von Tim23_N (Tim23_{IMS}) und Tim23_C (Tim23_{mem}), Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (entnommen aus Truscott *et al.*, 2001).

3.2.2 Elektrophysiologische Messungen an Tim23c

3.2.2.1 Fusionsversuche mit Tim23_N und Tim23_C

Die Versuche, in SIV-Liposomen rekonstituiertes Tim23_N, mit dem planaren *Bilayer* zu fusionieren führen zu keiner Kanalaktivität. Fusionsexperimente mit in SIV-Liposomen rekonstituiertem Tim23_C, führen hingegen zu reproduzierbarer Kanalaktivität (siehe hierzu 4.1).

3.2.2.2 Selektivität und Leitfähigkeit von Tim23_C

Tim23_C wurde unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit Hilfe von Spannungsrampen vermessen und das Umkehrpotenzial U_{rev} bestimmt (siehe 2.7.2). Tim23_C weist eine verringerte Selektivität gegenüber Tim23_{rekom} auf. Es beträgt diesen Bedingungen $+27 \pm 3$ mV ($P_{K^+/A^-} = 3,8:1$, $n=5$, siehe auch Truscott *et al.*, 2001). Die Leitfähigkeit von Tim23_C wurde mit Hilfe von Spannungssprüngen unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) ermittelt. Das Protein bildet offene, schwach selektive Kationenkanäle (siehe 3.5.3), die nur bei hohen negativen Spannungen (>-100 mV) schalten und schließen (siehe **Abbildung 3.17a**). Der Kanal zeigt einen Hauptleitwert von 560 ± 11 pS. Daraus berechnet sich nach Hille (1992) ein Porendurchmesser von $\sim 1,8$ nm (0,5 nm Restriktionsbereich, siehe Übersicht in **Tabelle 4.3**). Der Kanal zeigt eine hohe Schaltaktivität von 100-400 Schaltereignissen·s⁻¹ (siehe Übersicht in **Tabelle 4.1**). Dabei ist keine Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität erkennbar. Bei hohen positiven Spannungen liegt Tim23_C bei symmetrischen Salzbedingungen fast nur im Geschlossenenzustand vor, jedoch ist es möglich, in durch die Anwendung von langsamen Spannungsrampen den Kanal bei asymmetrischen Messungen für die Dauer der Messung offen zu halten. Gekoppelte Übergänge über mehrere Poren treten nicht auf.

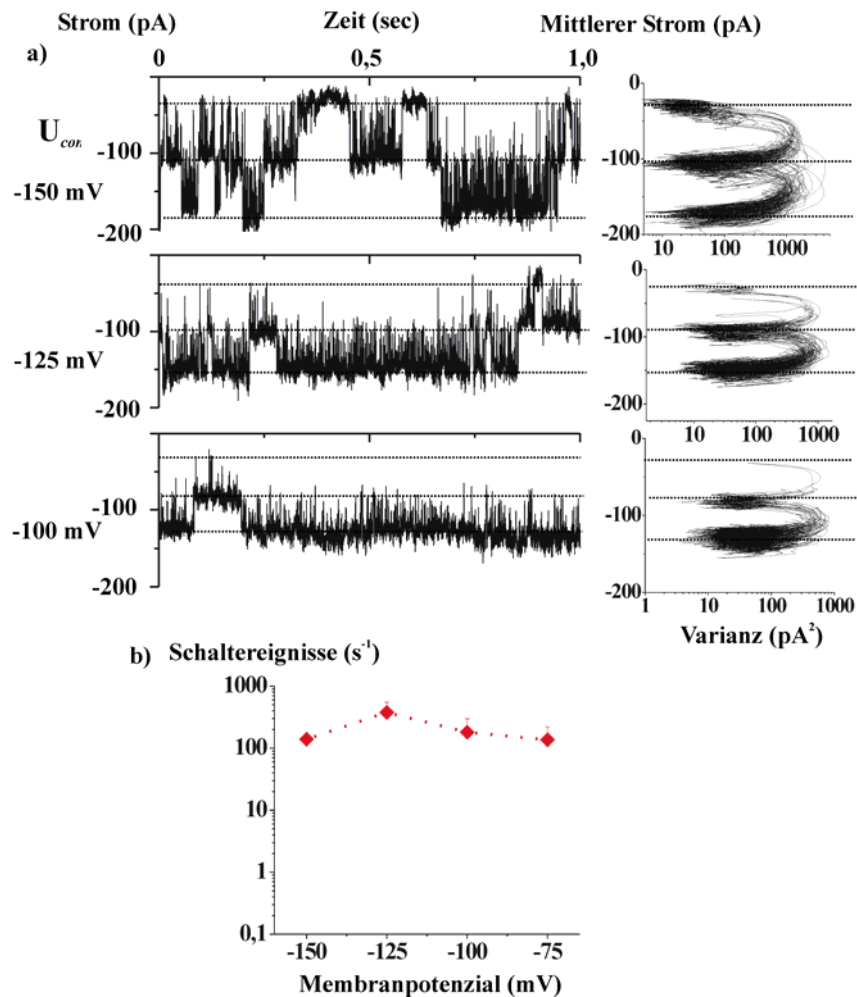


Abbildung 3.17: Stromspuren und Schaltaktivität von Tim23_c.

a) Stromspuren eines *Bilayers* mit Tim23_c bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) bei verschiedenen Haltepotenzialen (jeweils angegeben). b) Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität von Tim23_c bei verschiedenen Klemmspannungen unter Bedingungen wie in a) (3.22a entnommen aus Truscott *et al.*, 2001) [Filter: 5 kHz].

3.2.2.3 Einfluss von pCytOxIV auf Tim23_c

Zum Vergleich der Wirkung von pCytOxIV auf Tim23_c mit der Sensitivität von Wildtyp-Tim23_{rekom} gegenüber dem Präsequenzpeptid, wurde Tim23_c unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vor und nach Zugabe von pCytOxIV (5 μM) vermessen. Dabei zeigt Tim23_c keine Änderung der Selektivität ($\Delta U_{rev} = \pm 0$ mV). Nach Erreichen eines Schwellenpotenzials (~ 120 mV) wird das Peptid elektrophoretisch in die Pore gedrückt. Es

kommt zu keinem vollständigen Schließen von Tim23_C. Die Blockierung beträgt etwa 12±5 %, n=5, siehe **Abbildung 3.18**).

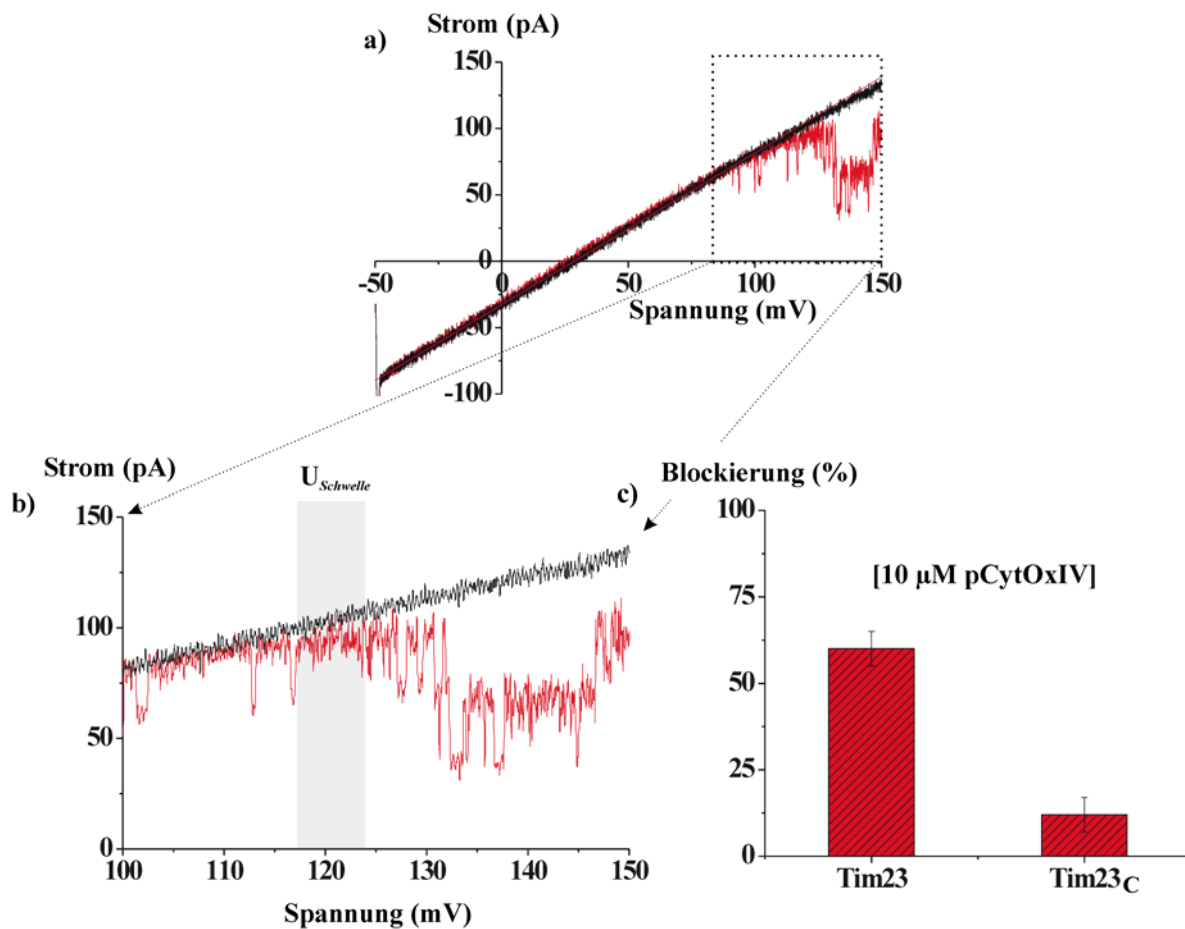


Abbildung 3.18: Effekt von pCytOxIV [5 µM] auf Tim23_C.

a) und b) Spannungsrampen eines *Bilayers* mit einer aktiven Tim23_C-Einheit unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 5 µM pCytOxIV von *trans*). c) Vergleich der Blockierung von Tim23_C und Tim23_{rekom} durch pCytOxIV (10 µM) [Filter: 2kHz].

3.3 Charakterisierung von *tim23-1* und *tim23-2*

3.3.1 Biochemie

3.3.1.1 Isolation von *tim23-1* (G186D)

Es wurde festgestellt, dass *tim23-1* Mitochondrien mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution (G186D) einen Kanal mit einer geringeren Sensitivität gegenüber pCytOxIV bildet (Lohret *et al.*, 1997). Die heterologe Expression und Isolation wurde analog zu 2.1.1 von Dr. Kaye N. Truscott (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt. Hierzu wurde das Mutanten-Allel *tim23-1* (G186D) kloniert, exprimiert und isoliert. Die Expression erfolgte über ein pET10N Plasmid mit einem zusätzlichen aminoterminalen His₁₀-tag in *E. coli*, die Isolation analog zu 3.1.1). Daten nicht gezeigt, siehe Truscott *et al.*, 2001).

3.3.1.2 Isolation von *tim23-2* (G112E)

Untersuchungen belegen, dass *tim23-2* Mitochondrien mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution (G112E) einen destabilisierten Tim23.17-Komplex mit einer geringeren Sensitivität gegenüber pCytOxIV bilden. Die heterologe Expression und Isolation wurde analog zu 3.1.1 von Dr. Kaye N. Truscott (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt. Hierzu wurde das Mutanten-Allel *tim23-1* (G112E) kloniert, exprimiert und isoliert. Die Expression erfolgte über ein pET10N Plasmid mit einem zusätzlichen aminoterminalen His₁₀-tag in *E. coli*, die Isolation analog zu 3.1.1). siehe **Abbildung 3.19**).

3.3.1.3 Destabilisierung des 90 kDa-Komplexes bei *tim23-2* (G112E)

Um zu untersuchen, ob Tim23 **ohne** feste Assoziation mit Tim17 Kanäle bilden kann, wurde die Mutante *tim23-2* (G112E) exprimiert und isoliert., da diese Mutante gestört ist in ihrer Bindung zu Tim17 Das *tim23-2_{rekom}* wurde über ein pET10N Plasmid mit einem zusätzlichen His₁₀-tag in *E. coli* (C43) exprimiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen lysiert, die Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) geerntet und anschließend

denaturiert (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0). Das His₁₀-tag-Protein wurde dann mit Hilfe einer NiNTA-Agarose-Säule abgetrennt. Weiter konnte über Blaue Native Gelelektrophorese (BN-PAGE) gezeigt werden, dass diese Mutante einen destabilisierten 90 kDa-Komplex besitzt (siehe **Abbildung 3.19**).

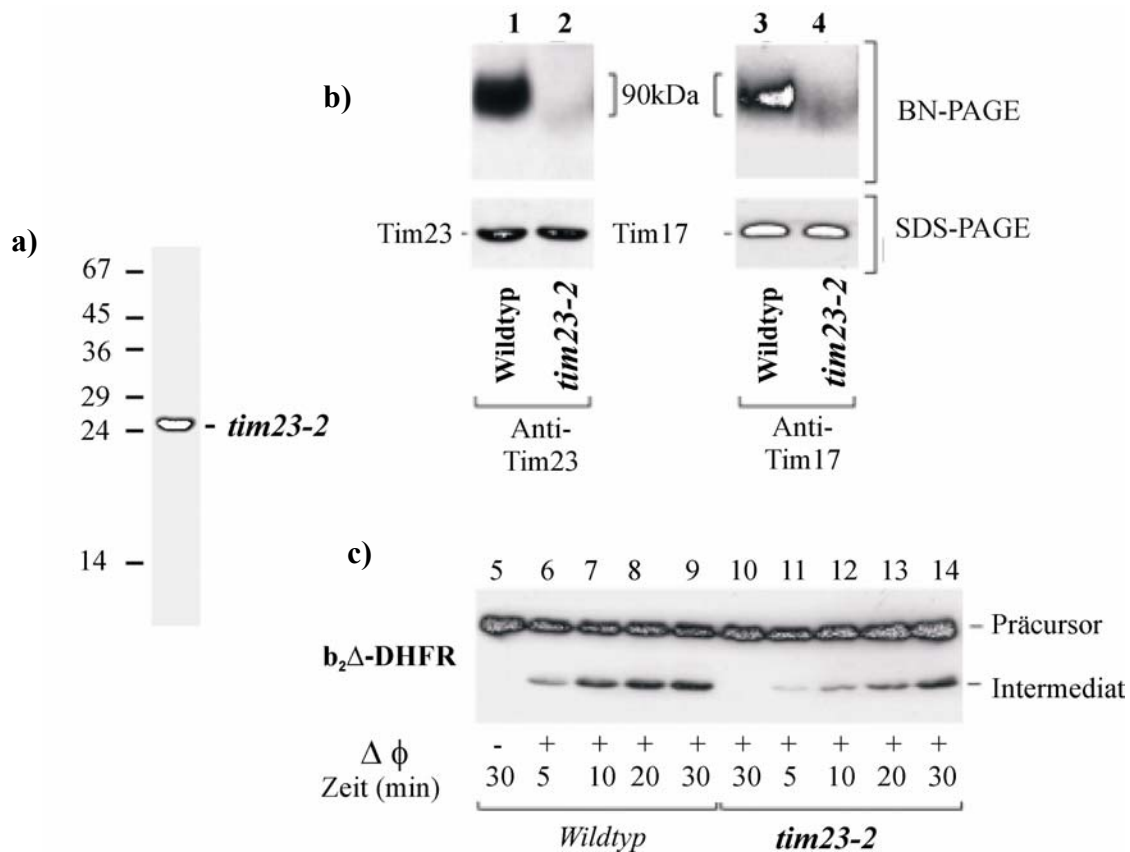


Abbildung 3.19: Isolation von *tim23-2_{rekom}* und BN-PAGE Analyse des TIM23-Komplexes.

a) SDS-PAGE mit aufgereinigtem *tim23-2*. **b)** Der 90 kDa-Kernkomplex ist stark destabilisiert in *tim23-2* Mitochondrien. (oben) Die SDS-PAGE und nachfolgende Western-Blot Analyse mit Anti-Ig-antiTim17 und Ig-antiTim23 zeigt einen stark destabilisierten TIM23-Komplex bei *tim23-2* Mitochondrien, wobei die exprimierten Mengen an Tim23 und Tim17 nicht herabgesetzt sind. (unten) SDS-PAGE Analyse des Importes von b₂Δ-DHFR in Wildtyp- und *tim23-2*-Mitoplasten. **c)** Die Mitochondrien sind jedoch auch nach Zerfall des Komplexes noch importfähig. (entnommen aus Truscott *et al.*, 2001)

Die Expression und Aufreinigung von *tim23-2_{rekom}* wurde von Dr. Kaye Truscott (AG Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt. Durch Vergleich der normalen Proteinmengen des Tim23 und Tim17 in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen zeigt, dass trotz der destabilisierenden Mutation sowohl Tim23, als auch Tim17 in normalen Mengen vorhanden sind. Um weiter zu überprüfen, ob *tim23-2* in der Lage ist, auch ohne Tim17 einen

Importkanal zu bilden wurden *tim23-2*-Mitoplasten mit sättigenden Mengen an b_2 - Δ -DHFR als Imports substraten inkubiert und der Import über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass *tim23-2*-Mitochondrien in der Lage waren mit einer 50-70% Effizienz gegenüber Wildtyp Mitochondrien Präproteine zu importieren.

3.3.2 Elektrophysiologische Messungen an *tim23-I_{rekom}*

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften von *tim23-I_{rekom}* (siehe 3.1.4) im planaren *Bilayer* mit den Eigenschaften von *Tim23_{rekom}* zu vergleichen wurde *tim23-I_{rekom}* mit Spannungsrampen und Spannungssprüngen vermessen.

3.3.2.1 Selektivität und Leitfähigkeit von *tim23-I_{rekom}*

Es wurde das Umkehrpotenzial U_{rev} von *tim23-I_{rekom}* unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2), mit Hilfe von Spannungsrampen bestimmt. Unter diesen Bedingungen zeigt der Kanal ein, im Vergleich zum Wildtyp-Protein, verringertes Umkehrpotenzial $U_{rev}=38\pm 3$ mV ($\Delta U_{rev} \sim -9$ mV). Daraus ergibt sich nach der GHK-Theorie ein Permeabilitätsverhältnis für Kationen gegenüber Anionen von $P_{K^+/A^-} \sim 7:1$. Die Leitfähigkeit von *tim23-I_{rekom}* wurde unter symmetrischen Bedingungen (2.7.2) mit Hilfe von einminütigen Spannungssprüngen bestimmt, und die Leitwerte für die Einzelporen ermittelt. Die Strom-Spannungskennlinie von *tim23-I_{rekom}* verläuft sowohl bei positiven, als auch bei negativen Spannungen linear, und zeigt einen Hauptleitwert $\Lambda_{Tim23-1}$ von jeweils $448\pm 2,5$ pS für die Einzelporen die über sechs Unterleitwerte mit je ~ 75 pS angesteuert werden. Dabei traten die Hauptleitwerte jeweils als Vielfaches von drei auf ($\Lambda_{I_{max}}=1,35$ nS).

Daraus berechnet sich der Porendurchmesser nach Hille (1992) zu 15 \AA (Länge vom Restriktionsbereich $0,5 \text{ nm}$, siehe Übersicht in **Tabelle 4.3**). Die Anwendung von hohen Haltespannungen ($> \pm 125$ mV) führt zum allmählichen Schließen der im *Bilayer* enthaltenen Poren. Exemplarische Stromspuren von *tim23-I_{rekom}* sind in Truscott *et al.*, 2001, Abbildung 3 gezeigt.

3.3.2.2 Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von *tim23-1_{rekom}*

Die Offenwahrscheinlichkeiten von *tim23-1_{rekom}* wurden mit einminütigen Spannungssprüngen bei symmetrischen Bedingungen vermessen. Das *tim23-1* zeigt eine symmetrische Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit mit einem weiten Maximum zwischen –80 und +90 mV. Bei mitochondrialen Ruhepotenzialbedingungen bleibt *tim23-1* geschlossen. Im Vergleich mit *Tim23_{rekom}* und *tim23-2_{rekom}* beginnt *tim23-1_{rekom}* bei positiven Spannungen schon bei etwas niedrigeren Spannungen zu schließen.

3.3.2.3 Einfluss von pCytOxIV auf *tim23-1_{rekom}*

Um die Sensitivität von *tim23-1_{rekom}* gegenüber Präsequenzpeptiden zu zeigen, wurde das Protein unter asymmetrischen Bedingungen vermessen (siehe 2.7.2). **Abbildung 3.26c** zeigt Spannungsrampen vor und nach Zugabe von pCytOxIV (1 μ M). Dabei zeigt *tim23-1* keine Änderung der Selektivität ($\Delta U_{rev} = \pm 0$ mV) und keinen verminderten Strom. Bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) zeigt *tim23-1* nach Zugabe von 1 μ M pCytOxIV bei Spannungssprung-Experimenten keine Änderung der Schaltaktivität (Stromspuren nicht gezeigt, siehe **Abbildung 3.26d**).

Die Strom-Spannungskennlinie von *tim23-1* zeigt linearen Verlauf des prominentesten Leitwertes Λ (Daten nicht gezeigt). Der Kanal beginnt bei hohen Spannungen >125 mV allmählich zu schalten und ist am aktivsten bei Spannungen von +150 bis +175 mV. Andauernde Anwendung einer hohen Kommandospannung führt bei *tim23-1_{rekom}* zum Schließen der Poren.

Der Vergleich der Schaltaktivität von *tim23-1_{rekom}* vor und nach Zugabe von 100 nM pCytOxIV (*cis* und *trans*) zeigt, dass das Präsequenzpeptid pCytOxIV zu keiner spannungsabhängigen Erhöhung der Schaltfrequenz (n=3) führt.

3.3.3 Elektrophysiologische Messungen an *tim23-2*

3.3.3.1 Leitfähigkeit und Selektivität von *tim23-2_{rekom}*

Die Selektivität der von *tim23-2_{rekom}* gebildeten Pore wurde durch Messungen des Umkehrpotenzials U_{rev} in asymmetrischen Hochsalzpuffern bestimmt (siehe 2.7.2). Dabei zeigt *tim23-2_{rekom}* ein Umkehrpotenzial von $U_{rev}=42\pm 2$ mV ($n>10$, siehe **Abbildung 3.21**). Nach der GHK-Spannungsgleichung ergibt sich ein Permeabilitätsverhältnis von $\sim 10:1$ für Kalium gegenüber Chlorid. Für die lineare Strom-Spannungskennlinie vom prominentesten Leitwert ergibt sich ein Betrag von 448 ± 2 pS ($n=5$, Daten nicht gezeigt).

3.3.3.2 Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von *tim23-2_{rekom}*

Die Offenwahrscheinlichkeiten von *tim23-2_{rekom}* wurden mit einminütigen Spannungssprüngen unter symmetrischen Bedingungen vermessen. **Abbildung 3.20** zeigt den spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeitsverlauf im Vergleich mit *tim23-1_{rekom}*. Das *tim23-2_{rekom}* zeigt eine leicht asymmetrische spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit mit einem weiten Maximum zwischen -90 und $+115$ mV. Bei mitochondrialen Ruhepotenzialbedingungen bleibt *tim23-2_{rekom}* geschlossen. Der Vergleich mit *Tim23_{rekom}* zeigt, dass, beide Kanäle einen nahezu deckungsgleichen Verlauf der Offenwahrscheinlichkeit zeigen.

3.3.3.3 Einfluss von pCytOxIV auf *tim23-2_{rekom}* und *tim23-2_{IMV}*

Um den Einfluss des Präpeptides pCytOxIV auf *tim23-2_{rekom}* zu untersuchen wurden beide Proteine mit Spannungssprüngen bei asymmetrischen Bedingungen vor und nach Zugabe von μM Konzentrationen pCytOxIV vermessen. **Abbildung 3.21a,b** zeigt Spannungsrampen vor und nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ pCytOxIV (*trans*). Dabei ist zu erkennen, dass es nach Präpeptid-Zugabe lediglich zu einer Abnahme des Umkehrpotenzials U_{rev} kommt, während das Schaltverhalten von *tim23-2_{rekom}* und unbeeinflusst bleibt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Stromspuren bei hohen Haltepotenzialen unter dem Einfluss von pCytOxIV

untersucht (charakteristische Stromspuren von *tim23-2_{rekom}* sind in Truscott *et al.*, 2001 Abbildung 5e gezeigt).

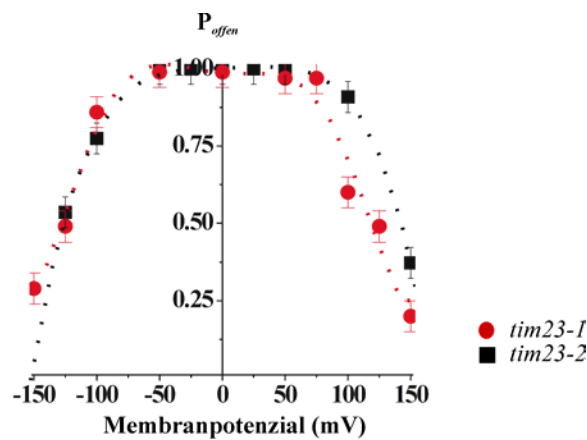


Abbildung 3.20: Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von *tim23-1_{rekom}* und *tim23-2_{rekom}* a) Vergleich der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von *tim23-1* und *tim23-2*. bei symmetrischen Bedingungen.

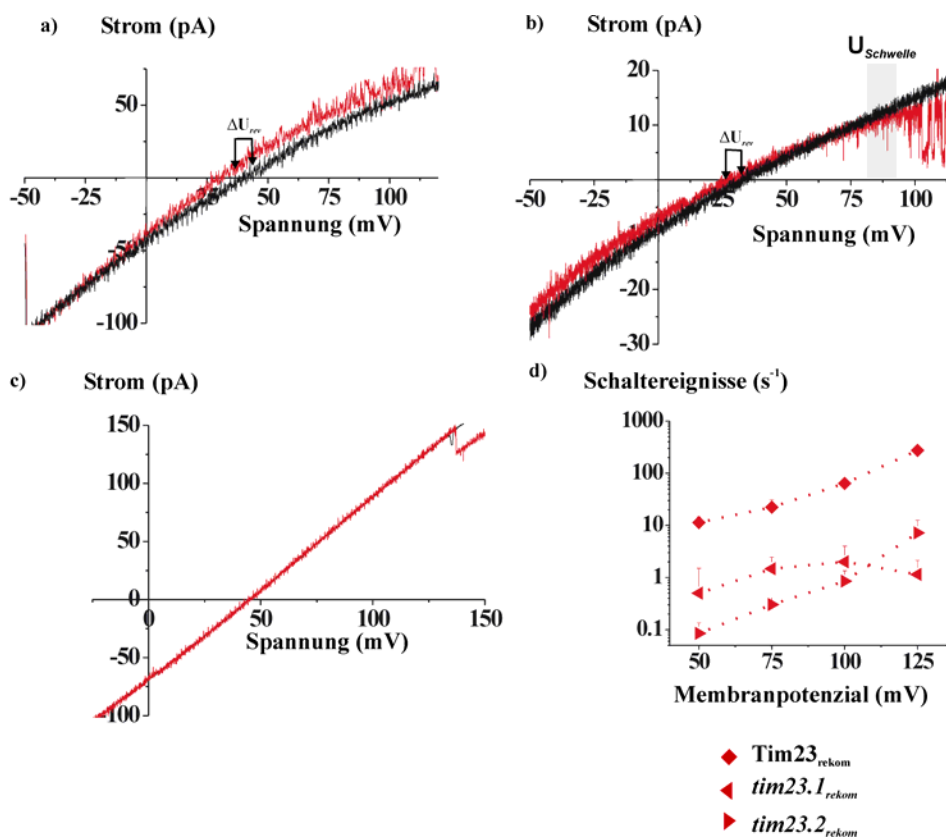


Abbildung 3.20: Einfluss von pCytOxIV auf *tim23-1_{rekom}*, *tim23-2_{rekom}* und *tim23-2_{IMV}* a)–c) Spannungsrampen von *tim23-2_{rekom}* (a), *tim23-2_{IMV}* (b) im Vergleich mit *tim23-1_{rekom}* (c) bei asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vor und nach Zugabe von 1 μ M pCytOxIV (*trans*). d) Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivitäten von *Tim23_{rekom}*, *tim23-1_{rekom}* und *tim23-2_{rekom}* nach Zugabe von 1 μ M pCytOxIV (3.25a,b entnommen aus Truscott *et al.*,2001) [Filter: a)-c): 2 kHz, d) 10kHz].

Vergleicht den Effekt von pCytOxIV auf $tim23-2_{rekom}$ mit dem Einfluss des Peptides auf $tim23-2_{IMV}$, so kann man zeigen, dass die Reaktion des IMV-Kanals identisch ist mit der Stromantwort von $tim23-2_{rekom}$. (siehe **Abbildung 3.20 a,b**). Der Vergleich der Schaltaktivität von $tim23-2_{rekom}$ vor und nach Zugabe von 100 nM pCytOxIV (*cis* und *trans*) zeigt, dass das Präsequenzpeptid pCytOxIV nur zu einer schwachen spannungsabhängigen Erhöhung der Schaltfrequenz (n=3) führt. Auch bei der dauernden Anwendung einer hohen Kommandospannung U_{com} kann keine Änderung des Schaltverhaltens festgestellt werden.

3.4 Charakterisierung von Tim22_{rekom}

3.4.1 Biochemie

3.4.1.1 Isolation von Tim22_{rekom}

Tim22_{rekom} wurde mit einem amino-terminalen His₁₀-tag von einem pET10N-Plasmid in *E.coli* (C43) exprimiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen lysiert, die Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) isoliert und anschließend denaturiert (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8,0). Das His₁₀-Tim22-Protein wurde danach mit Hilfe einer NiNTA-Agarose-Säule abgetrennt. Die heterologe Expression und Isolation wurde von Dr. Kaye N. Truscott (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt (Kovermann *et al.*, 2002).

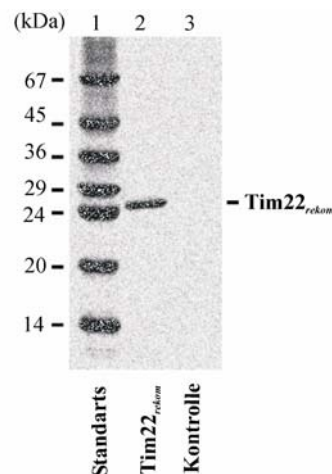


Abbildung 3.21: Aufreinigung von Tim22_{rekom}. Analyse der Reinheit von Tim22_{rekom} über Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbte SDS-PAGE, Linie 1, Molekulargewichtstandarts, Linie 2, aufgereinigtes Tim22_{rekom}, Linie 3, Leerkontrolle (entnommen aus Kovermann *et al.*, 2002).

3.4.2 Elektrophysiologische Messungen an Tim22_{rekom}

3.4.2.1 Identifizierung des porenbildenden Kernproteins

Um zu ermitteln, welche Untereinheit des TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae* die Importpore des Insertionskomplexes bildet, wurden Untereinheiten getrennt in *E. coli*

exprimiert, und nach funktioneller Rekonstitution im planaren *Bilayer* auf ihre Kanalaktivität hin untersucht.

3.4.2.2 Isolation von Tim9_{rekom}, Tim10_{rekom},

Die Denaturierung von Tim9_{rekom} und Tim10_{rekom} wurde in 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM Na₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), und die Proteine dann über NiNTA-Chromatographie isoliert (siehe Kovermann *et al.*, 2002).

3.4.2.3 Fusionstests (Tim9, 10, 18, 22 und Tim54)

Um zu untersuchen, ob einer der Komplexbestandteile Tim9_{rekom}, Tim10_{rekom}, Tim18_{rekom} oder Tim54_{rekom} eine kanalbildende Funktion hat, wurden die Protein in Liposomen rekonstituiert und mit dem planaren *Bilayer* fusioniert (siehe Material und Methoden 2.3.1.). Es kam jedoch nur bei **einem** der genannten Proteine zu einer reproduzierbaren Kanalaktivität. Tim22_{rekom} bildet einen Kanal mit Leitwerten, die denen einer großen Pore entsprechen.

3.4.2.4 Selektivität von Tim22_{rekom}

Die Selektivität von Tim22_{rekom} wurde unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) bestimmt, (siehe 2.7.2). Dabei zeigt Tim22_{rekom} eine verringerte Permeabilität für Anionen gegenüber Kationen. Die voll geöffnete Pore ist weniger kationenselektiv ($U_{rev} = +28 \pm 2,8$ mV), als der partiell geschlossene Kanal ($U_{rev} = +48 \pm 3,2$ mV, $n > 120$, siehe **Abbildung 3.22a**).

3.4.2.5 Schaltverhalten und Leitfähigkeit von Tim22_{rekom}

Die Leitfähigkeit und das Schaltverhalten von Tim22_{rekom} wurde unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) untersucht. Es wurden Strom-Spannungskennlinien von Tim22_{rekom}

mit Hilfe von Spannungsrampen aufgenommen. Dabei zeigt Tim22_{rekom} eine Maximalamplitude von 540 ± 18 pS (gemittelt über alle positiven Spannungen). Jede Maximalamplitude wird dabei über 8 Inkremente von $\sim 67 \pm 5$ pS angesteuert (siehe **Abbildung 3.22b**).

Die **Abbildungen 3.22b,c** zeigen, dass die Anwendung einer positiven Spannung einen größeren Strom induziert, als das Anlegen einer negativen Membranspannung. $I_{max,pos} > I_{max,neg}$. Die Kennlinie weist eine einseitige Krümmung auf, die daraufhin weist, dass es sich bei Tim22_{rekom} um einen rektifizierenden Kanal handelt ($I_{max,neg} = 69 \pm 5\%$ von $I_{max,pos}$, $n=5$). Tim22_{rekom} zeigt ein träges Schaltverhalten mit Schaltaktivität $< 10 \cdot s^{-1}$ über den gesamten Spannungsbereich von 0 bis 150 mV ($n=3$, siehe **Abbildung 3.23a,b**).

3.4.2.6 Offenwahrscheinlichkeit und Spannungsaktivierung von Tim22_{rekom}

Um den Einfluss des Membranpotenzials ϕ_{mem} auf die Offenwahrscheinlichkeit und die Aktivierung von Tim22_{rekom} zu zeigen wurden es über Spannungssprünge vermessen. Die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit ergibt sich dabei aus dem Quotienten $I_{max} \cdot I_{mean}^{-1}$ in relativen Einheiten aufgetragen gegen das Membranpotenzial ϕ_{mem} . Tim22_{rekom} zeigt eine symmetrische Offenwahrscheinlichkeitsabhängigkeit mit einem weiten Maximum bei Spannungen $< \pm 125$ mV. **Abbildung 3.23c** zeigt die Offenwahrscheinlichkeit als Funktion des Membranpotenzials ϕ_{mem} . Bei Spannungen unter ± 100 mV ($P_{offen} \leq 0.95 \pm 0.05$ bei +100 mV und $P_{offen} \leq 0.95 \pm 0.05$ bei -100 mV) liegt Tim22_{rekom} fast nur im Offenzustand vor. Nach Überschreiten der ± 100 mV Schwelle beginnt der Kanal allmählich zu schalten ($P_{offen} \sim 0,85$, bei ± 110 mV). Unter mitochondrialen Ruhepotenzialbedingungen ($\phi_{rest} \sim \pm 165$ mV) sind die Kanäle halbmaximal geschlossen ($n=5$ Bilayer). Daraus berechnet sich die Anzahl der *gating-charges* zu 2,1 (~ 2 Ladungen). Das Membranpotenzial ϕ_{mem} hat einen starken Einfluss auf das Schaltverhalten von Tim22_{rekom}. Der Kanal ist zwischen 0 und ± 100 mV inaktiv und schaltet nicht. Lange andauernde Spannungen führen zum Schliessen des Kanals. Eine Auftragung der Anzahl geöffneter Kanäle direkt (2-12sec) gegen das angewandte Membranpotenzial zeigt einen parabolischen Zusammenhang. Je höher das angewandte Membranpotenzial, desto

größer die Anzahl der im *Bilayer* befindlichen aktiven Kanäle (siehe **Abbildung 3.22d**). Das ist ein Hinweis darauf, dass $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ durch Spannung aktiviert werden kann.

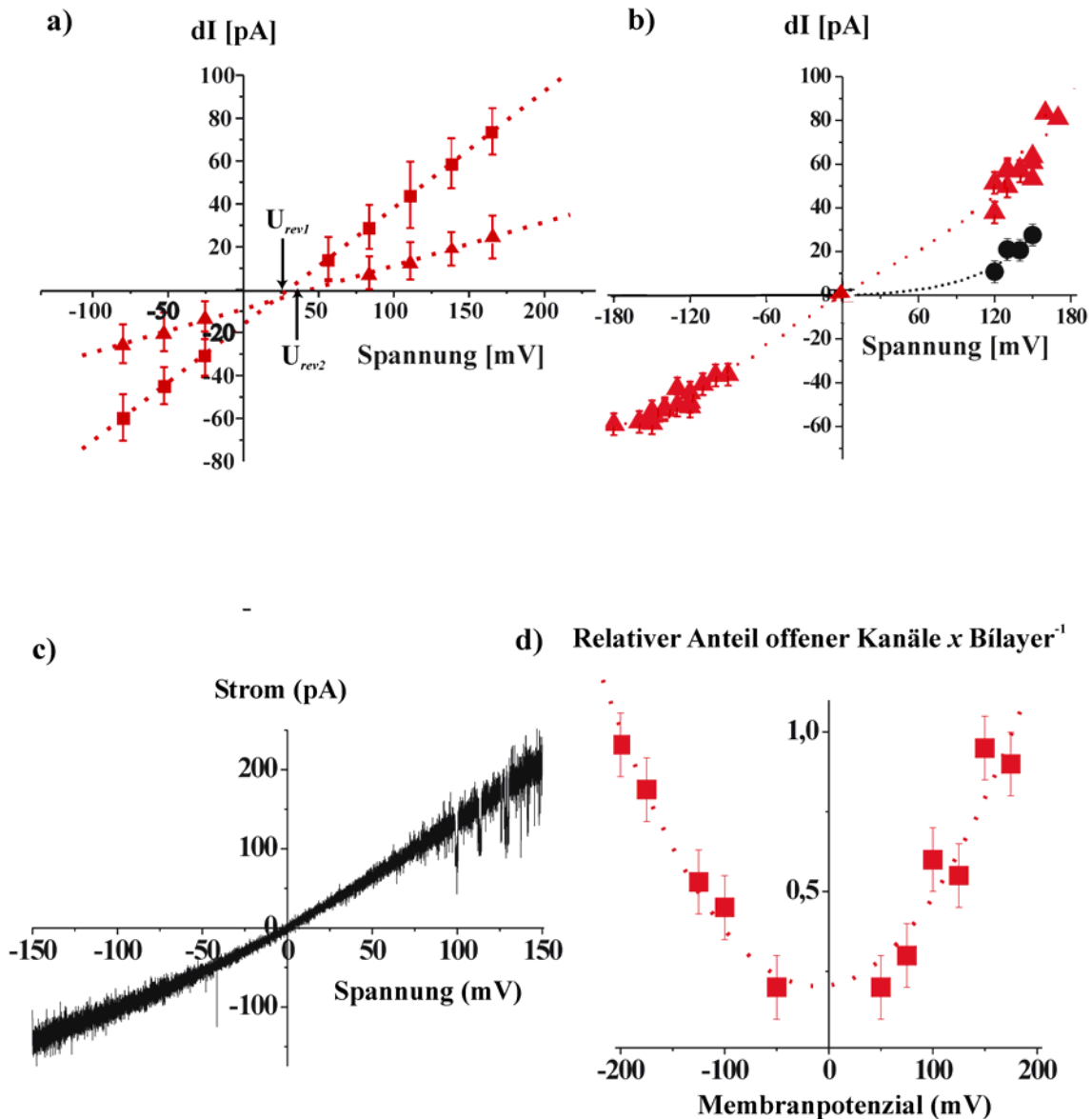


Abbildung 3.22: Elektrophysiologische Charakteristika von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$. I.

a) Selektivität und Strom-Spannungskennlinien von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ bei voll geöffneter Pore (Quadrate) und für drei Minimal-Inkrementen a 65 pS, unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Die Pfeile markieren die jeweiligen Umkehrpotenziale U_{rev} . **b)** Strom-Spannungskennlinien von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ bei symmetrischen Bedingungen. **c)** Charakteristische Spannungsrampe eines *Bilayers* mit $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$. Dargestellt ist eine Spannungsrampe eines *Bilayers* mit $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) [Filter: 2kHz]. **d)** Spannungsaktivierung von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$. Dargestellt ist die Anzahl geöffneter Kanäle im *Bilayer* gegen die Membranspannung.

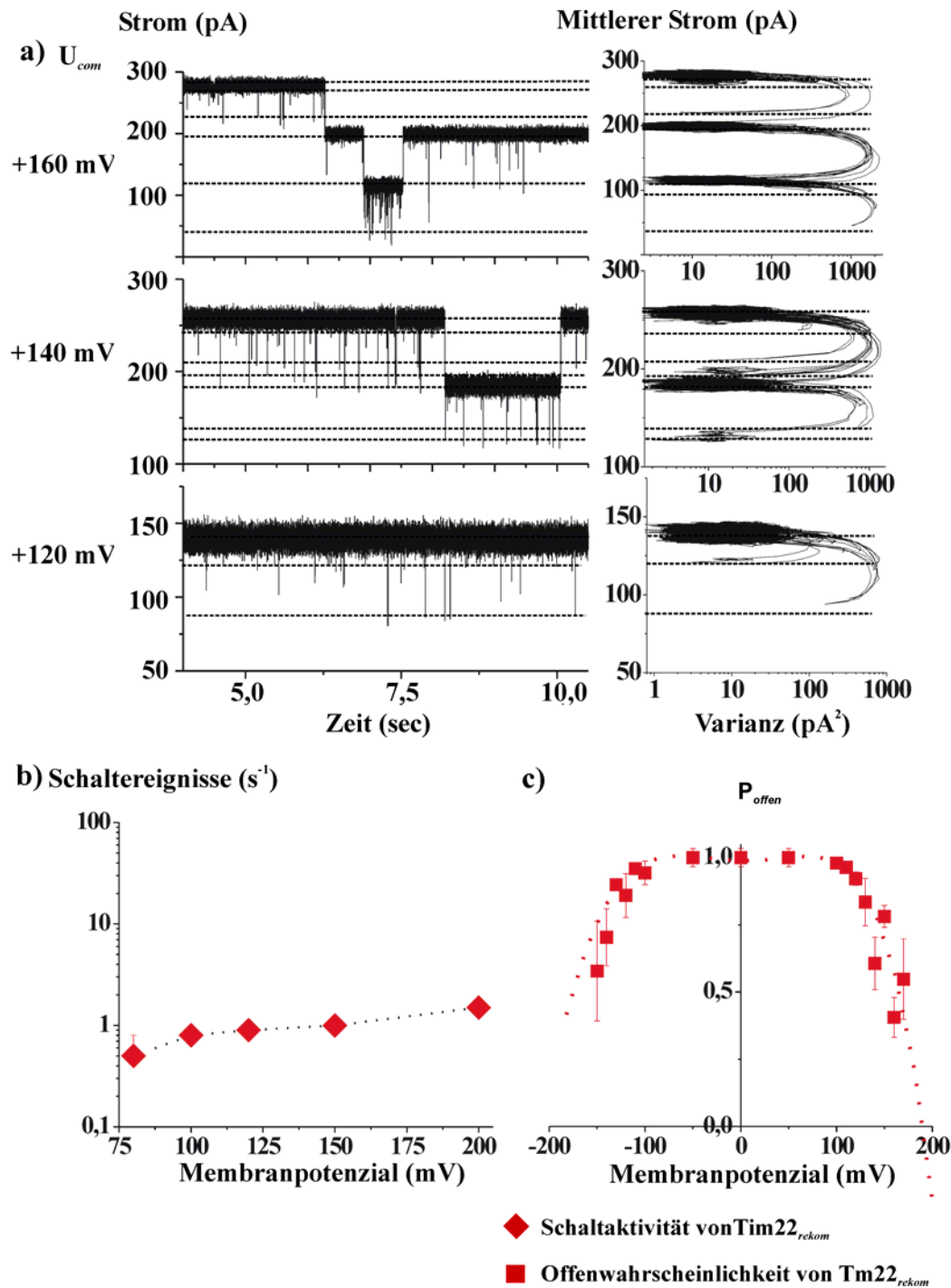


Abbildung 3.23: Elektrophysiologische Charakteristika von $Tim22_{rekom}$ II.

a) Charakteristische Stromspuren von $Tim22_{rekom}$. Stromspuren eines *Bilayers* mit 1-2 aktiven $Tim22_{rekom}$ bei hohen positiven Haltespannungen mit korrespondierenden *Mean-Variance*-Darstellungen. b) Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität c) Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit P_{offen} von $Tim22_{rekom}$ bei Haltespannungen, von -150 bis $+175$ mV, unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) [Filter: a) und b) 5 kHz].

3.4.2.7 Tim22_{rekom} zeigt eine seitenabhängige Zugänglichkeit für Peptide

Um die Zugänglichkeit gegenüber artifiziellen Präpeptiden, des durch Tim22_{rekom} konstituierten Kanals zu bestimmen, wurde Tim22_{rekom} unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit Spannungsrampen vermessen. Nach Messung von Kontrollrampen wurde 10 μM SynB₂ auf der Niedersalzseite zugegeben und die Strom-Spannungskennlinien vor und nach Zugabe von SynB₂, miteinander verglichen. Im Anschluss wurde auf 20:250 mM KCl umperfundiert und der Vorgang wiederholt. In einem abschließenden Schritt wurden dann symmetrische KCl-Konzentrationen (250:250 mM KCl) einperfundiert und auf beiden Hochsalzseiten je 10 μM SynB₂ hinzugefügt. Dann wurden Spannungsrampen appliziert und die positiven und negativen Stromrichtungen miteinander verglichen.

Die **Abbildung 3.24b** zeigt Strom-Spannungskennlinien von Tim22_{rekom} unter asymmetrischen Bedingungen, vor und nach SynB₂-Zugabe von *trans*. Bei μM Konzentrationen an SynB₂ beginnt der Kanal nach Überschreiten des Umkehrpotenzials sofort und dauernd zu schliessen (Blockierung $84\pm 5\%$, $n=7$). Erfolgt die Zugabe von SynB₂ auf der *cis*-Seite so lässt sich kein Unterschied zwischen der Kontrollkennlinie und der Strom-Spannungskennlinie nach Zugabe von SynB₂ feststellen. Die Messungen weisen daraufhin, dass der Kanal asymmetrische Poren an beiden Seiten der Membran (*cis* und *trans*) aufweist. Daher wurden zusätzlich Strom-Spannungskennlinien unter symmetrischen Bedingungen, mit SynB₂ (10 μM) auf beiden Seiten der Bilayermembran aufgezeichnet. Die Abbildungen zeigen deutlich den leicht rektifizierenden Verlauf der Strom-Spannungskennlinie von Tim22_{rekom} und einen spannungsabhängigen Block bei hohen positiven Haltepotenzialen ($\geq +100$ mV). Spannungsrampen in den negativen Bereich zeigen, dass der Kanal von *cis* her durch SynB₂ nicht blockierbar ist. Die Ausschnittsvergrößerung in **Abbildung 3.24c** zeigt Details der SynB₂-Blockierung bei Spannungen größer als +125 mV. Diese Messungen geben Hinweise darauf, dass Tim22_{rekom} eine asymmetrische Topologie innerhalb der Membran aufweist, denn im Bilayer-Messsystem ist der Kanal nur von der *trans*-Seite für Peptide zugänglich.

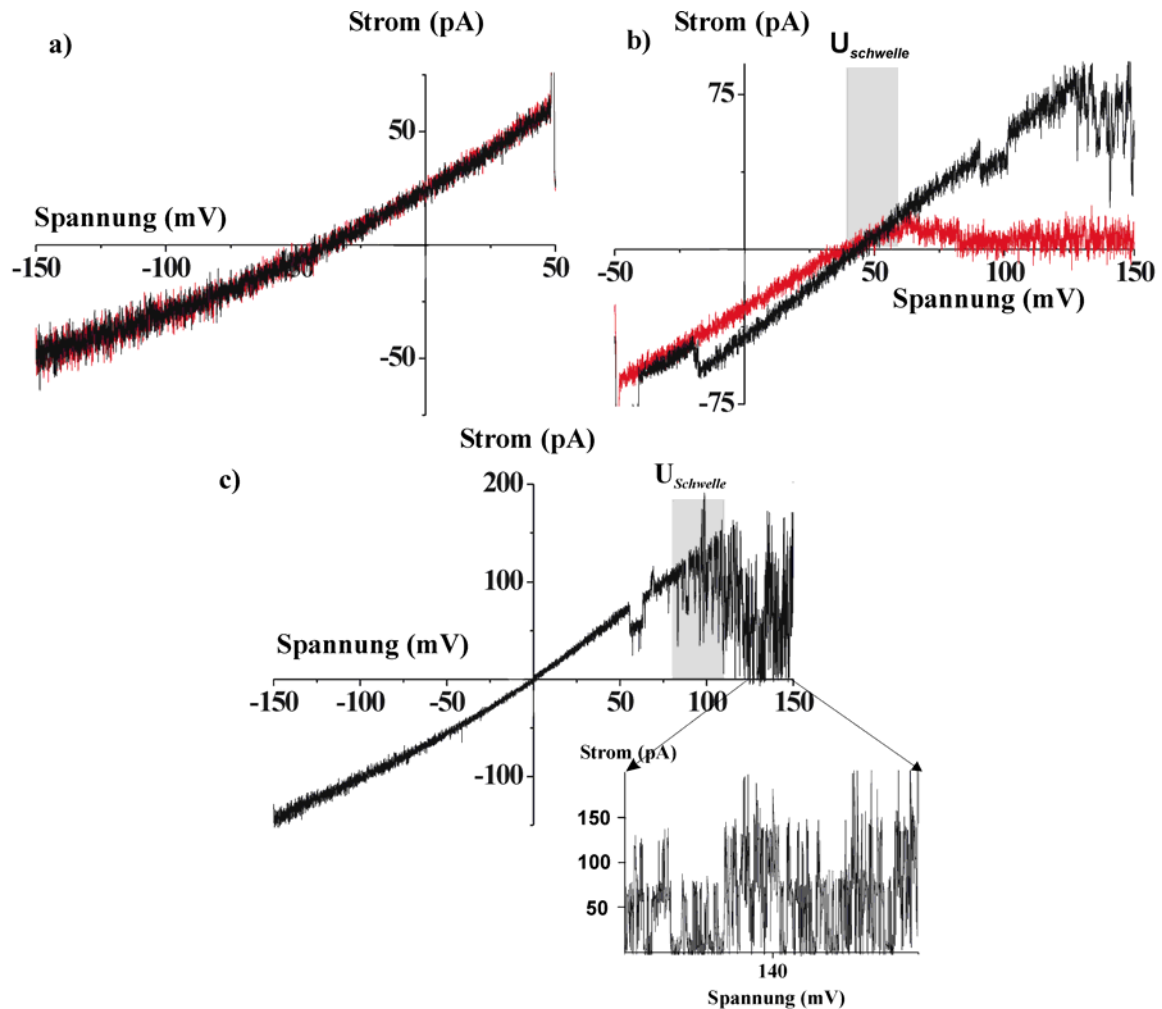


Abbildung 3.24: Einfluss von SynB₂ auf Tim22_{rekom}.

a) und **b)** Spannungsrampen vor und nach Zugabe von SynB₂: mit einem aktiven Tim22_{rekom} vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von 10 μM SynB₂ von *cis* (b) und *trans* (a) unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). **c)** Spannungsrampen nach Zugabe von 10 μM SynB₂ von beiden Seiten unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit Ausschnittsvergrößerung des Bereiches ≥+125 mV [Filter: a-c) 2kHz].

3.4.2.8 Anzahl Poren von Tim22_{rekom}

Die Anzahl Poren die durch ein einzelnes Tim22_{rekom} konstituiert werden kann man bestimmen, wenn aus $n=96$ Messungen (16 *Bilayer*) die maximale Anzahl Einzelkanäle bestimmt. Die Anzahl der Poren $\cdot \text{Bilayer}^{-1}$ werden dann in einem Histogramm gegen die Anzahl der *Bilayer* mit einer bestimmten Anzahl Poren aufgetragen. **Abbildung 3.25** zeigt die Ergebnisse als Histogramm (Klassenbreite: 1). In 37,5% der untersuchten Fälle traten *Bilayer*

mit 4 Poren auf und in 31,25% Bilayer mit 6 Poren. Jeweils weitere 6,25% der untersuchten *Bilayer* wiesen 10 bzw. 12 Poren auf. Da die 4er Porenkombination mit 37,5% weitaus am häufigsten auftrat, und die anderen Kombinationen lediglich Vielfache einer 2er-Einheit darstellen, könnte die 2er-Poren Kombination ein $\text{Tim}22_{\text{rekom}}$ repräsentieren. Lediglich in einem Fall trat eine 3er-Kombination auf.

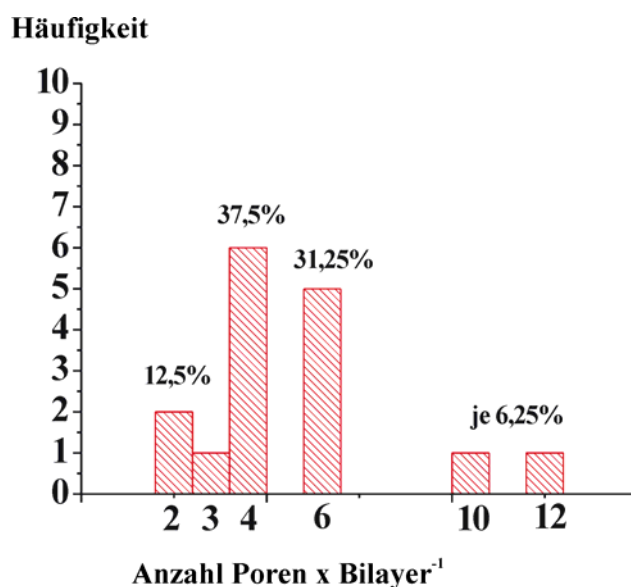


Abbildung 3.25: Bestimmung der Anzahl Poren· $\text{Tim}22_{\text{rekom}}$ -Einheit⁻¹.

Dargestellt ist die Anzahl Poren· Bilayer^{-1} aufgetragen gegen die Anzahl *Bilayer* mit n Poren. Die Klassenbreite beträgt 1 mit n=96 Messungen an 16 *Bilayern*.

3.4.2.9 Porendurchmesser von $\text{Tim}22_{\text{rekom}}$

Um den Porendurchmesser der von $\text{Tim}22_{\text{rekom}}$ konstituierten Pore zu bestimmen wurde die Polyethylenglykolausschluss-Methode nach Krasilnikov und Smart (1997) angewendet. Des Weiteren wurde die Porengröße mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen nach Hille zunächst approximativ bestimmt. **Abbildung 3.26** zeigt die relative Leitfähigkeit von $\text{Tim}22_{\text{rekom}}$ in Anwesenheit von PEG in Abhängigkeit zu den verschiedenen hydrodynamischen Radien der verwendeten PEG-Moleküle (siehe hierzu auch **Tabelle 2.4**). Für den voll geöffneten Kanal wurde ein Vestibül-Durchmesser von ~2,3 nm und ein Restriktionsdurchmesser im Inneren des Kanals von 1,8 nm ermittelt. Für den kleinen 67,5 pS Unterleitwert (250 mM KCl) ergibt sich ein kleinerer Restriktionsdurchmesser von 1,15 nm und ein Vestibüldurchmesser von 1,7

nm. Leitfähigkeitsmessungen ergaben einen Hauptleitwert von 540 ± 18 pS. Nach Hille (1992) und Smart (1997) ergibt sich damit ein Porendurchmesser von 1,8 nm. Sowohl über die PEG-Methode, als auch über Leitfähigkeitsmessungen können Porendurchmesser ähnlicher Grössenordnung ermittelt werden, die miteinander vergleichbar sind (näheres siehe Diskussion).

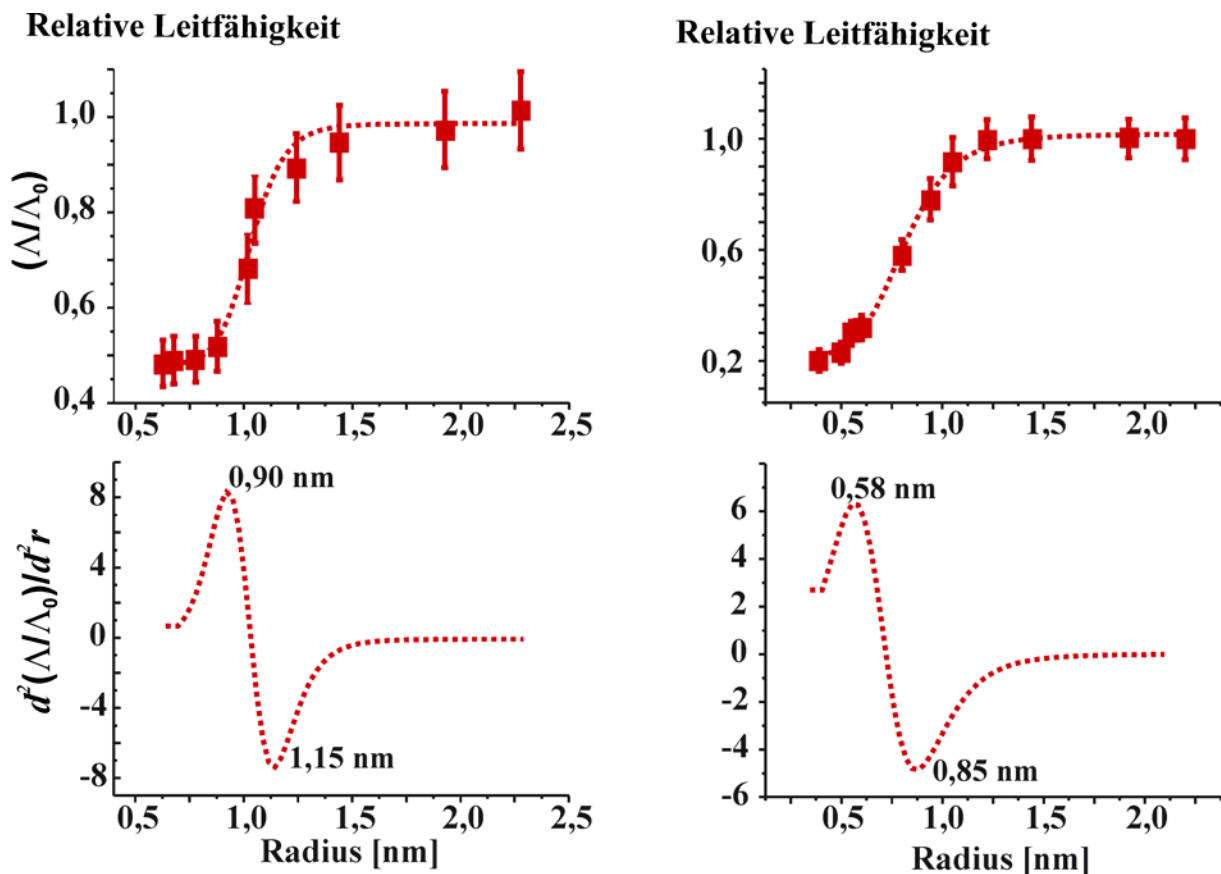


Abbildung 3.26: Bestimmung des Porendurchmessers von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ mit der PEG-Methode.

Relative Leitfähigkeiten Λ (mit PEG) gegenüber Λ_0 (ohne PEG) von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius des eingesetzten PEG (Salzbedingungen: 100 mM KCl symmetrisch mit PEG (20%, w/v, siehe 2.4.13). Die Kurve wurde rechnerisch angepasst nach mit einer logistischen *Dose-response* Funktion). (rechts) 2. Ableitung mit markierten Extrempunkten, die die minimalen und maximalen Ausschlussradien der eingesetzten PEG's repräsentieren.

3.4.2.10 Einfluss von P1, P2, P3, P4 auf Tim22_{rekom}

Es wurde der Einfluss von P1, P2, P3, und P4 auf Tim22_{rekom} mit Spannungsrampen und Spannungssprüngen bei asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) untersucht. Die **Abbildungen 3.27** und **3.28** zeigt Strom-Spannungskennlinien von Tim22_{rekom}, vor und nach Zugabe von nanomolaren (3.28) und mikromolaren (3.27) Konzentrationen P2 (*trans*). Das Umkehrpotenzial U_{rev} bleibt in allen Fällen unverändert. Ab Erreichen einer kritischen Spannung (+125 mV) schließen alle Poren im Bilayer. Die P2-Zugabe von *cis* zeigt keine Wirkung auf den Kanal (Daten hier nicht gezeigt, siehe Kovermann *et al.*, 2002). Es wurde untersucht ob P2 schon bei nanomolaren Konzentrationen auf Tim22_{rekom} wirkt. Dabei zeigt sich, dass schon Konzentrationen von 50 nM in Verbindung mit einem hohen Membranpotenzial ϕ_{mem} ein Schließen der Kanäle induzieren (siehe Truscott *et al.*, 2001). Die Wirkung von P2 kann mit dem Einfluss von P3, P4 und pCytOxIV über Spannungsrampen, bei asymmetrischen Bedingungen verglichen werden (siehe 2.7.2). In **Abbildung 3.27** sind zwei exemplarische Messungen, vor und nach Zugabe von pCytOxIV dargestellt. Das Präsequenzpeptid pCytOxIV hat keinen Einfluss auf die Selektivität von Tim22_{rekom}. Bis etwa +60 mV bleibt dieser Kanal sowohl mit als auch ohne pCytOxIV Zugabe voll geöffnet, fängt aber schon bei niedrigen Spannungen ($\geq +60$ mV) an zu schließen. Bei physiologischen Haltepotenzialen ($\geq +125$ mV) bleibt dieser Kanal dauernd geschlossen. Das positiv geladene Peptid wird durch die angelegte Spannung elektrophoretisch in den Kanal gedrückt, und verursacht dort einen spannungsabhängigen Block. (100 nM) zu einem Schließen des Kanals. Bei konstant gehaltenen hohen Haltepotenzialen (z.B. +125 mV, siehe **Abbildung 3.28 a**) schließt der Kanal nicht, sondern zeigt ein schnelles Schalten (Flickern). Bei Applikation von niedrigen Spannungen bleibt das Schaltverhalten von Tim22_{rekom} auch in Anwesenheit von P2 unbeeinflusst (Daten hier nicht gezeigt, siehe Kovermann *et al.*, 2001). Während dieser Messungen kam es nach P2-Zugabe stets zu Massenfusionen durch Tim22_{rekom}, was ebenfalls daraufhin deutet, dass die Aktivität der Kanäle durch P2 beeinflusst wird. Eine Auftragung der konzentrationsabhängigen Strominhibierung durch P2 bei Tim22_{rekom} macht deutlich, dass der Einfluss von P2 abhängig ist von hohen Spannungen (Schwellenpotenzial ≈ -125 mV). **Abbildung 3.28b** zeigt die relative Stromreduktion nach Zugabe von P2 zum Strom der Kontrolle ($I_{P2} \cdot I_{Kontrolle}^{-1}$) in Abhängigkeit von der angelegten Spannung.

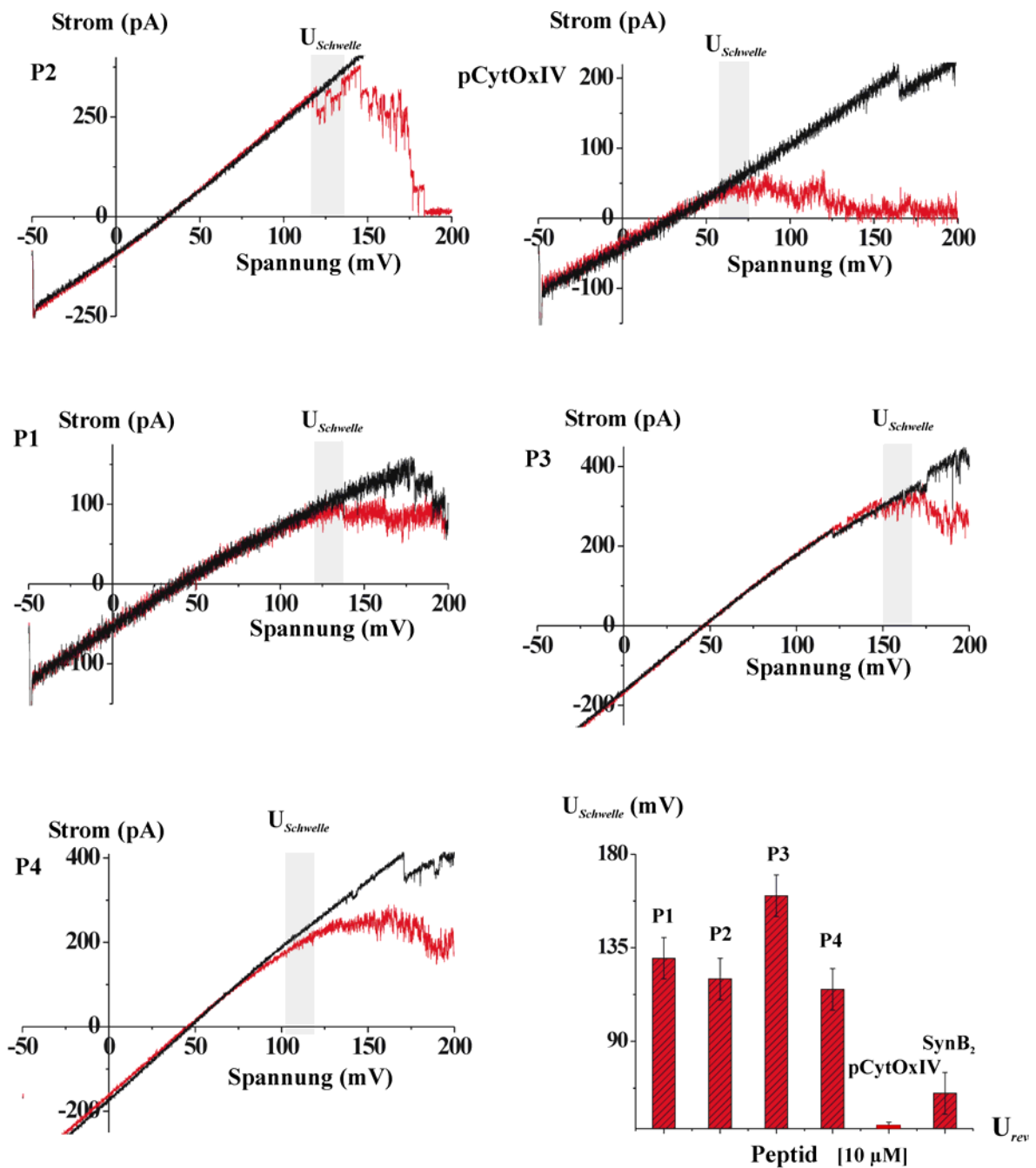


Abbildung 3.27: Einfluss von P1, P2, P3, P4 auf *Tim22_{rekom}*.

Spannungsrampen von *Bilayern* mit *Tim22_{rekom}* vor und nach Zugabe von 10 μ M Peptid (jeweils angegeben, *trans*) bei asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Die Schwellenpotenziale sind jeweils gekennzeichnet und in einem Säulengraphen mit den Daten zu SynB₂ vergleichend zusammengestellt [Filter 2kHz].

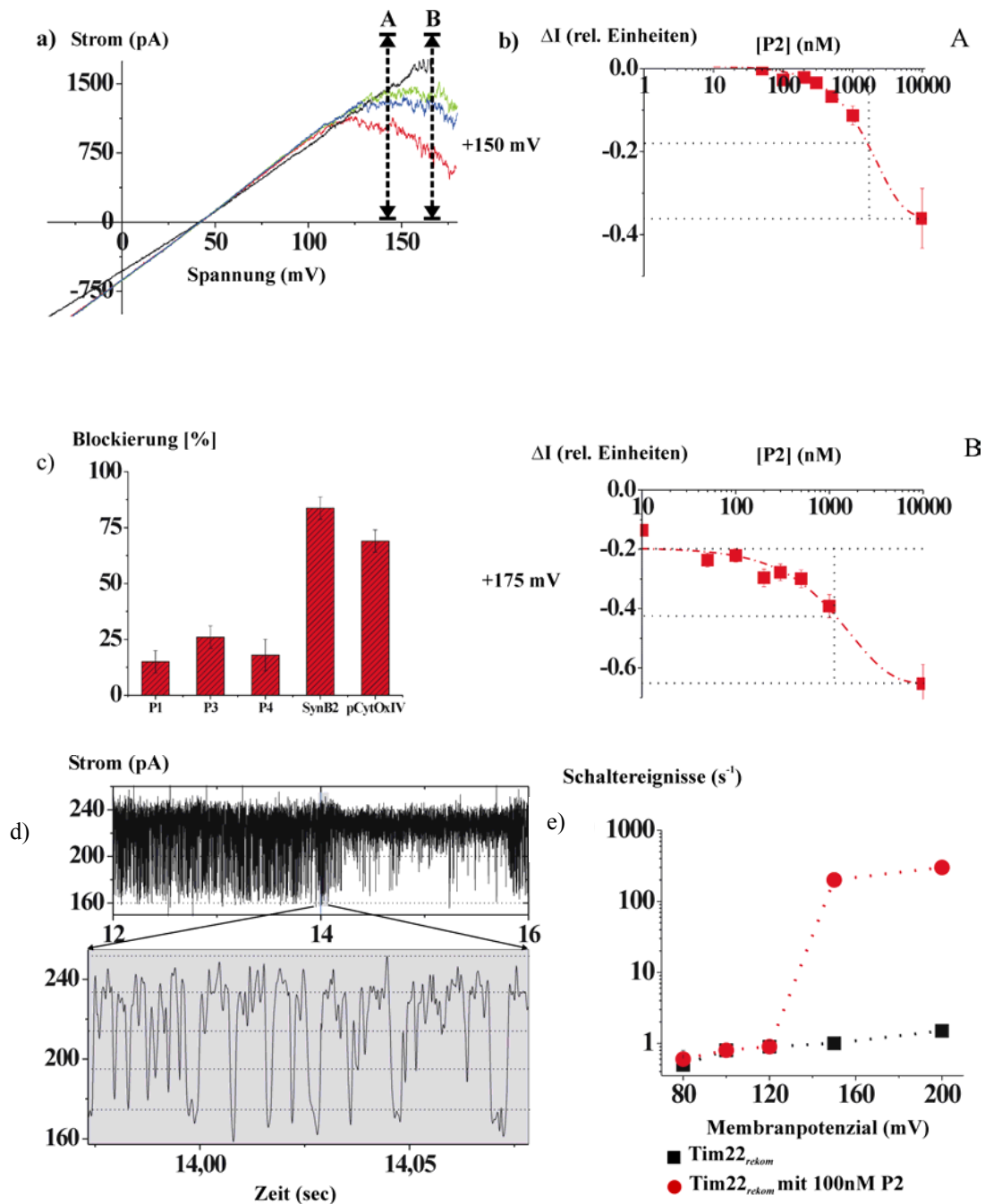


Abbildung 3.28: Einfluss von P2 auf $Tim22_{rekom}$

a) Strom-Spannungskennlinien von $Tim22_{rekom}$ unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vor und nach Zugabe von 0 (schwarz), 10 (grün), 50 (blau) und 100 (rot) nM P2 (*trans*). **b)** Relative Strom-Reduktion durch P2 (175 mV und 150 mV). Dargestellt sind Anpassungen (siehe 2.4.5) für P2 auf $Tim22_{rekom}$ unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) nach Zugabe von P2 auf der Niedrigsalzseite (*trans*). **c)** Blockierung von $Tim22_{rekom}$ durch Peptide (10 μM) in asymmetrischer Messung. **d)** Stromspur (+150 mV mit 100 nM P2) mit Fokus auf die angesteuerten Unterleitwerte. **e)** Schaltaktivität von $Tim22_{rekom}$ mit/ohne 100 nM P2 von *trans* bei verschiedenen positiven hohen Haltepotenzialen. $Tim22_{rekom}$ zeigt nur mit P2 in Verbindung mit hohen Haltespannungen (>120 mV) hohe Schaltaktivität ($\sim 300 \cdot s^{-1}$) zeigt. Ohne P2 bei niedrigen Haltespannungen schaltet der Kanal träge ($< 2 \cdot s^{-1}$, $n=3-8$) [Filter a,b: 2 kHz, c: 5 kHz].

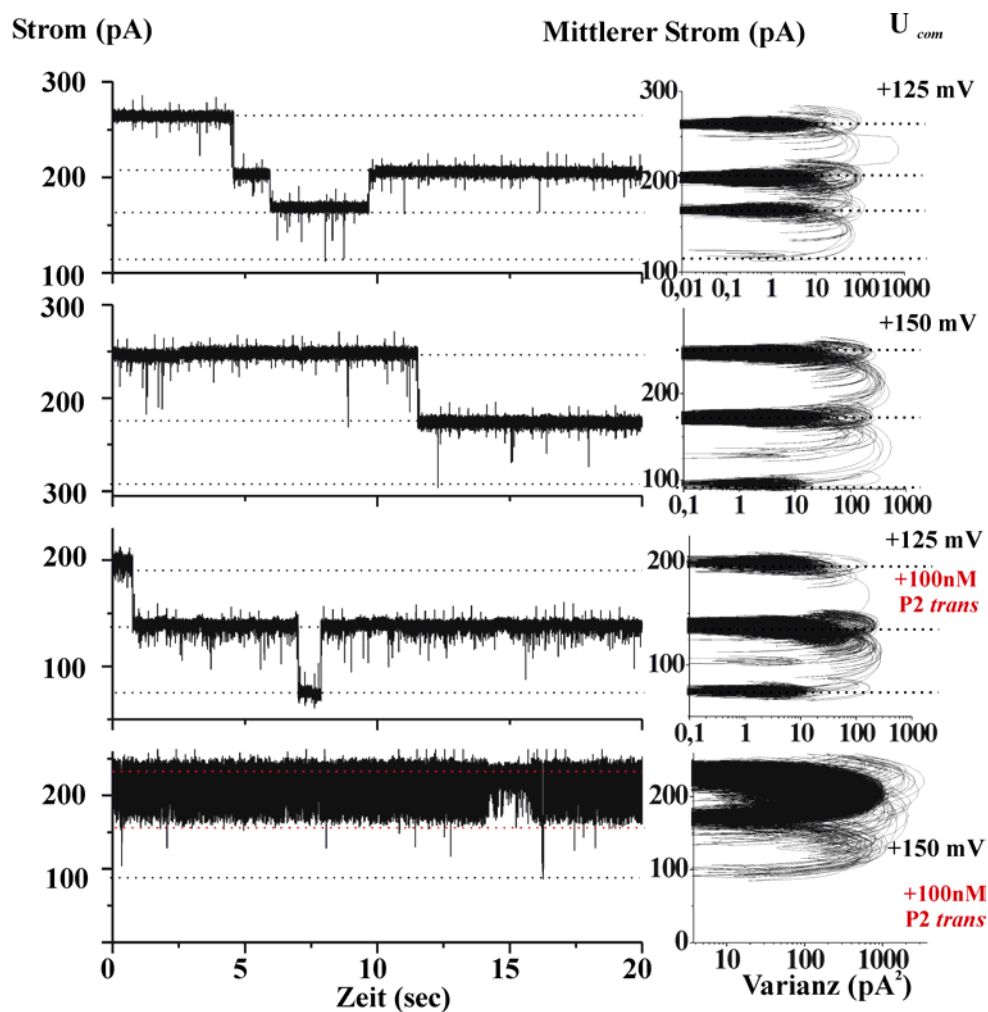


Abbildung 3.29: Einfluss von P2 auf $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ II.

Stromspuren von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$, vor und nach der Zugabe von P2 (100 nM) bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit dazugehörigen *Mean-Variance*-Darstellungen.

Bei niedrigen Spannungen muss die P2-Konzentration bei $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ mehr als $1 \mu\text{M}$ betragen. Niedrige P2-Konzentrationen inhibieren den Kanal nur nach Anwendung einer hohen Kommandospannung ($\geq +150 \text{ mV}$). Die Stärke der Stromreduktion durch einen gegebene Konzentration von P2 ist abhängig vom Membranpotenzial. Eine graphische Auftragung der Stromreduktion gegen die P2-Konzentration bei einer bestimmten Spannung zeigt bei welcher Konzentration der Kanal halbmaximal inhibiert ist. Es ergibt sich $\sim 1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (175 mV) und $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (150 mV).

Die Erhöhung der Spannung bewirkt eine (siehe **Abbildung 3.28a,b**), verstärkt also die Wirksamkeit des P2-Peptides. Das Schwellenpotenzial für die Interaktion von Tim22_{rekom} und P2 wurde über Spannungsrampen nach Zugabe von 10 μ M P2 auf der Wirkungsseite (*trans*) in asymmetrischen Hochsalzpuffern bestimmt (**Abbildung 3.27, 3.28d**) und beträgt unter diesen Bedingungen 120 ± 10 mV (n=5). Um die Spezifität der P2-Sequenz gegenüber Tim22_{rekom} genauer herauszuarbeiten, wurden die P2 Messungen mit Messungen nach Zugabe von geladenen Sequenzabschnitten des PiC verglichen (P1, P3 und P4). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe der geladenen Peptide (P1, P3 und P4) die Selektivität von Tim22_{rekom} nicht beeinflusst. Erst bei Erreichen einer hohen Spannung werden diese Peptide elektrophoretisch in die Poren gedrückt, induzieren aber kein vollständiges Schließen von Tim22_{rekom}. Die Schwellenpotenziale liegen im gleichen Bereich wie bei P2. P3 interagiert erst ab Spannungen von ~ 160 mV und P4 schon bei ~ 110 mV mit Tim22_{rekom}. Das Peptid P1 interagiert mit Tim22_{rekom} bei Spannungen um +130 mV.

3.5 Multiple Alignments P2

Um zu untersuchen welche Reste der PiC-Sequenz für die membranpotenzialabhängige Aktivierung von Tim22_{rekom} und den TIM22-Komplex essenziell sind, wurden Alignments des PiC mit bekannten Sequenzen der MCF-Proteinfamilie durchgeführt und bezüglich ihrer konservierten Reste untersucht. Zu diesem Zweck wurden in einem 1. Schritt *multiple alignments* des PiC mit 3 AAC-Isoformen (*S. cerevisiae*) durchgeführt. Das Ergebnis wurde dann im Anschluss mit einem *alignment* von PiC mit bekannten typischen MCF-Proteinen verglichen, und die konservierten Reste lokalisiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Vergleich des PiC und bekannten typischen mitochondrialen Matrixproteinen, mit den übrigen *alignments* zum Vergleich herangezogen. Der Vergleich von PiC mit den AAC-Isoformen 1-3 (*S. cerevisiae*) zeigt innerhalb der P2-Signalsequenz (siehe **Abbildung 3.30**, fett gedruckt, doppelt unterstrichen) zwei ungeladene identische Reste Leucin₂₁₉ und Glyzin₂₂₁, die jeweils von einander homologen ungeladenen Aminosäureresten (S/T₂₁₃, L/V₂₁₅, F/L₂₁₉) flankiert werden, denn der Austausch betrifft lediglich die Reste selbst, aber nicht ihre funktionellen Gruppen. An der Position N₂₁₇ und an der Position T₂₂₂ (PiC) wurden die Aminosäuren bei der AAC-Familie gegenüber der Primärstruktur von PiC konservativ durch Valin₂₂₂ ersetzt.

```

AAC3_Yeast      IVVYRGLYFGMFDSLKPLVLTGSLDG-----SFLASFLLGWVVTGAS
AAC2_Yeast      IVVYRGLYFGMYDSLKPLLLTGSLEG-----SFLASFLLGWVVTGAS
AAC1_Yeast      IIVYRGLYFGLYDSFKPVLTTGALEG-----SFVASFLLGWVITMGAS
PiC_Yeast       QIPYNIAKFLVFERASEFYGGFAGPKEKLSSTSTTLLNLLSGLTAGLAAA
                : * . * ::: . . : : : : * * . . * :

```

Abbildung 3.30: ClustalW-Alignment von PiC (Accession No.# P23641) mit 3 Isoformen des mitochondrialen AAC.

(Accession No.# A24849, #A31978, #A36582), dabei sind identische Reste rot dargestellt und einander homologe Aminosäuren sind grün dargestellt, konservative Austausche sind blau gekennzeichnet und die P2-Sequenz des PiC ist fett gedruckt und doppelt unterstrichen (BLOSUM62-Substitutionsmatrix).

Der Vergleich von PiC mit Primärstrukturen von bekannten typischen MCF-Proteinen (*S. cerevisiae*) zeigt innerhalb der P2-Signalsequenz (siehe **Abbildung 3.31**, fett gedruckt, doppelt unterstrichen) nur einen ungeladenen identischen Rest Glyzin₂₂₁, der von einander homologen ungeladenen Aminosäureresten (S/T₂₁₃, L/V₂₁₅, F/L₂₁₉) flankiert wird, denn der Austausch betrifft lediglich die Reste selbst, aber nicht ihre funktionellen Gruppen. Im

Umfeld der P2-Signalsequenz sind ein zweites konserviertes Glyzin₂₂₅ und ein Prolin₂₃₄ konserviert. Der Vergleich der beiden ermittelten Konsensussequenzen miteinander zeigt, dass lediglich die Reste (L/I)₂₁₉ und Glyzin₂₂₁ in allen untersuchten Carriern vorhanden sind. Leucin₂₁₉ kann lediglich durch Isoleucin ersetzt werden, wodurch sich die molekularen Eigenschaften des Segmentes nicht wesentlich ändern. Das Glyzin₂₂₁ ist in allen untersuchten Carrierspezies konserviert und scheint eine essenzielle Funktion zu besitzen. Im weiteren zeigt der Vergleich von PiC sowohl mit bekannten Carrierproteinen der inneren Mitochondrienmembran, als auch mit in dieser Arbeit charakterisierten PRAT-Proteinen und Tim17 innerhalb des untersuchten Sequenzabschnittes nur das konservierte Glyzin₂₂₁ (PiC).

```

2-ODC1      GIIFQIRKLLP-----AAKTSTEKTRNDLIAGAIGGTVGCLLNTPFDVV
2-ODC2      GVIYQVRNSMP-----VAKTKGQKTRNDLIAGAIGGTVGTMLNTPFDVV
Ornithine Carrier ATYEIVKKSLKDRHSLDDPKRDESKIWELLISGGSAGLAFNASIFPADTV
YMR166C     AFYEKFRQLAFKIE-QKDGRDGELSIPNEILTGACAGGLAGIITTPMDVV
PET8        PLYEYLKKTWAK-----ANGSQVEPWKGAICGSIAGGIAAATTPLDFL
PiC         LVFERASEFYYGFAGPKELSSTSTTLNLSGLTAGLAAAIVSQPADTL
                :                               : * . *          * * :

```

Abbildung 3.31: ClustalW-Alignment von PiC mit typischen Mitgliedern der MCF:

PiC (Accession No.# P23641), 2-Oxodicarboxylat Carrier I und II (Accession No.# Q03028 und Q99297), Ornithin Carrier (Accession No.# Q12375), YMR166C (Accession No.# Q03829) und PET8 (Accession No.# P38921), dabei sind identische Reste **rot** dargestellt und einander homologe Aminosäuren sind **grün** dargestellt, konservative Austausche sind **blau** markiert und die P2-Sequenz des PiC ist **fett** gedruckt und doppelt unterstrichen (BLOSUM62-Substitutionsmatrix).

Der Vergleich von PiC mit bekannten mitochondrialen Proteinen, die von der Matrix-Seite her inseriert werden, zeigt keine Sequenzähnlichkeit und kein konserviertes Glyzin im untersuchten Abschnitt, was daraufhin deutet, dass derartige Segmente in Matrixproteinen nicht vorkommen. Innerhalb der P2-Signalsequenz befindet sich also **nur** ein Rest (Glyzin₂₂₁), der an gleicher Sequenzposition in allen untersuchten homologen Proteinen vorkommt (siehe **Abbildung 3.32**).

```

2-ODC1      VLSLFNGLEATIWRHVLWNAGYFGIIFQIRKLLP-----AAKTSTEKTRNDLIAGAIGG

```

```

2-ODC2      IMGLYKGIESTMWRNALWNGGYFGVIYQVRNSMP-----VAKTKGQKTRNDLIAGAIGG
P2_PiC      IGSFYSGFTPILFKQIPYNIAKFLVFERASEFYGFAGPKKLSSTSTLLNLLSGLTAG
Tim17       FSTFDCAVKAVRKREDPWN-----AIIAGFFTG
Tim23       LGIGGFSGMMQGLQNIPPNSPGKLQLNTVLN-----HITKRGPFLG
           .       .       :       *
           .       .       :       *
           .       .       :       *

```

Abbildung 3.32: ClustalW-Alignment von PiC mit bekannten MCF-Proteinen unter Berücksichtigung von Tim23 und Tim17.

Tim23 (*S. cerevisiae* Accession No.# P32897), Tim17 (*S. cerevisiae* Accession No.# P39515), 2-Oxodicarboxylat Carrier 1 (*S. cerevisiae* Accession No.: # Q03028), 2-Oxodicarboxylat Carrier 2 (*S. cerevisiae*, Accession No.:#Q99297) und dem mitochondrialen Phosphat-Carrier (Accession No.# P23641). Verwendung der BLOSUM62-Substitutionsmatrix (siehe 2.2). Identische Reste sind **rot** dargestellt, einander homologe Aminosäuren sind **grün** dargestellt und konservative Austausche sind **blau** gekennzeichnet. Die P2-Signalsequenz ist **fett** gedruckt und doppelt unterstrichen.

```

Cox1p_Yeast  DTRAYFTSATMIIAIPITGIKIFSWLATIHGGSIRLATPMLYAIAFLFLFT
Cox3p_Yeast  -----GNRNKALSGLLITFWLIVIFV
Cox4p_Yeast  -----CTGSPAGSHTIMWLKPTVNEVA
PiC_Yeast    -----FAGPKKLSSTSTLLNLLSGLT
           : ..

```

Abbildung 3.33: ClustalW-Alignment von PiC mit bekannten mitochondrialen Proteinen.

PiC (Accession No.# P23641) mit den typischen mitochondrialen Matrixproteinen Cox1p, 3p, 4p (Accession No.# NP_009305, # NP_011328, # NP_009326), unter Verwendung der BLOSUM62-Substitutionsmatrix, dabei sind identische Reste **rot** dargestellt und einander homologe Aminosäuren sind **grün** dargestellt, konservative Ersetzungen sind **blau** markiert und die P2-Sequenz des Phosphat Carriers ist **fett** gedruckt und doppelt unterstrichen.

3.6 Charakterisierung des TIM22-Komplexes

3.6.1 Biochemie

3.6.1.1 Isolation des TIM22-Komplexes

Die nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte (3.6.1.1 und 3.6.1.2) sind von Dr. Peter Rehling (AG Prof. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg) durchgeführt worden. Das Isolat wurde mir in Form von BN-PAGE Gel-Streifen zur funktionellen Rekonstitution in SIV-Liposomen für Messungen in planaren *Bilayern*, überlassen. Um den TIM22-Komplex in einer stabilen funktionellen Form aufzureinigen wurde zunächst der Komplex Bestandteil Tim18 mit einem carboxyterminalen ProtA-tag versehen. Der ProtA-tag enthält zwei Immunglobulin G-bindende Domänen die durch eine TEV-Protease Erkennungsstelle vom Tim18 getrennt sind. Die Manipulation am Tim18 beeinflusst weder das Wachstum, noch die Funktion der Mitochondrien (siehe hierzu: *supporting online material*, Rehling *et al.*, 2003). Die so modifizierten Mitochondrien wurden isoliert, mit dem Detergens Digitonin lysiert, und so die Membrankomplexe solubilisiert. Das Solubilisat wurde anschließend auf eine Ig-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach der Bindung des TIM22-Komplexes an die Säulenmatrix, waschen mit dem 15-fachen Säulenvolumen (0,3% (w/v) Digitonin, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(KOAc)₂, 10% (w/v) Glycerin, 0,1 mM EDTA, 2 mM PMSF in 20 mM HEPES/KOH pH 7.5) und nachfolgender Spaltung mit TEV-Protease wurde dann der 300 kDa große TIM22-Komplex von der Säule eluiert. SDS-PAGE Analysen zeigen, dass sich ausschließlich Proteine des TIM22-Komplexes im Eluat befanden. Der intakte TIM22-Komplex konnte demnach isoliert werden. Nach proteolytischer Abspaltung des ProtA-tags von Tim18 migrierte der TIM22-Komplex auf gleicher Höhe im BN-PAGE Gel wie der Wildtyp-Komplex, und konnte so in nativer funktioneller Form abgetrennt werden. Gelstreifen im Bereich von 300 kDa wurden ausgeschnitten und mir zur funktionellen Rekonstitution in planare Bilayer überlassen. Die Elution des TIM22-Komplexes aus dem BN-PAGE Gelfragment kann über Inkubation mit Solubilisierungspuffer (25 mM Tricine, 7,5 mM Bis-Tris pH 7,0, mit 1 % HTGP) übernacht auf einem Schüttler durchgeführt werden. Das erhaltene Solubilisat wird dann standardmäßig in SIV-Liposomen (gelöst in 25 mM Tricine, 7,5 mM Bis-Tris pH 7,0 mit 1% (v/v) HPTG) rekonstituiert (siehe 2.1.12). Die Ergebnisse der Isolation sind in **Abbildung 3.34** dargestellt. Die isolierten TIM22-Komplexe unterscheiden

sich nicht in der Mobilität von Komplexes aus mitochondrialen Wildtyp-Lysaten und können in reiner Form gewonnen werden.

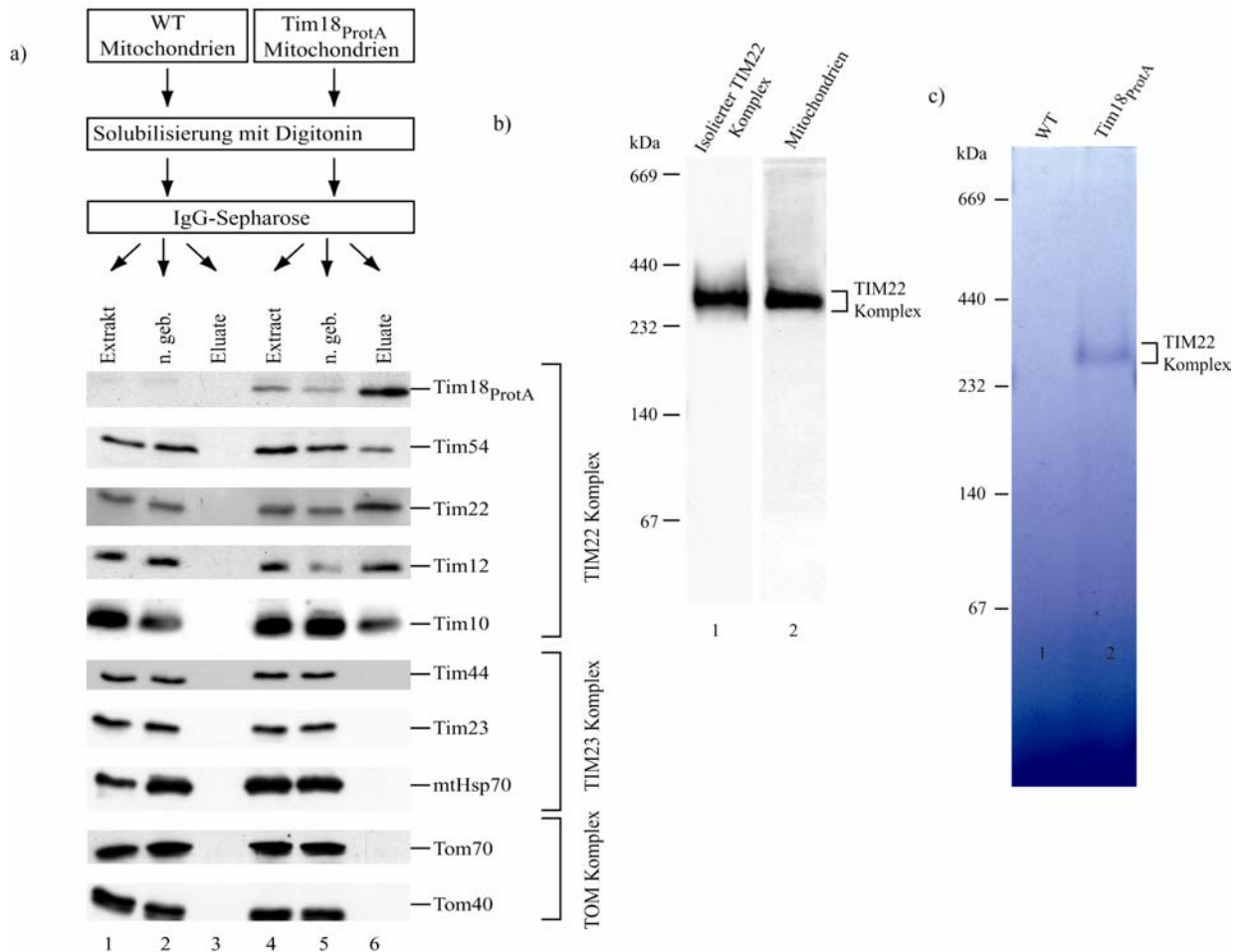


Abbildung 3.34: Aufreinigung des TIM22-Komplexes aus Hefe-Mitochondrien

a) Identifikation der Bestandteile des TIM22-Komplexes über Immunoblotting mit Behandlungsprotokoll (näheres siehe Text). **b)** Isolierte TIM22-Komplexe und Komplexe aus mitochondrialen Lysaten besitzen dieselbe Mobilität. Die BN-PAGE Analyse zeigt den Vergleich der Laufstrecken beider Proben. Die Detektion der Komplexe wurde über Antikörper gegen Tim22 durchgeführt. **c)** Bis auf Tim18-ProtA-Komplexe sind keine weiteren Proteine im Eluat nachweisbar (entnommen aus Rehling *et al* 2003).

3.6.1.2 Insertion von Carriern durch den TIM22-Komplex

Mit Ionophoren, von unterschiedlicher Konzentration (CCCP-Carbonylcyanid-*m*-Chlorophenyl-hydrazon), behandelte Mitochondrien wurden auf den Import von radioaktiven Vorstufenproteinen hin analysiert. Die BN-PAGE (**Abbildung 3.35**) zeigt wie S³⁵-markierte Dicarboxylat Carrier membranpotenzialabhängig in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert werden (50 µg Protein in 1% BSA und 20 µM Oligomycin). Die Bahnen zeigen den DCC-Import in Abwesenheit (Bahn 10) und mit ansteigenden Dieser Befund deutet daraufhin, dass das Membranpotenzial $\Delta\phi_{mem}$ unterschiedlich große Energiebeiträge bei den einzelnen Insertionsschritten leistet. Die Platzierung des zu inserierenden Carriers in unmittelbarer Nähe der Insertionsmaschinerie (engl.: „*docking*“) erfordert kein Membranpotenzial $\Delta\phi_{mem}$, während die Einfädung (engl.: „*tethering*“) des Präcursors in den Insertionskanal eine geringe Membranspannung ϕ_{mem} von <60 mV erfordert. Rehling *et al.*, 2003).

Biochemisch konnte gezeigt werden, dass der zu inserierende Präcursor während der losen Anbindung an den Komplex, und bei der Einfädung in den Komplex jeweils unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber der Ionenstärke des Mediums aufweist, woraus geschlossen wird, dass der Carrier unterschiedliche molekulare Umgebungen am TIM22-Komplex durchläuft. Der lose angebundene „*docked*“ Carrier befindet sich in einer hydrophoberen Umgebung als die eingefädelte „*tethered*“ Form des zu inserierenden Proteins (Rehling *et al.*, 2003).

Frühere Experimente an Hefe (*S. cerevisiae*) haben gezeigt, dass Tim22 das einzige essenzielle Kernprotein des Komplexes darstellt. Die Depletion aller weiteren Komplexbestandteile setzte die Proteinimportraten nur unwesentlich herab, oder führte zur Bildung von temperatursensitiven, aber lebensfähigen Mutanten (Kovermann *et al.*, 2002). Protonophor-Konzentrationen (Bahn 1-9). Ohne CCCP wurde der Carrier hauptsächlich in seiner nativen dimeren Form vorgefunden, während die Anwesenheit von Protonophoren zu einer CCCP-konzentrationsabhängigen Akkumulation des monomeren Stufe III Intermediates führte. Bei mittleren Stärken des Membranpotenzials wurde dann vermehrt ein putatives hochmolekulares Stufe IV Intermediat gebildet.

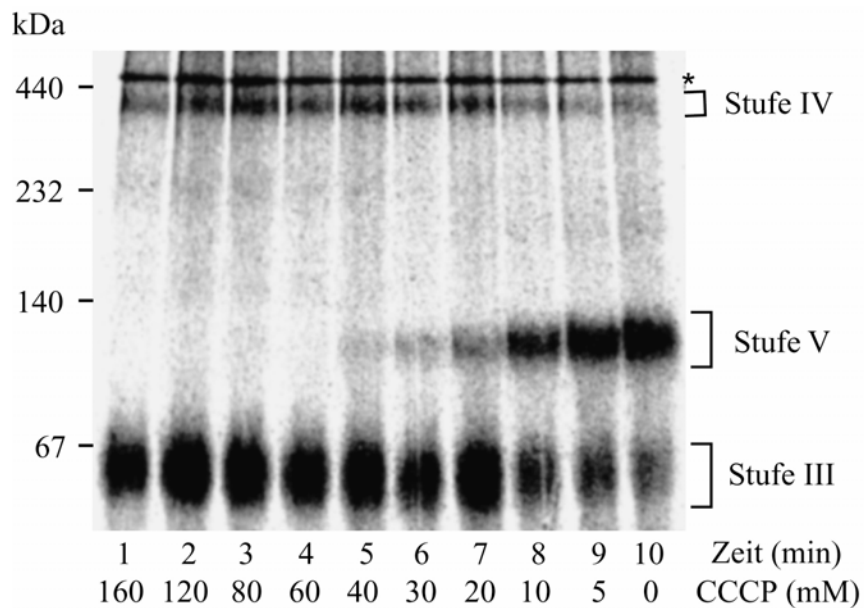


Abbildung 3.35: Akkumulation eines Vorstufenproteins.

Die Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials führt zur Akkumulation eines Vorstufenproteins an bestimmten Stufen des Insertionsprozesses (entnommen aus Rehling et al., 2003).

Es kann gezeigt werden, dass die partielle Entkopplung des mitochondrialen elektrochemischen Gradienten, zur Akkumulation von charakteristischen Transportintermediaten eines Carriers bei distinkten Insertionsschritten führt. Ohne Zugabe von CCCP ($\Delta\phi_{full}$) findet man den Carrier vorwiegend in seiner nativen dimeren Form in der IMM. Die Entkoppelung des mitochondrialen Membranpotenzials führt zu einer Akkumulation des Stufe III Translokationsintermediates (**siehe Abbildung 3.35, 3.36**), während die partielle Entkoppelung des Membranpotenzials ($\Delta\phi_{partial}$) eine Anreicherung eines hochmolekularen Zwischenproduktes zur Folge hat.

Das Molekulargewicht dieses Zwischenprodukt entspricht dem Molekulargewicht des radioaktiv markierten Carriers, gebunden an den TIM22-Komplex.

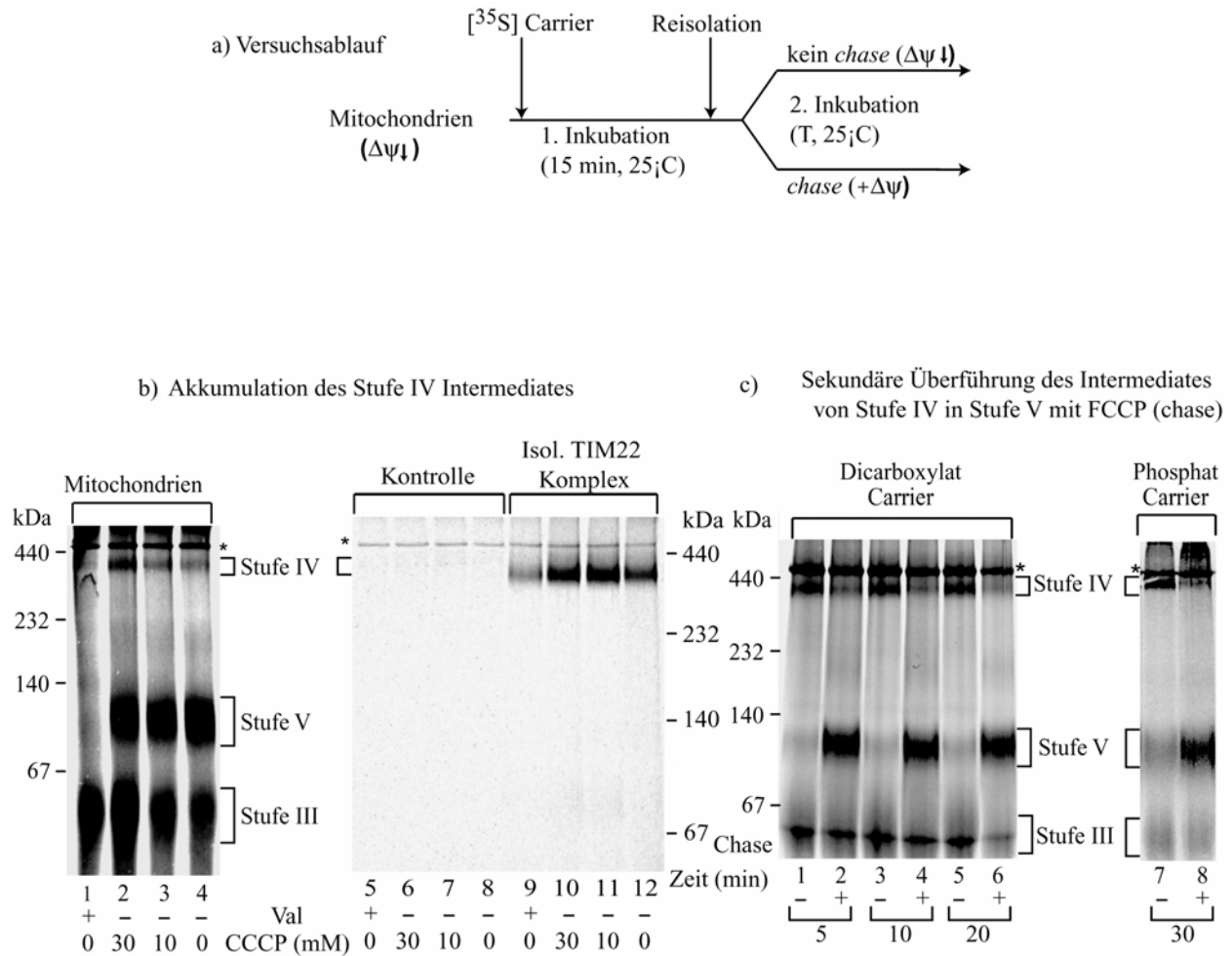


Abbildung 3.36: Membranpotenzialabhängigkeit der einzelnen Stufen des Importes von Carriern.

Vorstufenproteine können in isolierten Mitochondrien nach herabgesetztem Membranpotenzial (40 μM FCCP) bei Stufe IV arretiert werden **a)** und danach wieder künstlich durch die Depletion von FCCP (+ $\Delta\psi$) in das Stufe V Intermediat überführt werden. **b)** Das Membranpotenzial ($\Delta\psi$) ist für die Bildung des Stufe IV Intermediates nicht erforderlich, während die Überführung in das Stufe V Intermediat nur in Mitochondrien stattfinden kann, deren Membranpotenzial unbeeinflusst ist. **a)** Akkumulation des Stufe IV Intermediates im TIM22-Komplex. Um die Akkumulation von Stufe IV verfolgen zu können wurden die Carrier mit ^{35}S markiert und sowohl in Wildtyp-Mitochondrien, als auch in $\text{Tim18}^{\text{ProtA}}$ -Mitochondrien importiert. Das Membranpotenzial wurde durch Zugabe des Protonophors CCCP, und dem Ionophor Valinomycin herabgesetzt. Die BN-PAGE Analyse zeigt das das Stufe IV Intermediat im Gel auf gleicher Höhe wie der Komplex migriert, also mit ihm assoziiert ist. **c)** Sekundäre Überführung von Stufe IV-arretierten Carriern in Stufe V Intermediate. Sowohl DCC als auch PC wurden in Hefemitochondrien im Beisein von 40 μM FCCP (1% BSA, 20 μM Oligomycin) auf Stufe IV akkumuliert und nach Isolation in frischem Importpuffer (NADH, ATP) resuspendiert. Nur die weitere Zugabe von FCCP (*no chase*) kann den Import von den akkumulierten ^{35}S -markierten Carriern weiterhin hemmen. Die Depletion von FCCP (*chase*) führt zum Import der akkumulierten Stufe IV Intermediate (entnommen aus Rehling *et al.*, 2003).

3.6.1.3 Elektronenmikroskopie am isolierten TIM22-Komplex

Um zu untersuchen, ob das integrale Membranprotein Tim22 eine Pore durch die IMM konstituiert wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des TIM22-Komplex von Kirstin Model (MPI Frankfurt) erstellt und analysiert.

Die Analyse von 16 elektronen-mikroskopischen Aufnahmen (n=4284 Einzelpartikel) ergab 12 Projektionsklassen des TIM22-Komplexes (siehe **Abbildung 3.37**). Dabei wurden sowohl Partikel mit 2 Farbstoff gefüllten Zentren, als auch Partikel mit Verbindungen der Zentren miteinander, und Partikel mit Erweiterungen der einzelnen Zentren identifiziert. Zusätzlich konnten Partikel mit 4 Farbstoff-gefüllten Zentren gefunden werden, die Seitenansichten und/oder zusätzliche Konformationszustände des TIM22-Komplexes darstellen (Rehling *et al.*, 2003).

Ein Vergleich der Farbstoffdichteprofile des TIM22-Komplexes mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen des TOM-Komplexes zeigt Unterschiede zwischen den beiden Carrier-Translokasen auf. Die Farbstoff-gefüllten Zentren des TOM-Komplexes haben breitere Durchmesser und ihre Farbstoffdichteprofile weisen tiefere lokalere Maxima auf, als die Zentren des TIM22-Komplexes auf. Daraus wird geschlossen, dass sich die Durchmesser der Poren bei beiden Systemen unterscheiden. Die Poren des TIM22-Komplexes sind enger (16 Å) als die Poren des TOM-Komplexes (25 Å) und der TIM22-Komplex ist kleiner ($110 \cdot 45 \pm 2$ Å) als der TOM-Komplex ($125 \cdot 45 \pm 2$ Å). Der TIM22-Komplex ist also kleiner als der TOM-Komplex, jedoch weisen beide 2 Poren pro Komplex auf.

Während die Hauptklassen der erhaltenen Ansichten des TIM22-Komplexes durch Projektionen mit 2 Poren repräsentiert werden, so stellen die restlichen Ansichten mögliche Konformationszustände der Translokase während des Insertionsablaufs dar (Rehling *et al.*, 2003).

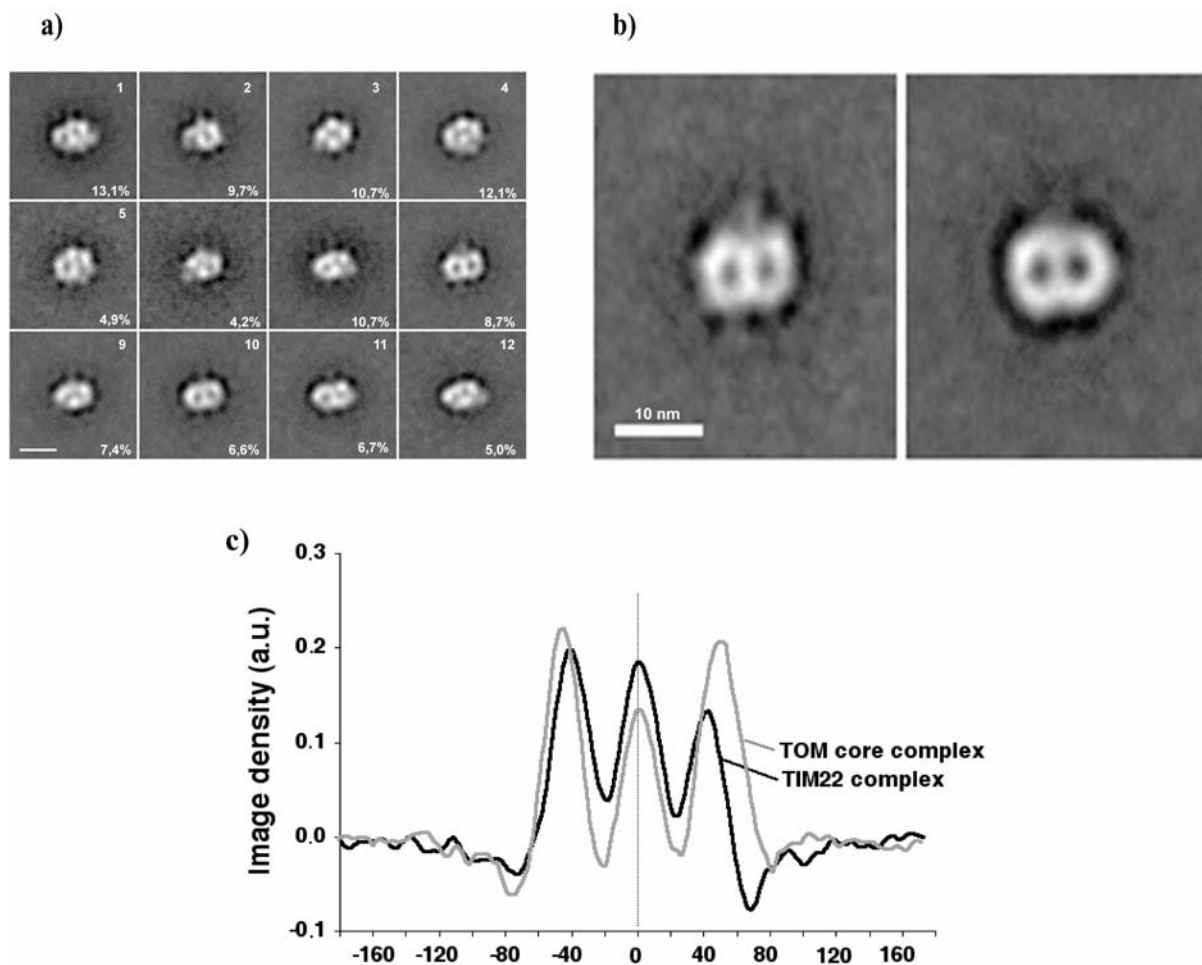


Abbildung 3.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae*.

a) Klassenverteilung der erhaltenen Projektionen, Färbung über 2% Uranylacetat), mit freundlicher Genehmigung von Kirstin Model (MPI Frankfurt) und Peter Rehling (Universität Freiburg). Die Hauptprojektionsklassen werden durch doppelporige Komplexe gebildet. **b)** Elektronenmikroskopischer Vergleich der erhaltenen doppelporigen Projektionen von isolierten TIM22-Komplexen und isolierten TOM-Komplexen. **c)** Farbstoffdichteprofilvergleich zwischen den zwei Hauptklassen der erhaltenen Projektionen des TIM22-Komplexes mit den Projektionshauptklassen des TOM-Komplexes. Es ist zu erkennen, dass eine der beiden TIM22-Poren leicht zur Seite abgewinkelt zu sein scheint. Im Vergleich zum TOM-Komplex dringt der Farbstoff nicht so tief in die Pore ein. Mit dem TOM-Komplex wird nur eine geringere Farbstoffdichte im Inneren der Poren erreicht (entnommen aus Rehling *et al.*, 2003).

3.6.2 Elektrophysiologische Messungen am TIM22-Komplex

3.6.2.1 Fusionstests mit dem TIM22-Komplex

Osmotische Fusionen fanden nur nach Induktion mit P2 statt. Ohne P2 kam es nur zu vereinzelt Anionen-selektiven Aktivitäten ($n=3$). Nach Induktion mit P2 kam es in der Regel zu sofortigem Auftreten von 1 bis 10 kationischen Doppelporen

3.6.2.2 Leitfähigkeit vom TIM22-Komplexen

Um die Leitfähigkeit und das Schaltverhalten von TIM22-Komplexen zu untersuchen, wurden TIM22-Komplexe bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) vermessen. Der TIM22-Komplex wird erst nach vorheriger Induktion mit P2 aktiv. Nur in einem Fall konnte eine kationische Aktivität ohne vorherige Zugabe von P2 detektiert werden. Ohne P2 konnten nur vereinzelte anionenselektive Aktivitäten beobachtet werden.

Die Ermittlung der Schaltaktivität erfolgt nach 2.4.14 unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Nach Spannungssprüngen zeigt der TIM22-Komplex zwei gekoppelte Poren. Beide Kanäle zeigen bei positiven Strömen je eine voll geöffnete Pore mit einem großen Leitwert von 540 ± 10 pS, während bei negativen Spannungen, bei beiden Kanälen, die Leitfähigkeit jeweils unterschiedlich stark abnimmt (siehe **Abbildung 3.38, 3.40**).

Eine der beiden Poren zeigt nur eine leichte Asymmetrie (445 ± 10 pS, $\phi_{mem} > 0$ mV), während die andere Pore eine rektifizierende Strom-Spannungskennlinie besitzt (280 ± 10 pS, $\phi_{mem} < 0$ mV).

Ohne P2 zeigt der TIM22-Komplex ein langsames Schaltverhalten mit einer Schaltaktivität von weniger als $10 \cdot s^{-1}$ über den gesamten Messbereich von 0 bis +150 mV ($n=3$, siehe **Abbildung 3.40**).

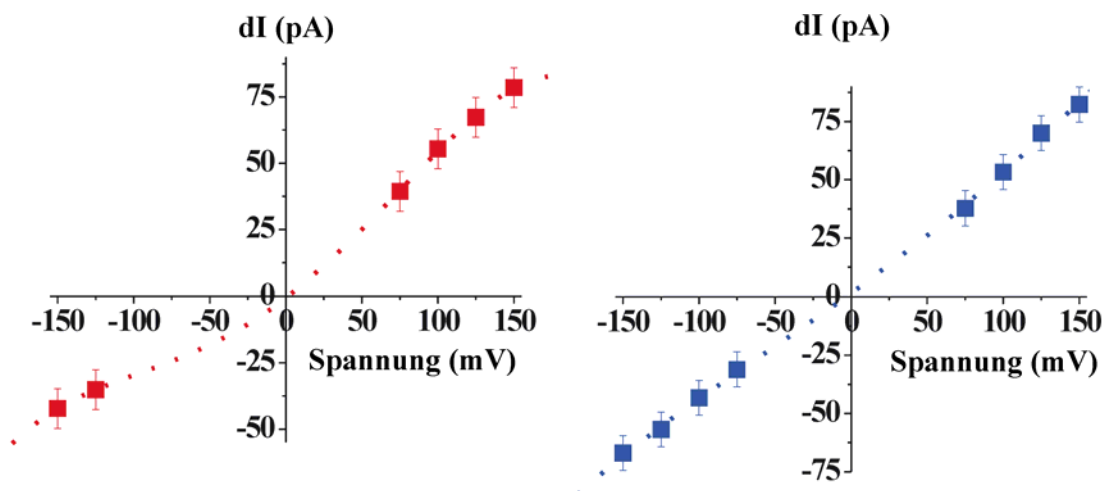


Abbildung 3.38: Strom-Spannungskennlinien des nativen TIM22-Komplexes.

Der Kanal konstituiert zwei Poren, mit unterschiedlichen Kennlinien. Beide Kanäle zeigen einen positiven Hauptleitwert von 540 pS und jeweils unterschiedlich stark verminderte negative Leitwerte (280 pS und 445 pS).

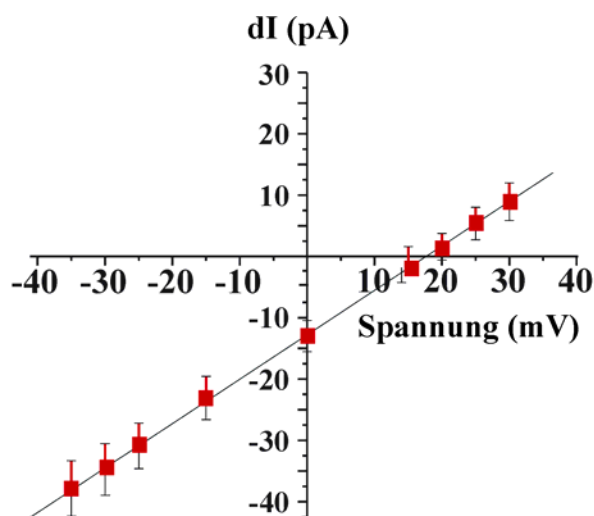


Abbildung 3.39: Selektivität von TIM22-Komplexen.

Dargestellt ist die Strom-Spannungskennlinie des TIM22-Komplexes unter asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2). Bei den Messungen an der BN-PAGE-Probe fanden wir erst nach Induktion mit P2 kationische Aktivitäten mit Umkehrpotenzialen $U_{rev} \approx +18$ mV.

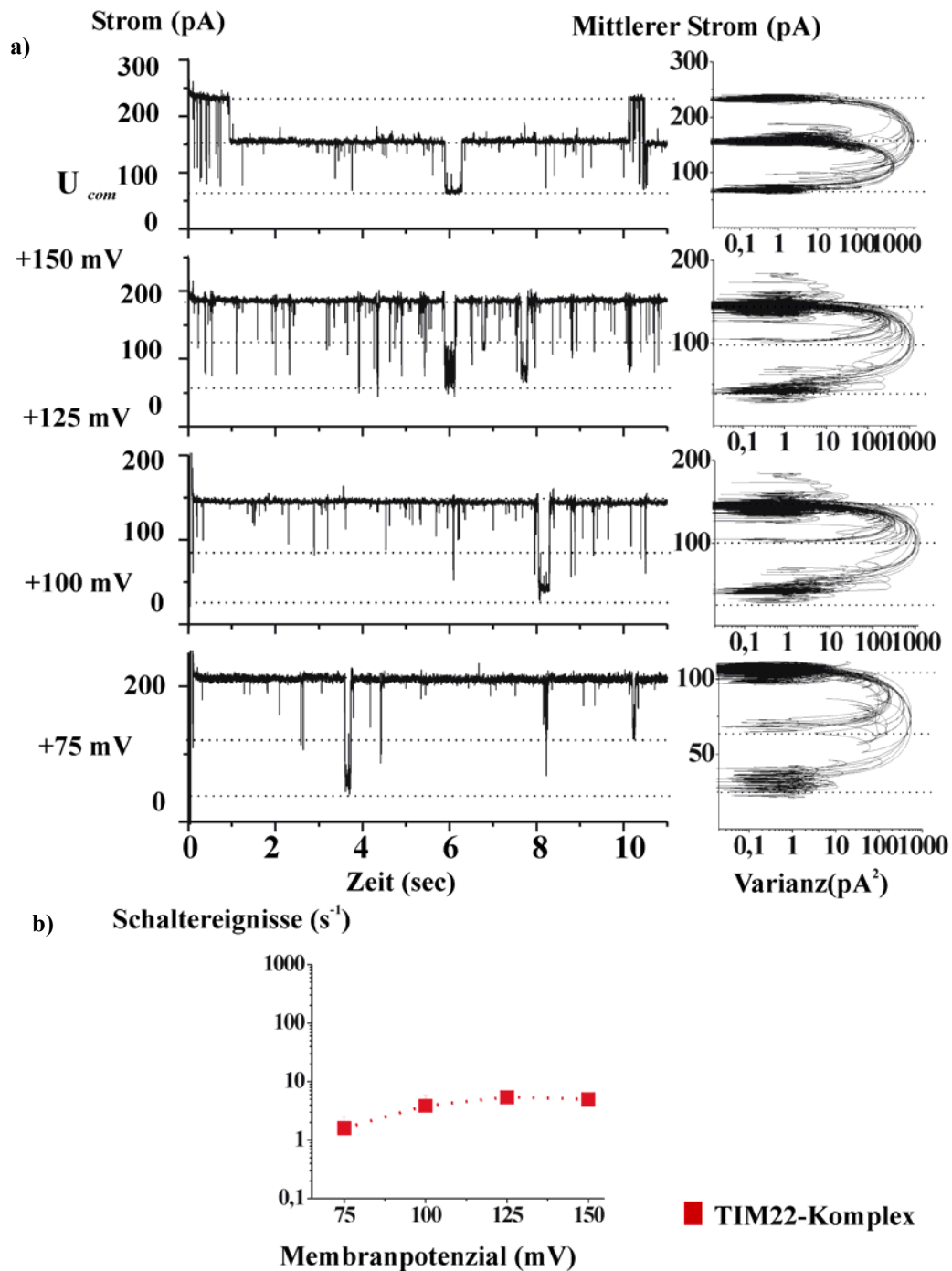


Abbildung 3.40: Stromspuren und Schaltaktivität des nativen TIM22-Komplexes.

a) Stromspuren eines Bilayers mit TIM22-Komplexen unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit korrespondierenden *Mean-Variance* Darstellungen. Haltepotenziale sind jeweils angegeben. **b)** Spannungsabhängigkeit der Schaltaktivität [Filter: 5kHz].

3.6.2.3 Selektivität des TIM22-Komplexes

Um die Selektivitätseigenschaften von TIM22-Komplexen mit $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ zu vergleichen, wurden TIM22-Komplexe bei asymmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit Spannungssprüngen vermessen. Dabei zeigt der TIM22-Komplex eine leichte Kationenselektivität ($U_{\text{rev}} \geq +18$ mV, siehe **Abbildung 3.39**). Das Umkehrpotenzial U_{rev} konnte nicht weiter eingegrenzt werden, da die Selektivität des Patches erheblich schwankte. Es wurden daher in den folgenden Experimenten nur Kanäle mit einem Umkehrpotenzial $U_{\text{rev}} \geq +18$ mV vermessen.

3.6.2.4 Einfluss von P2 auf den TIM22-Komplex

Um den Einfluss der P2-Signalsequenz auf die Aktivität der einzelnen Poren zu untersuchen wurden einminütige Stromspuren des TIM22-Komplexes aufgezeichnet, und die relative Häufigkeit der Offenzustände Offen_1 und Offen_2 innerhalb der ersten 10 Sekunden mit der relativen Häufigkeit der Offenzustände nach 50 Sekunden verglichen. In **Abbildung 3.41** sind die Ergebnisse in einem Säulengraphen zusammengefasst, und in **Abbildung 3.42a** sind exemplarische Stromspuren des TIM22-Komplexes vor (links) und nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ P2 (rechts) abgebildet. Es stellte sich heraus, dass der TIM22-Komplex ohne Zugabe von P2, hauptsächlich den voll geöffneten Zustand beider Poren des Komplexes einnimmt. Der Geschlossenzustand wird fast nicht angesteuert. Nur bei Spannungen ab $+150$ mV schließt der Kanal für kurze Zeit, ohne Zugabe der Signalsequenz P2. Nach Zugabe von P2 kommt es dann zu einer veränderten Distribution der Offenzustände. In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ P2 auf der *trans*-Seite des Kanals tritt hauptsächlich der Offen_2 -Zustand und der Geschlossenzustand auf. Die längere Anwendung einer hohen Haltespannung führt zu einem permanenten Verschluss vom TIM22-Komplex. P2 induziert ein Flickern bei einer der beiden Poren des Komplexes, während die andere Pore jeweils geschlossen vorliegt. Das Flickern stoppt, wenn die andere Pore wieder öffnet. Ein derartiges Schaltmuster ist minutenlang zu beobachten. Schon nach Zugabe von 100 nM P2 zeigt der TIM22-Komplex eine starke Erhöhung der Schaltfrequenz schon bei geringen Spannungen (>50 mV) (siehe **Abbildung 3.42b**). Die Schaltfrequenz steigt auf 500 bis 600 s^{-1} an. Vergleicht man die Schaltaktivität von $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ und TIM22-Komplexen mit und ohne P2 im Medium so erkennt man, dass die

spannungsabhängige Aktivierung des nativen Kanals schon bei relativ niedrigen Membranpotenzialen erreicht wird gegenüber dem rekombinant exprimierten Protein. Ohne P2 zeigt der TIM22-Komplex ein träges Schaltverhalten mit Schaltaktivität über den gesamten Spannungsbereich von ≤ 1 bis $10 \cdot s^{-1}$. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur die Schaltaktivität von TIM22-Komplex durch P2 verändert wird, sondern auch die Offenwahrscheinlichkeit der Poren. Der native Komplex ist im Beisein von P2 schon bei geringen Spannungen aktiver als $Tim22_{rekom}$ (siehe **Abbildung 3.42b**).

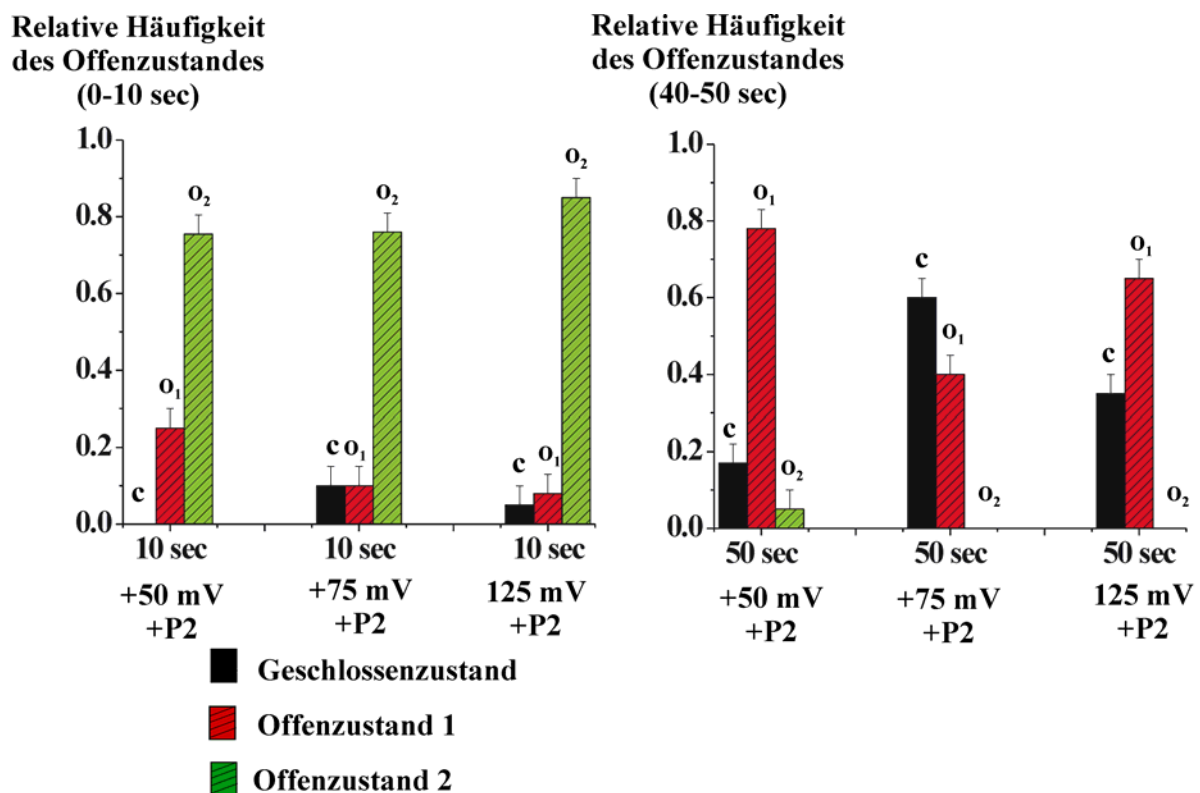


Abbildung 3.41: Einfluss von P2 auf die Offenwahrscheinlichkeit vom TIM22-Komplex.

Dargestellt sind die relativen Anteile der Offenzustände des TIM22-Komplexes, innerhalb der ersten 10 Sekunden nach dem angewendeten Spannungssprung (0,1-10 Sekunden, links, Haltepotenziale sind jeweils angegeben), und nach 40 Sekunden Spannungsexposition (40-50 Sekunden, rechts) unter symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) mit $10 \mu M$ P2 von *trans*.

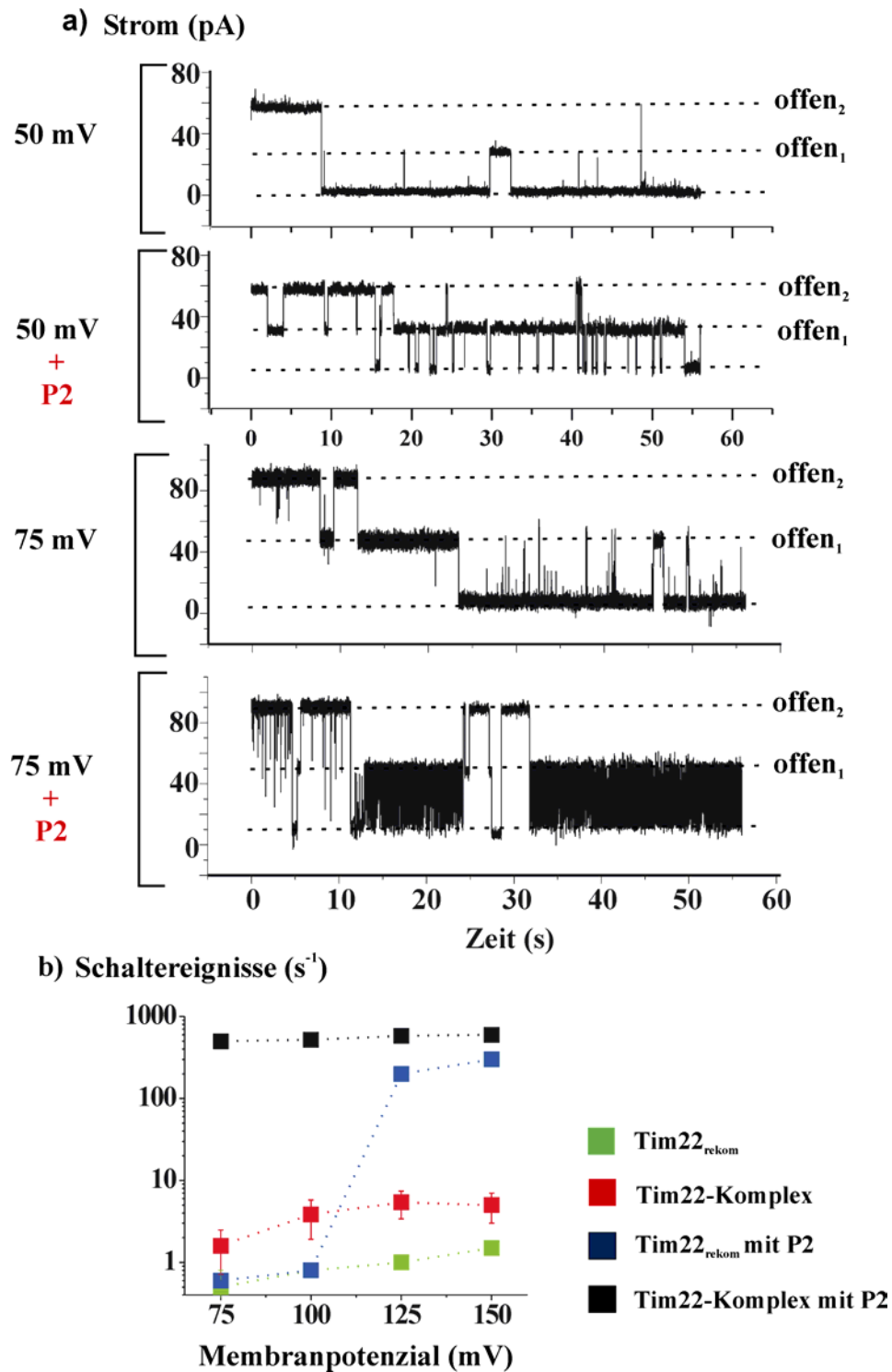


Abbildung 3.42: Einfluss von P2 auf den TIM22-Komplex.

a) Stromspuren vom TIM22-Komplex ohne (oben) und mit P2 (unten). **b)** Vergleich der Schaltaktivität von TIM22-Komplexen und Tim22_{rekom} vor und nach Zugabe von 100nM P2 (*trans*) bei symmetrischen Bedingungen (siehe 2.7.2) [Filter 10 kHz].

4 Diskussion

4.1 Kanalbildung durch Tim22 und Tim23

Tim23 wurde zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen über unterschiedliche genetische *Screenings* in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert. Ein *Screening* basierte auf der Akkumulation der mitochondrialen ATPase-Untereinheit $F_1\beta$ und führte zur Charakterisierung von Mas6p (synonym zu: Tim23, Emtage und Jensen, 1993). Das andere *Screening* basierte auf der Fähigkeit von Hefemitochondrien, eine mit einer mitochondrialen Präsequenz fusionierte cytosolische Orotidin-Monophosphat-Decarboxylase zu importieren. Die metabolische Funktion des importierten Proteins in der Matrix geht verloren und die Zellen sind nur durch exogen zugeführtes Uracil lebensfähig zu halten. Dadurch bietet sich die Möglichkeit zur Selektion von in ihrem Proteinimport gestörten Mutanten (Dekker *et al.*, 1993, Maarse *et al.*, 1992). Das Hefe-Genom Projekt enthüllte die Existenz eines weiteren homologen Proteines in der IMM. Tim22 war das erste weitere essenzielle Protein eines bis zu dem Zeitpunkt unbekanntes Komplexes in der IMM (Sirrenberg *et al.*, 1996). Tim22 zeigt starke Ähnlichkeit zu Tim17 und Tim23 in Bezug auf die Sequenz und die Topologie. Mittlerweile hat sich gezeigt, dass Tim22 ein Bestandteil eines 300kDa-Komplexes in der IMM darstellt, der getrennt vom Tim23.17-Komplex in der IMM existiert und etwa fünffach seltener wie der Tim23.17 Komplex vorkommt (Sirrenberg *et al.*, 1997). Die Depletion von Tim22 inhibiert den Import von Carrierproteinen in die IMM, während der Import von Matrixproteinen unbeeinflusst bleibt (Sirrenberg *et al.*, 1997). Im weiteren hat sich gezeigt, dass die Biogenese des Tim23.17-Komplexes über den Import mit Hilfe von Tim22 verläuft (Kaldi *et al.*, 1998)

Obwohl die Bestandteile der TIM-Komplexe biochemisch charakterisiert wurden (Emtage und Jensen 1993, Dekker *et al.*, 1993, 1997, Kerscher *et al.*, 1998), konnte erst in der vorliegenden Arbeit durch Experimente am planaren *Bilayern* gezeigt werden, dass die Kernproteine Tim22 und Tim23 jeweils porenbildende Bestandteile eines Translokase-Komplexes in der IMM darstellen, denn Fusionsexperimente mit den einzeln aufgereinigten heterolog exprimierten TIM-Komplex Bestandteilen führen nur bei den Bestandteilen Tim23_{rekom} und Tim22_{rekom} zu reproduzierbarer Kanalaktivität. Da Fusionsexperimente allein

schwache Indizien für eine Kanalaktivität darstellen, können Kontrollexperimente durchgeführt werden, die den Befund festigen. In dieser Arbeit werden Antikörper gegen Tim23 in elektrophysiologischer Messung eingesetzt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Darüber hinaus war es möglich die Orientierung von Tim23_{rekom} im *Bilayer* aufzuzeigen. Frühere Arbeiten haben schon gezeigt, dass die Zugabe von spezifischen Antikörpern die Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen kann. Der monoklonale Antikörper MAb414, der spezifisch den NPC (*nuclear pore complex*) bindet, inhibiert die Kanalaktivität des Komplexes (Prat *et al.*, 1995a, Bustamante *et al.*, 2000). Ebenso konnte für Porine gezeigt werden, dass die Zugabe von spezifischen Antikörpern den Transport von Substraten inhibieren kann (Banerjee-Bhatnagar *et al.*, 1996). Die Wirkung von Kontrollpeptiden im Vergleich mit den spezifischen Peptiden kann Aufschluss über die Spezifität der Interaktion geben. Für Tim22 konnte die in dieser Arbeit bestimmte Porenstruktur kürzlich durch elektronenmikroskopische Befunde bestätigt werden (Rehling *et al.*, 2003).

Hydropathie-Analysen (Kyte und Doolittle 1982) zeigen, dass sowohl Tim23, als auch Tim22 integrale Membranproteine der IMM darstellen, die die Membran jeweils mit vier transmembranen Durchgängen durchspannen (Dekker *et al.*, 1993, Rassow *et al.*, 1999). Die Sekundärstruktur der Membransegmente von Tim22 und Tim23 ist bis heute nicht geklärt. Erste Voraussagen geben Hinweise auf eine α -helikale Struktur der Tim-Kanäle. Demnach besteht Tim23 aus zwei Domänen, dem N-Terminus, der vom Kanal in den IMS exponiert wird, und dem C-Terminus, der mit vier transmembranen α -Helices die IMM durchzieht (Rassow *et al.*, 1999). Die Funktion dieser Domänen ist in der Diskussion. Zwischen den Resten 61 und 81 des N-Terminus zeigt Tim23 ein typisches Leucin-Zipper-Motiv und man nimmt an, dass dieser der Dimerisierung von zwei Tim23-Einheiten dient. Diese Dimerisierung konnte nach künstlicher Herabsetzung des Membranpotenzials abgeschwächt werden. Das *Crosslinking* von Tim23-Dimeren hängt direkt von der Stärke des Membranpotenzials ab (Bauer *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass Tim23 über seinen N-Terminus mit der OMM interagiert, also die Bildung von Kontaktstellen für die OMM und die IMM ermöglicht (Donzeau *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte die zweigeteilte Domänenstruktur von Tim23 elektrophysiologisch bestätigt werden. Während Tim23_N im Fusionsexperiment keine Kanalaktivität zeigt, so konstituiert Tim23_C eine schwach kationenselektive Pore, mit einer abgeschwächten Sensitivität gegenüber Präpeptiden (siehe

3.3.5 und Truscott *et al.*, 2001). Dieser Befund zeigt zum Einen, dass der Verlust des N-Terminus bei Tim23_c zu einer verringerten Präferenz für Kationen führt, und zum Anderen, dass der C-Terminus allein in der Lage ist eine Pore zu konstituieren. Die verringerte Sensitivität gegenüber Präsequenzpeptiden gibt Hinweise darauf, dass der N-Terminus ein wichtiger Bestandteil der Präprotein-Erkennung darstellt, wie schon früher angenommen wurde (Bauer *et al.*, 1996). Die α -helikale Struktur von Tim23 konnte bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden. Während man lange davon ausging, dass integrale Membranproteine vorwiegend α -helikal vorliegen, wurden in den letzten zehn Jahren vermehrt Strukturen von β -Faltblatt-Membranproteinen aufgeklärt. Die transmembranen Durchgänge sind dabei antiparallel zu einem β -Barrel angeordnet. Die Tertiärstruktur wird dabei über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Cowan *et al.*, 1992, Weiss und Schulz, 1992, Schirmer *et al.*, 1995). Diese Membranproteine werden als Porine zusammengefasst und bilden in der Regel stabile Homotrimere, wobei jede Pore aus einem 16- oder 18-strängigen β -Barrel besteht. Die unspezifischen Porine erlauben die freie Diffusion von Substanzen mit einem Molekulargewicht <600 Da und sind meist aus 16 β -Faltblättern aufgebaut (z.B. OmpF aus *E.coli*, Surrey *et al.*, 1996). Ihnen gegenüber stehen die spezialisierteren Porine. Diese weisen eine z.T. hohe Spezifität für ein Substrat auf und bestehen häufig aus 18 β -Faltblättern (z.B. Maltoporin LamB) (Buchanan, 1999). Die Monomere bilden jeweils eine Pore, die die Form einer Sanduhr mit einer Verengungszone in der Mitte und weiten Vestibülen am Poreneingang-/ausgang besitzen (Cowan *et al.*, 1992). Der Restriktionsbereich in der Pore wird durch einen extrazellulären Loop (L3) gebildet, der in die Pore hineinreicht und den Durchmesser der Pore verengt (Phale *et al.*, 1997).

Die Grösse der durch Tim22 und Tim23 konstituierten Kanäle liegt im Bereich der Durchmesser der bakteriellen Porine (ohne Verengungszone, siehe 3.1.2.11 und 3.4.2.9) und die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit zeigt einen für bakterielle Porine typischen glockenförmigen Verlauf. Ausserdem dient der N-Terminus, wie die extramembranösen *loops* der spezialisierten Porine, der Erhöhung der Substratspezifität. Diese Punkte sprechen dafür, dass die Tim-Kanäle möglicherweise β -barrel Struktur aufweisen. Ein Sequenzvergleich der Tim-Proteine miteinander zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit von Tim17, Tim22, Tim23 mit OEP16 (siehe auch 1.3). Alle diese Proteine zeigen auf Sequenzebene keine Ähnlichkeit zu den klassischen Porinen und werden

daher zu einer neuen Familie von Proteinen gezählt (PRAT, siehe 1.3). Abschliessend kann die Frage nach der Sekundärstruktur des Kanals an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Es wird angenommen, dass Tim23 nur in Verbindung mit Tim17 eine funktionelle Einheit bilden kann (Dekker *et al.*, 1993, Emtage und Jensen, 1993, Ryan und Jensen, 1993, Bauer *et al.*, 1996). Durch die Experimente in 3.3.6 kann gezeigt werden, dass Tim23 in der Lage ist, ohne feste Assoziation mit Tim17 einen Importkanal durch die IMM zu bilden. Die Assemblierung der Mutante *tim23-2* (G112E) mit Tim17 ist herabgesetzt und zeigt im *Bilayer* Kanalaktivitäten, die vergleichbar sind mit den elektrophysiologischen Eigenschaften von Tim23_{rekom} (siehe **Tabelle 4.1a**). Das Tim23 ohne Tim17 eine Pore bilden kann, ist eine Erklärung dafür, dass die Überexpression von Tim23 allein den Proteinimport durch die IMM stark stimuliert (Bauer *et al.*, 1996). Die TIM-Komplexe bestehen mit hoher Wahrscheinlichkeit jeweils aus mehreren Poren. Die Anzahl an Poren pro Kanaleinheit kann aus den maximalen Strömen im *Bilayer* berechnet werden (siehe 3.3.1.7, 3.3.7.7, sowie 4.2.5). Weil aber die Möglichkeit besteht, dass eine oder mehrere Poren inaktiv vorliegen und deshalb im *Bilayer* nicht detektierbar sind. Daher ist der Befund, das Tim23 eine 3er- Pore bildet, rein hypothetisch. Für diese Methodik spricht aber, dass die 2er-Porenkombination für Tim22 kürzlich elektronenmikroskopisch bestätigt werden konnte (siehe 3.2, Rehling *et al.*, 2003). Die TIM-Komplexe zeigen aufgrund ihrer Mehrporigkeit wieder Ähnlichkeiten zu den bakteriellen Porinen, werden aber aufgrund von fehlender Ähnlichkeit auf Sequenzebene nicht zu diesen gezählt (s.o.).

4.2 Elektrophysiologie

4.2.1 Selektivitätseigenschaften der untersuchten PRAT-Proteine

Die Permeabilitätsverhältnisse von Kationen und Anionen wurden aus dem Umkehrpotenzial nach der GHK-Theorie berechnet. Die GHK-Theorie wurde 1949 entwickelt, als die Existenz von Membrankanälen noch keine breite Zustimmung fand, und beschreibt die Diffusion von voneinander unabhängigen Ionen durch die Membran in einem linearen Potenzialgradienten. Simulationsrechnungen mit „*Brownian Dynamics*“, zeigen aber, dass Dipolmomente im

Kanal wesentlich für die Permeabilität von Ionen sind. Außerdem beeinflussen Ladungen im Kanalinneren den linearen Verlauf des Potentials. (Chung *et al.*, 1998).

Dennoch liefert die GHK-Theorie verlässliche Resultate bei der Vorhersage der relativen Permeabilitäten von Kalium- und Chloridionen in Porinen. Dies wurde in Experimenten mit OmpF und PhoE aus *E. coli* und OmpK36 aus *Klebsiella pneumoniae* gezeigt. Für diese Porine sind Kristallstrukturen bei einer Auflösung von 2,4 Å (Cowan *et al.*, 1992, OmpF und PhoE) und 3,2 Å für OmpK36 (Dutzler *et al.*, 1999) bekannt. Dadurch werden Simulationsrechnungen möglich, weil Geometrie und Ladungsverteilung in der Pore bekannt sind. Mit „Brownian Dynamics“- Simulationen lassen sich Bewegungen der Ionen durch den Kanal berechnen (Sines *et al.*, 1990, Li *et al.*, 1998).

Aus dem Vergleich vieler von Ionen genutzten Bahnen und deren Effizienzen ergeben sich dann die relativen Permeabilitäten der Ionen. Für OmpF, PhoE und OmpK36 stimmen die so ermittelten Permeabilitäten und resultierenden Leitwerte mit den aus Bilayerexperimenten und nach der GHK-Theorie ermittelten Werten überein.

Die Simulationsrechnungen an OmpF: (~9 Å Durchmesser, Cowan *et al.*, 1992) zeigen, dass Anionen und Kationen sich auf unterschiedlichen Wegen durch die Pore bewegen, was eine Art von *unabhängiger* Ionenbewegung zu gewährleisten scheint. Die Selektivität wird dabei durch verschiedene Weglängen und unterschiedlich starke Potenzialbarrieren hervorgerufen. Trotz des relativ großen Durchmessers der Pore in der Verengungszone bewegen sich die Ionen ohne Hydrathülle durch die Pore, da sie sich sonst nur im zentralen Bereich der Verengungszone konzentrieren würden. In diesem Fall wären die Wechselwirkungen mit den Ladungen des Kanalinneren zu gering, um eine ausgeprägte Selektivität zu erreichen (Schirmer und Phale, 1999).

a)

	Schaltereignisse (1/s) 250 KCl **					
	U_{rev} (mV)	Λ (pS)	+75 mV	+100 mV	+125 mV	+150 mV
Tim23 _{IMV}	45 ± 5	448 ± 10	46 ± 17	n.d.	n.d.	n.d.
Tim23 _{rekom}	49 ± 3	450 ± 11	0,55 ± 0,4	0,9 ± 0,3	11,4 ± 8	12,1 ± 10
<i>tim23.1</i> _{rekom}	38 ± 3	445 ± 10	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1	2,0 ± 0,9
<i>tim23.2</i> _{rekom}	42 ± 2	424 ± 53	0,13 ± 0,05	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,3
<i>tim23.2</i> _{IMV}	35 ± 5	448 ± 2	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,4	n.d.
Tim23 _c	27 ± 3	560 ± 11	136 ± 84*	181 ± 116*	377 ± 173*	140 ± 27*
Tim22 _{rekom}	48 ± 3	540 ± 11	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,4	2 ± 0,5
TIM22-Komplex	> 18	540 ± 10	1,5 ± 0,5	4,0 ± 2	5,5 ± 2	5,0 ± 2
	(n>6)	(n>5)	(n=3)			

* Tim23c schaltet nur bei negativen Spannungen, daher sind diese Frequenzen bei jeweils negativen Haltepotenzialen bestimmt worden.
** Definition: Schaltereignis, siehe Material und Methoden Frequenzbestimmung

b)

	Schwellenpotenzial (mV)			
	[je 10 μ M]	pCytOxIV	P2	SynB ₂
Tim23 _{IMV}		~ 20 ± 5	n.d.	n.d.
Tim23 _{rekom}		~ 80 ± 5	U_{rev}	U_{rev}
<i>tim23.1</i> _{rekom}	keine Interaktion	n.d.	n.d.	n.d.
<i>tim23.2</i> _{rekom}		~ 150 ± 5	n.d.	n.d.
<i>tim23.2</i> _{IMV}		~ 60 ± 5	n.d.	n.d.
Tim23 _c		~ 123 ± 5	n.d.	n.d.
Tim22 _{rekom}		~ 65 ± 5	~ 125 ± 5	U_{rev}
TIM22-Komplex		n.d.	~ 55 ± 5	n.d.

Tabelle 4.1: a) Vergleich der elektrophysiologischen Grundcharakteristika der in dieser Arbeit untersuchten Proteine. **b) Übersicht über die Schwellenpotenziale** für die Interaktion mit Peptiden.

Die Selektivitätsbestimmungen haben für alle untersuchten Proteine gezeigt, dass sie zu einer Gruppe von kationenselektiven Kanälen gehören (siehe **Tabelle 4.1.a**). Bei Tim23_{rekom} wurden diese Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert und es stellte sich heraus, dass die Selektivität zum Teil durch negative Ladungen im Inneren der Pore hervorgerufen wird, und zum Teil durch negative Ladungen an der N-terminalen IMS-Domäne von Tim23. Für Tim22_{rekom} und den TIM22-Komplex sind nur die Permeabilitäten von Kalium gegenüber Chlorid bekannt. Dabei zeigt sich, dass sich die Selektivitätseigenschaften von Tim22_{rekom} in Abhängigkeit von seiner Porengröße ändern. Ein partiell geschlossener Kanal weist eine höhere Präferenz für Kationen auf, als ein voll geöffneter Kanal. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die Selektivität von Tim22_{rekom}, sowie bei Tim23_{rekom}, mit Hilfe von geladenen Aminosäureresten im Inneren der Pore erzeugt wird, denn der partielle Verschluss der Tim22-Pore führt zu einer Änderung des elektrischen Feldes innerhalb der Pore und zur Änderung der Selektivitätseigenschaften. Der Tim22-

Holokomplex zeigt eine geringere Selektivität für positiv geladene Ionen als Tim22_{rekom} (siehe 3.6.2.3). Das kann ein Hinweis dafür sein, dass die Selektivität durch die zusätzlich gebundenen Komplexbestandteile mit beeinflusst wird, und so die verringerte Kationenselektivität des TIM22-Komplexes hervorgerufen wird (Rehling *et al.*, 2003). Frühere Untersuchungen an Ionenkanälen haben schon gezeigt, dass die Permeabilität für Ionen und für positiv geladene Ionen abhängig ist, von dem Vorhandensein von negativen Ladungen im Kanal (Laio und Torre, 1999). Die Autoren nehmen an, dass die Selektivität durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Ionenspezies und geladenen Aminosäureresten im Inneren der Pore entsteht. Für prokaryotische Kaliumkanäle konnte gezeigt werden, dass der Selektivitätsfilter im Inneren der Pore für die Kaliumpräferenz verantwortlich ist, und diese durch eine Gruppe vom Filter ins Inneren der Pore exponierten negativen Ladungen gewährleistet wird. Bei dem bakteriellen Porin OmpF aus *E. coli* wird die Selektivität zum Einen durch einen verengten Restriktionsbereich erzeugt, der entgegengesetzt geladene Aminosäurereste oppositionell in das Innere der Pore exponiert und so ein elektrostatisches Feld erzeugt, dass in jeweils bestimmten Bereichen permeabel für positiv und negativ geladene Ionenspezies ist. Beide Ionensorten folgen demnach einer eigenen speziellen Route durch den Kanal, wobei die Kationenselektivität von OmpF dadurch erreicht wird, dass die Passage für Kationen effektiver ist als der Anionentransport. Dieser Effekt ergibt eine Netto-Kationenselektivität (Karshikoff *et al.*, 1992). Es wird angenommen, dass positiv geladene Präproteine während ihres mitochondrialen Importes einer Abfolge aus negativen Bindungsstellen mit sequenziell ansteigender Affinität zum Substrat folgen (*acid chain hypothesis*, Komiya *et al.*, 1998). Sowohl die Kationenselektivität von Tim23_{rekom} als auch die Selektivität von Tim22_{rekom} sind mit dieser Hypothese vereinbar, weil beide Proteine jeweils einen vorläufigen Endpunkt der Importroute von Präproteinen darstellen (Horst *et al.*, 1996). Weiter zeigte sich, dass Tim23_{rekom} eine relativ große Pore konstituiert, die nur schwach zwischen einzelnen monovalenten Kationenspezies unterscheidet. Auch für Tom40_{rekom} aus der OMM von Hefemitochondrien, (Hill *et al.*, 1998), und für den Proteinimportierenden Toc75-Kanal aus der OMV von Erbsenchloroplasten (Hinnah *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass sie zwar eine ausgeprägte Kationenselektivität besitzen, aber wie Tim23_{rekom} kaum zwischen Kationenspezies unterscheiden. Diese Befunde sprechen dafür dass die Erkennungsmechanismen der Poren auf die spezifische Erkennung von Ladungen ausgerichtet sind, und nicht auf die Bevorzugung einzelner Ionen. Kontrollexperimente am

planaren *Bilayer* mit IMV- fusionierten Liposomen bestätigen die Existenz eines derartigen Kanals in der IMM. Die Mutante *tim23-1_{rekom}* besitzt eine verringerte Präferenz für Kationen gegenüber *Tim23_{rekom}*. Da der Austausch der Aminosäure (G186D) im C-terminalen Bereich von *Tim23_{rekom}* vorliegt, betrifft er die porenbildende Region von *Tim23_{rekom}*. Das mutierte Glyzin₁₈₆ scheint eine topologische Funktion im Kanal zu besitzen, da durch die zusätzliche Einführung einer negativ geladenen Aminosäure (G186D) zu erwarten wäre, dass sich die intrinsische Selektivität des Kanals verstärken würde, d. h. die ersetzte Aminosäure stellt **keinen** Baustein des Selektivitätsfilters dar. Sie liegt im C-Terminus, in einem Bereich der laut Topologievoraussage im nativ gefalteten Protein nahe der Matrix-Seite der Membran liegt (Dekker *et al.*, 1996, Rassow *et al.*, 1999). Die Mutante *tim23-2_{rekom}* zeigt nur eine geringfügig verringerte Präferenz für Kationen, gegenüber *Tim23_{rekom}*, d.h. die Mutation hat keinen Einfluss auf die ionenspezifische Selektivität von *Tim23_{rekom}*. Nach jeweiliger heterologer Expression des N-Terminus und C-Terminus von *Tim23* wurde der kanalbildende Teil *Tim23₍₉₂₋₂₂₂₎* elektrophysiologisch charakterisiert. *Tim23_c* bildet einen für Kationen selektiven Kanal mit einer verringerten Selektivität gegenüber *Tim23_{rekom}*, was daraufhin deutet, dass sowohl Ladungen im Inneren der Pore, als auch exponierte Ladungen an der IMS-Domäne für die Selektivität von *Tim23_{rekom}* verantwortlich sind. In dem besonderen Fall von *Tim23* wird die Selektivität höchstwahrscheinlich zum Einen durch den Kanalteil, und zum Anderen durch die Vestibül-flankierende IMS-Domäne vermittelt. *Tim22_{rekom}* besitzt keine IMS-Domäne, daher wird die Selektivität wahrscheinlich durch den Poreneingang oder das Poreninnere hervorgerufen.

Die Selektivität von Porinen wird im Allgemeinen durch Ladungen im Kanalinneren vermittelt, wie Untersuchungen an OmpF und PhoE aus *E. coli* zeigen. Dabei wurden geladene Aminosäuren in Kanalinneren durch ungeladene ersetzt, was die Selektivität der untersuchten Kanäle in vorausbestimmbarer Art und Weise änderte (Saint *et al.*, 1996, Phale *et al.*, 1997, Phale *et al.*, 2001).

4.2.2 Leitwerte der in dieser Arbeit charakterisierten Kanäle

Tim23_{rekom} zeigt einen Hauptleitwert von 450 ± 10 pS und zahlreiche Unterleitwerte die einem Vielfachen einer 75 ± 5 pS Einheit entsprechen. In nativen IMM Vesikeln konnte in dieser Arbeit ebenfalls ein vergleichbarer Leitwert von 450 ± 50 pS nachgewiesen werden. Die von Tim22_{rekom} und dem TIM22-Komplex gebildeten Doppelporen zeigen Leitwerte von jeweils 540 ± 18 pS die über 65 ± 5 pS Inkremente geschaltet werden. Die Leitwerte für die restlichen untersuchten Proteine sind in **Tabelle 4.1a** zusammengefasst

Zur Zeit gibt es 2 Hypothesen die das Auftreten von derartigen Inkrementen (hier: Unterleitwerte) erklären: Die *multi-pore*-Hypothese (1) beschreibt die Kanäle als aus mehreren ionenleitenden Poren bestehend, mit jeweils gleichen Leitwerten. Diese Poren öffnen und schliessen unabhängig voneinander, zeigen aber denselben *gating*- Mechanismus. (Hunter & Giebisch, 1987). Beispiele dafür sind der dimere Chloridkanal im elektrischen Organ von *Torpedo electroplax* (Miller & White, 1984) und der „*multibarrel*“-Kaliumkanal aus den Nierentubuli von *Amphiuma* (Hunter & Giebisch, 1987). Die *uni-pore*-Hypothese (2) erklärt Unterleitwerte dadurch, dass unterschiedliche Leitwertniveaus verschiedene Konformationszustände eines Kanals repräsentieren. Diese können sowohl aufgrund von Änderungen der Kanal-Konformation entstehen, andererseits kann aber auch eine Änderung des Verlaufs des elektrischen Feldes und damit des Energieprofils und der Affinitäten des Kanals für verschiedene Ionensorten dazu führen, daß sich der Leitwert signifikant ändert (Laver & Gage, 1997). Ausserdem können apparente Unterleitwerte entstehen, wenn der Kanal zwischen dem Offen- und Geschlossen-Zustand schnell wechselt (flickert) und die Frequenz dieses Schaltens höher ist als die Zeitauflösung der Messapparatur (hier 2,5-5 kHz, Yellen 1984). Es ist sehr unwahrscheinlich, daß es sich bei den Offenzuständen 1 bis 3 von Tim23 nur um apparente Unterleitwerte handelt, da bei Messungen mit einer Abtastrate von 10 kHz erkennbar war, daß der Kanal auch über eine längere Zeitdauer (im Bereich von Millisekunden) in die Zustände Offen₁ bis Offen₃ besetzt. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um einer 3er Pore, bei der die Offenzustände 1 bis 3 über je 6 Unterleitwerte von je 75 pSA angesteuert werden. Bei Tim22 ist mittlerweile geklärt, dass es sich um 2 Offenzustände Offen1 und Offen 2 mit je 8 Unterleitwerten mit je 65 pS handelt (Rehling *et al.*, 2003).

Die Kennlinien und das Schaltverhalten von $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ und $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ unterscheiden sich in mehreren Punkten voneinander. Im Gegensatz zu $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ zeigt $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ eine asymmetrische Kennlinie (250 mM KCl) und beide zeigen unterschiedlich große Hauptleitwerte. Der durch $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ gebildete Kanal schließt erst bei höheren Spannungen als $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$. Beide Kanäle zeigen ein zwar eine niedrige Schaltaktivität ($<1\text{s}^{-1}$), aber $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ ist etwas aktiver ($<10\text{s}^{-1}$), siehe **Tabelle 4.1a**), $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ bildet wahrscheinlich drei Poren, $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ hingegen wahrscheinlich zwei (siehe Diskussion: Kanalbildung durch Tim23 und Tim22. Die Zwillingsporenstruktur vom TIM22-Komplex konnte durch Kirstin Model elektronenmikroskopisch bestätigt werden (MPI Frankfurt, AG Prof. Werner Kühlbrandt, Rehling *et al.*, 2003, siehe 3.2). Bei einigen Punkten sind jedoch Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Kanälen erkennbar, denn beide Kanäle zeigen Leitfähigkeiten, deren Größenordnung denen einer Pore entsprechen die aufgrund ihres Durchmessers in der Lage sind Peptide zu translozieren (siehe **Tabelle 4.3, 4.4**). Im Bilayerexperiment zeigt sich, dass sowohl $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$, als auch $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$ aus mehr als einer Einzelpore bestehen. Außerdem sind beide Kanäle durch hohe Spannungen ($>125\text{ mV}$) aktivierbar, und zeigen jeder für sich eine symmetrische glockenförmige Offenwahrscheinlichkeitskurve (siehe 4.2.3).

Es wurden asymmetrische Strom-Spannungskennlinien bei Porinen beobachtet. Das anionenselektive Omp34 aus *Acidovorax delafieldii* (Brunen und Engelhardt, 1993) und Omp32 aus *Comamonas acidovorans* (Mathes und Engelhardt, 1998) zeigen im planaren Bilayer ebenfalls asymmetrische Kennlinien. Vorangegangene *Patch-Clamp* Studien an Riesenliposomen (Criado und Keller, 1987) mit angereicherten Kontaktstellen zwischen der IMM und der OMM aus Hirn-Mitochondrien (*Rattus norvegicus*) identifizierten zwei kationenselektive Kanäle mit Leitwerten von 475 und 550 pS. Für beide Kanäle wurde die Existenz von Unterleitwerten nachgewiesen (Moran *et al.*, 1990). Die Leitwerte zeigen mit den in der vorliegenden Arbeit, für $\text{Tim23}_{\text{rekom}}$, $\text{Tim22}_{\text{rekom}}$ und dem TIM22-Komplex ermittelten, Einzelkanal-Leitwerten eine grössenordnungmäßige Übereinstimmung. Erste *Patch-Clamp* Studien an Mitoplasten zeigten einen leicht kationenselektiven Kanal. Der MCC (*engl.: multiple conductance channel*) aus der IMM repräsentiert einen Präsequenzpeptid-sensitiven Kanal mit Leitwerten von 40 pS bis hin zu 1.3 nS, wobei jedoch die Zustände zwischen 300 und 600 pS (150 mM KCl, pH 7.0) häufiger auftraten. Bei Untersuchungen an

Hefe (*S. cerevisiae*) traten vorwiegend Kanalaktivitäten im Bereich von 400-600 pS auf (Kinally *et al.*, 1989, Lohret *et al.*, 1995). Tom40, die Importpore aus der äußeren Mitochondrienmembran bildet nach heterologer Expression, Reinigung und funktioneller Rekonstitution, kationenselektive Kanäle mit einem Hauptleitwert von 360 ± 3 pS und einem häufig auftretenden Unterleitwert von 150 ± 2 pS (250 mM KCl, Hill *et al.*, 1998). Weiter werden TOM-Komplexe aus Hefe mit den rekombinanten Kanälen verglichen, wobei gezeigt werden konnte, dass die Leitwerte der nativen Kanäle in Übereinstimmung mit den Leitwerten von Tom40_{rekom} stehen (Hill *et al.*, 1999). Dem gegenüber stehen Untersuchungen an durch Gefriertau- Rekonstitution erzeugten Tom40 Vesikeln, die einen Hauptleitwert von 0,3 nS (100 mM KCl) für den Tom40-Einzelkanal zeigten (Ahting *et al.* 2001). Das könnte ein Beispiel dafür sein wie die Rekonstitutionsmethode Einfluss auf die Kanaleigenschaften nehmen kann. Der maximale Strom im *Bilayer* repräsentiert dabei einen dreifachen Betrag des Einzelkanal-Leitwertes. Bei diesen Experimenten stammte das Tom40 aber aus Teilen des aufgereinigten Tom- Komplexes, während das heterolog exprimierte Tom40 nach einer Mega9- vermittelten Rekonstitution vermessen wurde. Weitere elektrophysiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an nativen GIP-Komplexen aus *Neurospora crassa* zeigen, dass der maximale Strom bei Tom40 betragsgleich dem Strom I_{max} durch zwei gleichartige gekoppelte Poren ist (Ahting *et al.*, 2001).

Schon früher konnten proteinleitende Poren mit vergleichbaren Leitwerten in anderen Zellorganellen nachgewiesen werden: Bei Chloroplasten ist bekannt, dass der Präprotein-Translokationskomplex an der inneren Membran aus fünf verschiedenen Komplex-Untereinheiten besteht, wobei für den membranintegralen Bestandteil Tic110 eine Kanalaktivität nachgewiesen werden konnte. Der Leitwert wurde zu 446 ± 9 pS (250 mM KCl, pH 7,0) bestimmt und hat eine vergleichbare Größenordnung wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten und heterolog exprimierten Importporen aus der IMM (Heins *et al.*, 2002). Ebenso wurde für Toc75, den Protein- Importkanal der äußeren Chloroplastenhüllmembran, gezeigt, dass er in planaren *Bilayern* Kanäle mit Hauptleitwerten von 452 pS konstituiert (Hinnah *et al.*, 2002).

Für den Nuklearen Kernkomplex (NPC) wird im *Patch- Clamp* Experiment ein Leitwert von 421 pS gefunden, während Untersuchungen an mit planaren *Bilayern* fusionierten ER-Vesikeln aus Pankreaszellen einen proteinleitenden Kanal mit einem mittleren Leitwert von

620 pS gezeigt haben (250 mM KCl, Simon und Blobel, 1992). Neuere Untersuchungen am Sec61- Kanal in planaren *Bilayern* zeigen, dass dieser Kanal einen Hauptleitwert von ~800 pS und zahlreiche Unterleitwerte besitzt (Wirth, 2003 *in press*). Für die Translokase SecYEG aus der inneren Membran von *E. coli* wurde ein Leitwert von ~600 pS gefunden (Simon und Blobel, 1992). Die strukturähnlichen β -Faltblatt-Porine aus der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien zeigen eine weite Verteilung ihrer Leitwerte. Hier wird im Folgenden auf monomere Porine fokussiert, die Einzelkanäle in Membranen bilden, da bis dato immer noch zur Diskussion steht, ob Leitfähigkeits-Zwischenzustände von Porinen als Einzelkanal-Leitwerte oder als Unterleitwerte zu interpretieren sind (Samartzidou und Delcour, 1998). Die allgemein als Porine bezeichneten β -barrel Poren OmpF, OmpE, sowie des Sucrose spezifischen Porins ScrY zeigen Leitwerte im Bereich von 1,4 nS in 1 M KCl (Benz *et al.*, 1985, Schüle *et al.*, 1991). Für das monomere PhoE aus *E. coli* wurde ein Leitwert von 500 pS (600 mM KCl) ermittelt (Berrier *et al.*, 1997).

4.2.3 Offenwahrscheinlichkeit und Spannungsaktivierung

Die spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeiten von Tim22_{rekom} und Tim23_{rekom} zeigen jeweils eine für β -Barrel Poren typische symmetrische *Gaußsche* Verteilungskurve mit einem weiten Maximum um 0 mV und ~100 mV bei Tim23_{rekom} bzw. 140 mV bei Tim22_{rekom}. Jenseits dieser Spannungen beginnen beide Kanäle allmählich zu schließen (<20s). Eine der Hauptfragen, die sich aus den Messungen an Tim22 und Tim23 ergeben ist, die Frage nach der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten über der IMM. Die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit wurde für Tim23_{rekom} bei ± 125 mV, und für Tim22_{rekom} bei ± 165 mV bestimmt. Daraus berechnet sich für Tim23_{rekom} eine Anzahl der *gating charges* von -2.9 (-3) und für Tim22_{rekom} zu -2,1 (-2). (Strong *et al.*, 1993, Jap und Walian *et al.*, 1996, Akabas *et al.*, 1998) Das lässt vermuten, dass die Aktivierung durch sehr hohe Spannungen durch eine geringe Anzahl an *gating charges* gewährleistet wird. Kürzlich wurde im *Patch-Clamp* Experiment an mit Riesenliposomen fusionierten Mitoplasten gezeigt, dass die „Tim-Kanäle“ schon bei niedrigen Spannungen (<20 mV) schalten (Kinally *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte die Aktivierbarkeit von Tim23_{IMV} bei geringen Membranspannungen reproduziert werden, was daraufhin deutet, dass innerhalb des Gesamtkomplexes noch weitere Reste für

das regulierte *voltage-gating* essenziell sind. Eine der Hauptfragen, die sich aus den Messungen an Tim22 und Tim23 ergeben, ist die nach der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten über der IMM. Weite Poren wie Tim22 (540 pS) und Tim23 (450 pS) scheinen aufgrund ihrer spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit in der Lage zu sein derartige Kriterien zu erfüllen. Das Ruhepotenzial der IMM beträgt unter Arbeitsbedingungen ~ -180 mV, wobei die Matrixseite gegenüber der IMS-Seite der IMM negativ geladen ist. Bei diesen Bedingungen liegen die Kanäle geschlossen vor. Kommt es zu einer leichten Absenkung des IMM-Potenzials, so öffnen diese Kanäle und zeigen Schaltaktivität. Bei niedrigen Spannungen (<100 mV) liegen diese Kanäle geöffnet vor und schalten nur träge. Da über der IMM *in vivo* eine Potenzialdifferenz von 180 mV besteht, sind Tim22_{rekom} und Tim23_{rekom} bei diesen Bedingungen wahrscheinlich geschlossen (Truscott *et al.*, 2001, Kovermann *et al.*, 2002). Messungen am TIM22-Komplex haben gezeigt, dass auch dieser Komplex *in vivo* wohl hauptsächlich geschlossen vorliegt, da erst eine Induktion durch ein Signalpeptid (P2) die Kanalaktivität induzieren und aufrechterhalten kann (Rehling *et al.*, 2003). Lange andauernde hohe Spannungen führen sowohl bei Tim22_{rekom}, Tim23_{rekom} zum Schließen der Kanäle. Wie bei Tim23_{rekom} scheint auch Tim22_{rekom} lediglich das Grundgerüst einer offenen Translokationspore darzustellen, die sekundär durch akzessorische Proteine im Geschlossenenzustand gehalten wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl Tim23_{rekom}, als auch Tim22_{rekom} spannungsaktivierte Poren in der IMM bilden. Mit Spannungssprungexperimenten kann gezeigt werden, dass die Anzahl offener Kanäle direkt nach dem Spannungssprung parabolisch mit der angewandten Potenzialamplitude korreliert. Dieser Zusammenhang wird möglicherweise dadurch erreicht, dass bei niedriger Spannung (0 mV) jeweils nur eine für die osmotische Fusion essenzielle Pore geöffnet vorliegt, während nach Erhöhung der Spannung die beiden anderen Poren (Tim23) oder die zweite Pore (Tim22) öffnen. Die konstante Einwirkung von Spannungen (>125 mV) führen bei beiden Kanaltypen jedoch zum Schließen. Das spannungsabhängige Schließen der rekombinanten Proteine repräsentiert das Verhalten der bloßen Kanalgerüste.

Während elektrophysiologischen Messungen unter niedrig-pH hat sich herausgestellt, dass Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV} jeweils ein pH-abhängiges vorzeitiges Schließen der Poren zeigen. Der Effekt ist seitenspezifisch und trifft nur auf der *cis*-Seite (Matrix) zu. Ein Abfall des pH in der Matrix würde so zu einem sofortigen Verschluss der Pore führen.

Insgesamt kann also für die bis heute bekannten Proteinimport Kanäle der IMM geschlossen werden, dass sie in funktionellen Mitochondrien hauptsächlich geschlossen vorliegen müssen. Das spannungsabhängige Schließen der rekombinanten Tim22,23 Proteine repräsentiert lediglich das Verhalten der rekombinant erzeugten Kanalgerüste. Die Funktionalität des Importapparates wird erst durch die Biogenese der Holokomplexe erreicht. Des weiteren spricht für den *in vivo* Verschluss der IMM, dass sowohl Tim23, als auch Tim22 stark spannungsabhängig aktivierbar sind. Bei unphysiologisch niedrigen Spannungen zeigen sich nur vereinzelte geöffnete Poren, während Spannungssprünge auf hohe Spannungen (>125 mV) zu einem vermehrten Öffnen der Tim23- und Tim22- Poren führen. Die Spannungsabhängigkeit von Membranproteinen kann mit verschiedenen Modellen erklärt werden. Früher wurde vermutet, dass bei Porinen die Oszillationen des *loop 3* (L3) im Kanalinneren das *voltage-gating* vermitteln. Bei den klassischen Porinen durchzieht der extrazelluläre L3 die Pore und bildet dort die Potenzialbarriere. Daher ist L3 für die Ionenselektivität bzw. Substratspezifität verantwortlich (Klebba und Newton, 1998, Watanabe *et al.*, 1997, Phale *et al.*, 1997). In Experimenten, bei denen L3 von OmpF an der Kanalwand fixiert wurde, konnte jedoch gezeigt werden, dass das *voltage-gating* unbeeinflusst blieb (Eppens *et al.*, 1997, Phale *et al.*, 1997). Weiter wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich beim *voltage-gating* um eine intrinsische Eigenschaft von β -Barrel Poren handelt, die nicht mit Konformationsänderungen der Pore einhergehen muss (Bainbridge *et al.*, 1998) Bei den bakteriellen Porinen PhoE und OmpF konnte durch Untersuchungen mit Mutanten, bei denen sowohl positive als auch negative Aminosäuren substituiert wurden, gezeigt werden, dass die Ersetzungen die Sensitivität gegenüber Spannungen beeinflussen (Van Gelder *et al.*, 1997, Phale *et al.*, 2001). Die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit bei Porinen prokaryotischen Ursprungs hängt von der Präparation ab. In Bilayern mit nativer Membranumgebung schließen sie schon bei niedrigen Spannungen, während in *Patch-Clamp* Messungen an nativen Membranen eine asymmetrische Form der Offenwahrscheinlichkeitskurve beobachtet wird (Delcour 1997, Samartzidou und Delcour, 1998). Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine besitzen die elektrophysiologischen Charakteristika von bakteriellen Porinen, zeigen jedoch auf Sequenzebene keine Ähnlichkeit zu diesen (siehe 1.3 und 4.1).

4.2.4 Porendurchmesser von Tim23_{rekom} und Tim22_{rekom}

Der Porendurchmesser wurde bei allen untersuchten Proteinen aus dem Leitwert ermittelt (Hille, 1992). Zur Überprüfung und Beurteilung der Daten wurden PEG-Messungen an Tim22_{rekom} und Tim23_{rekom} durchgeführt. In **Tabelle 4.3** und **4.4** sind die ermittelten Ergebnisse vergleichend zusammengefasst.

4.2.4.1 Berechnung der Porengröße aus dem Leitwert

Um den Porendurchmesser eines Ionenkanals näherungsweise zu bestimmen kann der konzentrationsabhängige Leitwert herangezogen werden. Dabei wird der Widerstand der Pore mit der Summe aus dem Widerstand eines Hohlzylinders mit dem Durchmesser d und dem Zugangswiderstand in einer Elektrolytlösung mit bekannter Leitfähigkeit gleichgesetzt. (siehe **2.4.14**). Dies sind jedoch vereinfachende Grundannahmen, da der Porenradius und die Leitfähigkeit durch den Kanal zusätzlich durch das elektrische Feld im Inneren der Pore mit beeinflusst wird (Bezrukov und Kasianowicz, 1997). Ein weiteres Problem ist, dass die Struktur der Kanäle noch nicht bekannt ist und daher die Länge der Verengungszone. Der spezifische Lösungswiderstand im Inneren der Pore kann nur angenähert werden. Es konnte ein Korrekturfaktor aus den Leitwerten von Porinen mit bekannter Kristallstruktur ermittelt werden. Dabei ergibt sich häufig ein Wert von 5, z.B. für OmpF aus *E. coli*. Auch zeigen molekulardynamische Simulationen einen Korrekturwert von 5 für 8-strängige β -Barrel Poren. (Chen und Eisenberg 1993, Eisenberg 1996, Nonner *et al.*, 1999, Sansom und Kerr 1995). Die Porengrößen wurden für die untersuchten Proteine bestimmt, und in **Tabelle 4.3** vergleichend zusammengefasst. Schwartz und Matouschek (1999) konnten zeigen, dass der Import von mit Goldpartikeln (20 Å Durchmesser) beladenen Peptiden über die IMM inhibiert wird, während die äußere Membran für diese Partikel permeabel ist. Da die Poren im Offenzustand sehr weite Durchmesser haben, ist die geforderte Verminderung der Leitfähigkeit um den Faktor 5 eventuell nicht von Bedeutung. Daher wurde die Berechnung der Porengrößen zusätzlich ohne Korrekturfaktor vorgenommen. Da die Topologie von Tim23 und Tim22 bis heute unbekannt ist, wurden die Berechnungen mit Längen von 0,5-3,0 nm durchgeführt.

Länge l (nm)*	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Porendurchmesser (nm)	\emptyset nach Smart (1997)**						\emptyset nach Hille (1992)***					
	Tim23 _{IMV}	1,6	1,8	2,1	2,3	2,5	2,7	0,5	0,7	0,8	0,9	1
Tim23 _{rekom}	1,6	1,8	2,1	2,3	2,5	2,7	0,5	0,7	0,8	0,9	1	1
tim23.1 _{rekom}	1,6	1,9	2,1	2,3	2,5	2,7	0,5	0,7	0,8	0,9	1	1
Tim23.2 _{rekom}	1,4	1,8	2,0	2,2	2,4	2,6	0,5	0,6	0,8	0,8	0,9	1
tim23.2 _{IMV}	1,6	1,8	2,1	2,3	2,5	2,7	0,5	0,7	0,8	0,9	1	1
Tim23 _C	1,9	2,2	2,5	2,7	2,9	3,1	0,6	0,8	0,9	1	1,1	1,2
Tim22 _{rekom}	1,8	2,1	2,4	2,6	2,8	3,0	0,6	0,7	0,9	1	1,1	1,2
TIM22-Komplex	1,8	2,1	2,4	2,6	2,8	3,0	0,6	0,7	0,9	1	1,1	1,2

* Länge des Restriktionsbereiches
** unter Zuhilfenahme eines Korrekturfaktors für die spezifische Leitfähigkeit der Elektrolytlösung
*** ohne Verwendung des Korrekturfaktors nach Smart (1997)

Daten die in guter Übereinstimmung mit den PEG - Daten stehen, sind rot markiert

Tabelle 4.3 Übersicht über die zur Bestimmung der Porengröße untersuchten Fälle. Die Porengrößen wurden für Restriktionsdurchmesser von 0,5 bis 3 nm rechnerisch ermittelt (siehe 2.4.12).

Wie man in **Tabelle 4.3** erkennen kann, streuen die Werte je nach vorausgesetzter Grundannahme. Dennoch zeigen sich Übereinstimmungen mit den über PEG-Messungen ermittelten Werten. Im Falle einer kurzen Restriktionsstrecke zeigen sich unter Zuhilfenahme des Korrekturfaktors für die spezifische Leitfähigkeit der Lösung bei beiden Kanälen Übereinstimmungen mit den PEG-Daten (siehe 4.2.5.2). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Grundannahme eines kurzen Restriktionsbereiches in Verbindung mit einem 5fach erhöhten Innenwiderstand in der Pore, die in der Pore herrschenden Verhältnisse am Besten beschreibt. Die ermittelten Porengrößen sind mit den Beobachtungen von Schwartz *et al.* vereinbar. Weitere Befunde stützen diese Daten, denn schon früher wurden Porendurchmesser von Präprotein-Translokasen aus dem Hauptleitwert ermittelt. Eine Abschätzung des Durchmessers, der von Tom40 konstituierten Pore (360 pS in 250 mM KCl), ergab einen Porendurchmesser von 12 Å (Smart *et al.*, 1997) bzw. 6 Å (Hille 1992, 1 jeweils 0,5 nm) und kann mit elektronenmikroskopischen Befunden, denen nach der Tom-Komplex Poren mit einem Durchmesser von 20 Å bildet (Kunkele *et al.*, 1998a) nicht verglichen werden. Da die Leitfähigkeit ein ungenauer Parameter zur Bestimmung des Porendurchmessers ist, muss die Näherung mit PEG-Messungen überprüft werden. Im Falle von Tom40 ergab sich ein Wert von ~ 22 Å.

4.2.4.2 Bestimmung der Porengröße mit Hilfe der PEG-Methode

Die Bestimmung der Porengröße aus dem Leitwert ergibt nur eine sehr ungenaue Abschätzung (siehe 4.2.4.1) des Kanaldurchmessers. Um eine Kontrolle für die Genauigkeit der Bestimmung der Porengrößen aus dem Hauptleitwert zu erhalten wurden sowohl Tim22_{rekom}, als auch Tim23_{rekom} mit Hilfe der PEG-Methode im planaren *Bilayer* vermessen und sowohl der minimale, als auch der maximale Porendurchmesser aus der Leitwertänderung in Abhängigkeit von den hydrodynamischen Radien der PEG bestimmt (siehe 2.4.15). Die ermittelten Porengrößen sind in **Tabelle 4.4** zusammengefasst. Die Restriktionsbereiche der beiden Präprotein-Translokasen weisen unterschiedliche breite Durchmesser auf. Während der Verengungsbereich von Tim23_{rekom} einen maximalen Durchmesser von nur 13 Å aufweist, kann für den Tim22-Kanal ein erweiterter Innendurchmesser von 18 Å ermittelt werden. Für das Tim22-Protein konnte im weiteren festgestellt werden, dass es eine dynamische Pore durch die innere Membran konstituiert. Berechnungen zufolge, denen nicht der Hauptleitwert, sondern das kleinste Inkrement zugrunde liegt, ist der Porenradius variabel. Die Befunde zeigen, dass die Proteine Poren bilden, die in der Lage sind zwei dicht aneinandergepackte Polypeptide in einer *loop* Konformation aufnehmen zu können. Dieser Befund konnte bestätigt werden, denn für den Tom40-Kanal konnte mit Hilfe der PEG-Methode ein größerer Porenradius von $22 \pm 1,4$ Å für die Permeation über die OMM ermittelt werden (Hill *et al.*, 1998). Schon früher wurden Porendurchmesser von Translokasen aus verschiedenen Organismen und Organellen bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass Poren oft mehr als einen charakteristischen Durchmesser besitzen. Für Porine konnte gezeigt werden, dass sie einen oder mehrere Kanäle konstituieren, die zwei Vestibülen mit erweitertem Radius miteinander verbinden (Cowan *et al.*, 1992). Das entspricht der Situation bei den Tim-Translokasen, denn sowohl bei Tim22_{rekom}, als auch bei Tim23_{rekom} kann ein Restriktions-, und auch ein erweiterter Vestibülradius bestimmt werden.

Die Porengrößen des TIM22-Komplexes sind durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kirstin Model (MPI, Frankfurt, AG Prof. Werner Kühlbrandt) zu 16 Å bestimmt. Die Daten stehen in guter Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Daten aus der vorliegenden Arbeit.

4.2.5 Einfluss von Präsequenzpeptiden auf die untersuchten Kanäle

Frühere *Patch-Clamp*-Untersuchungen an isolierten Mitoplasten haben gezeigt, dass der MCC aus der IMM durch Präsequenzpeptide blockierbar ist. (Lohret *et al.*, 1995) Experimente mit der *tip-dip*-Technik (Wilmsen *et al.*, 1983) bestätigten die Wirksamkeit von Präsequenzpeptiden auf Translokationskanäle beim PSC aus der Außenmembran von Mitochondrien (Henry *et al.*, 1989, Chich *et al.*, 1990, näheres dazu, siehe unten). Daher wurden auch in dieser Arbeit Präsequenzpeptide und ihre Analoga zur Charakterisierung der rekombinanten und nativen Tim-Kanäle verwendet. Es wurde der Einfluss verschiedener Präsequenzpeptide auf Tim22_{rekom}, Tim23_{rekom}, *tim23-1*, *tim23-2*, Tim23_C, Tim23_{IMV} und den TIM22-Komplex untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass es Unterschiede in der Spezifität der einzelnen untersuchten Kanaltypen gegen über den getesteten Signaltypen gibt.

Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der erzielten Ergebnisse mit den Präsequenzpeptiden. Mikromolare Konzentrationen von pCytOxIV bewirken bei Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV} eine starke Verminderung des Umkehrpotenzials und eine von der Spannung abhängige Zunahme der Schaltaktivität, die einhergeht mit einem Rückgang des durchschnittlichen Stromes. Die Blockierung kann zwei mögliche Ursachen haben. (Hille, 1992): Zum einen kann das blockierende Ion in den Kanal eindringen und an geladene Reste im Innern der Pore binden, und dort wie ein Verschluss wirken. (Armstrong und Binstock, 1965). Andererseits kann das blockierende Ion an einer Stelle des Kanals ausserhalb der Pore binden und eine Konformationsänderung des Kanals hervorrufen. Als Kriterium zur Unterscheidung dieser beiden Mechanismen dient die Spannungsabhängigkeit des Blocks. Ist die Blockierung des Kanals abhängig von der Spannung, muss die Bindestelle innerhalb der Pore liegen, da das blockierende Ion nur dort dem elektrischen Feld der angelegten Spannung ausgesetzt ist (Hille, 1992). Damit sind die Raten für ein Eintreten der blockierenden Substanz in die Pore und für ein Verlassen der Pore abhängig von der angelegten Spannung. Woodhull (1973) postulierte dieses Modell für einen Na⁺-Kanal, der durch Protonen inhibiert wird. Generell können 3 Möglichkeiten der Blockierung innerhalb der Pore unterschieden werden (Hille 1992): Beim *langsamen* Block (1) ist die Verweildauer der blockierenden Substanz in der Pore relativ lang (oft im Bereich von Sekunden). Der Kanal befindet sich über lange Zeiträume im geschlossenen Zustand, was zu einer Verminderung des mittleren Stroms führt.

Der *mittelschnelle* Block (2), bei dem die Verweildauer der blockierenden Substanz in der Pore im Bereich von einigen Millisekunden liegt. Beim *schnellen* Block (3) ist die zeitliche Auflösung der Messapparatur geringer als die Verweildauer der blockierenden Substanz in der Pore. Dies führt dazu, dass das Schalten zeitlich nicht mehr aufgelöst werden kann, was sich in einem herabgesetzten Einzelkanalleitwert und einer Erhöhung des Rausch/Signal-Verhältnisses widerspiegelt. Tim23 zeigt nach Zugabe von pCytOxIV einen langsamen Block, der durch einen andauernd verringerten Strom und einen Rückgang der Leitfähigkeit des Kanals gekennzeichnet ist. Nach Woodhull (1973) muss daher die Bindungsstelle nahe der Pore liegen, denn nur in diesem Bereich ist das Peptid der Membranspannung ausgesetzt. Daraus kann man schließen, dass die Proteine wenigstens teilweise in die Pore getrieben werden können. Die Veränderung des Umkehrpotenzials U_{rev} war unmittelbar nach Zugabe des Peptides zu beobachten und spricht für den Transport der Peptide. Tim22 zeigt nach Zugabe von P2 keine Blockierung, sondern eine erhöhte spannungsabhängige Schaltaktivität der im Bilayer befindlichen Kanäle. P2 ist ungeladen und kann nicht über elektrophoretische Kräfte zur Pore hin getrieben werden. *In vivo* dienen dafür höchstwahrscheinlich die positiv geladenen Sequenzabschnitte der zu inserierenden Carrier. Die P2-Signalsequenz ist ein neuer Typ von Erkennungssequenzen mit anderen Strukturmerkmalen wie die N-terminalen Präsequenzpeptide. Daraus ergibt sich die Frage, warum dieses Peptid in spannungsabhängiger Weise mit Tim22_{rekom} und dem TIM22-Komplex interagiert. Sequenzvergleiche mit Erkennungssequenzen von bekannten mitochondrialen Proteinen aus der IMM zeigen, dass sich innerhalb der Erkennungssequenz ein hoch-konserviertes Glyzin₂₂₁ befindet. Glyzin ist ebenfalls ungeladen und kann daher nicht als Bindungsstelle dienen. Da das Vorkommen der Aminosäure Glyzin in Primärstrukturen auf das Vorhandensein von speziellen Faltungsmustern hinweist, könnte der Grund für die Interaktion zwischen Tim22 und P2 in der Faltung der Erkennungsdomäne begründet liegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl für Tim22_{rekom}, als auch für den TIM22-Komplex gezeigt werden, dass der ungeladene Sequenzabschnitt P2 (TSTLLNLLSGLT₂₁₁₋₂₂₃) den durch Tim22 konstituierten Kanal in einer membranpotenzialabhängigen Weise aktivieren. Dieser Sequenzabschnitt befindet sich im 3. Modul des mitochondrialen Phosphat-Carrier-Proteins. Frühere Arbeiten haben schon gezeigt, dass ein Abschnitt des AAC-Proteins im Modul 3 ein vom Membranpotenzial abhängiges Insertionssignal darstellt. Dieses Protein ist ein typisches Mitglied der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) und durchspannt die Membran mit 6 (= 3·2)

transmembranösen Durchgängen. Die Module zeigen eine starke Sequenzähnlichkeit zueinander und bestehen aus je 100 Aminosäureresten. Sie unterscheiden sich aber in Bezug auf ihre Signalsequenzen. Modul 1 und Modul 2 enthalten je ein Importsignal für die Translokation über die mitochondriale Außenmembran, während Modul 3 eine Signalsequenz enthält, die die Tim22-abhängige Insertion in die IMM initiiert (Endres *et al.*, 1999). Ein Vergleich der Sequenzabschnitte im Modul 3 von AAC und PiC zeigt eine Sequenzähnlichkeit zwischen den genannten Proteinen. Bei allen untersuchten AAC-Isoformen findet sich ein konservierter Bereich, der Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Segment des Phosphat-Carriers zeigt. Es finden sich zwei Reste, die sowohl bei allen untersuchten AAC Isoformen, als auch beim mitochondrialen Phosphatcarrier zu finden sind. Das Leucin₂₁₉ und das Glyzin₂₂₁ ist bei allen Proteinen innerhalb der putativen Signalsequenz vorhanden, und diese Reste werden von einander homologen Aminosäuren flankiert (S/T₂₁₃, L/V₂₁₅, F/L₂₁₉). Allen Resten innerhalb der Signalsequenz gemeinsam ist, dass sie ungeladen und hydrophob sind. Das konservierte Glyzin₂₂₁ könnte als starker Helixbrecher eine topologische Funktion innerhalb der Sequenz besitzen. Der Vergleich von verschiedenen MCF-Proteinen der Hefe miteinander zeigt eine geringere Sequenzähnlichkeit, zwischen den Segmenten. Im Fall des Leucin₂₂₉ zeigen sowohl die 2-Oxodicarboxylat Carrier I und II, als auch der Ornithin Carrier und PET8 eine homogene Ersetzung (L/I₂₂₉), während das Glyzin einzig und allein bei allen untersuchten Molekülspezies vorkommt. Dieser Vergleich zeigt des Weiteren, dass alle untersuchten Sequenzabschnitte aus ungeladenen Aminosäureresten bestehen, wie das auch schon für den Vergleich von PiC mit den AAC-Isoformen gezeigt wurde. Als negative Kontrolle wurden Alignments des PiC mit typischen mitochondrialen Matrixproteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich keine signifikante Sequenzähnlichkeit der untersuchten Segmente mit der putativen Signalsequenz des PiC.

Der Vergleich der Schwellenpotenziale sowie der Blockierungen von Tim23_{rekom} und Tim22_{rekom} zeigt, dass die jeweiligen unspezifischen Kontrollproteine sich von den natürlichen Substraten deutlich unterscheiden.

Die Schwellenpotenziale der Interaktion von Tim22_{rekom} und P1-P4 liegen im Bereich ab 120 mV, also im physiologischen Spannungsbereich, während pCytOxIV und SynB₂ schon beim Überschreiten des Umkehrpotenzials den Kanal verschließen. Die Blockierung durch SynB₂ und pCytOxIV ist stärker als die Blockierung durch die P-Peptide (siehe 3.3.7.6 und 3.3.7.9). Die Schwellenpotenziale der Interaktion von Tim23_{rekom} und pCytOxIV liegen im Bereich ab

90 mV, also im physiologischen Spannungsbereich, während SynB₂ den Kanal schon beim Überschreiten des Umkehrpotenzials verschließt. Die Blockierung durch SynB₂ und pCytOxIV zeigt bei beiden Peptiden einen vergleichbaren Rückgang des Stromes von Tim23_{rekom}, wobei pCytOxIV zu einer spannungsabhängigen Erhöhung der Schaltaktivität führt (siehe 3.3.7.6 und 3.3.7.9). Dieser Befund deutet auf einen spannungsabhängigen Aktivierungsmechanismus hin.

Vergleicht man die Graphen 3.18, 3.34 und 3.35, so fällt auf, dass die natürlichen Substrate bei anderen Schwellenpotenzialen und unterschiedlichen Blockierungsstärken clustern als ihre Kontrollproteine. Während die natürlichen Substrate mit Tim23 und Tim22 jeweils bei physiologisch sinnvollen Spannungen interagieren, so verschliessen die Kontrollproteine die Kanäle lediglich elektrophoretisch, also direkt nach Überschreitung des Umkehrpotenzials (asymmetrische Messung, siehe 2.7.2) oder zeigen keinen Effekt. Dies ist ein guter Hinweis auf die Spezifität der untersuchten Signaltypen.

	pCytOxIV ₍₁₋₂₃₎	P2	SynB ₂
Tim23 _{IMV}	Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)		
Tim23 _{rekom}	Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)	Blockierung ($\Delta\Phi$ -abh.)	Blockierung ($\Delta\Phi$ -abh.)
tim23.1 _{rekom}	keine Wirkung		
tim23.2 _{rekom}	schwache Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)		
tim23.2 _{IMV}	schwache Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)		
Tim23 _c	Blockierung ($\Delta\Phi$ -abh.)		
Tim22 _{rekom}	Blockierung ($\Delta\Phi$ -abh.)	Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)	Blockierung ($\Delta\Phi$ -abh.)
TIM22-Komplex	n.d.	Aktivierung ($\Delta\Phi$ -abh.)	

alle Experimente unter asymmetrischen Hochsalzbedingungen (siehe Mat. und Meth.)

Tabelle 4.4: Übersicht der mit Präsenzpeptiden erzielten Ergebnisse

Zur Kontrolle der Spezifität des Einflusses von pCytOxIV auf Tim23 können Mutanten vermessen werden, die in ihrer Präzeptidsensitivität gestört sind (Lohret *et al.*, 1997). Daher wurden in dieser Arbeit die Mutanten *tim23-1* und *tim23-2* elektrophysiologisch charakterisiert und ihre Präzeptidsensitivität mit dem Wildtyp verglichen.

Die Zugabe von pCytOxIV hat keinen Einfluss auf den durch *tim23-1_{rekom}* konstituierten Kanal. Es kommt weder zu einer Abnahme der Leitfähigkeit, noch verändert das Präsequenzpeptid die Selektivität und die Schaltaktivität von *tim23-1_{rekom}*. Der G186D-Austausch scheint eine Mutation mit weitreichenden Auswirkungen zu sein, da der Austausch des Glyzins durch eine andere Aminosäure sowohl Einfluss auf die intrinsische Selektivität des Kanals, als auch auf seine Fähigkeit Präprotein zu binden, ausübt. Dieser Austausch wurde nicht im N-terminalen Präprotein- bindenden Teil induziert. Die ermittelten Daten könnten ein Hinweis darauf sein, dass der Austausch von Glyzin₁₈₆ die Feinstruktur des Kanals erheblich verändert. Obwohl die Grundcharakteristika von *tim23-2_{rekom}* mit denen von *Tim23_{rekom}* übereinstimmen, gibt es einen Unterschied. Während *Tim23_{rekom}* nach Zugabe von mikromolaren Konzentrationen an pCytOxIV (*trans*) sowohl eine Verschiebung des Umkehrpotenzials U_{rev} , als auch eine spannungsabhängigen Aktivierung zeigt, so führt die Zugabe von pCytOxIV bei *tim23-2_{IMV}* und *tim23-2_{rekom}* nur zu einer Verschiebung des Umkehrpotenzials U_{rev} . Das ist ein guter Hinweis darauf, dass es sich sowohl bei *tim23-2_{rekom}*, als auch bei *tim23-2_{IMV}* um einen und denselben Kanal handelt. Der Vergleich der spannungsabhängigen Erhöhung der Schaltaktivität von *Tim23_{rekom}* und den beiden Mutanten *tim23-1_{rekom}* und *tim23-2_{rekom}* zeigt, dass beide Mutanten im Gegensatz zu *Tim23_{rekom}* nicht durch pCytOxIV aktiviert werden. Der Vergleich der Mutanten untereinander belegt auch, dass nur *tim23-2_{rekom}* einen leichte Zunahme der Schaltaktivität gegenüber *tim23-1_{rekom}* aufweist. Das Schaltverhalten bleibt aber auch bei Anwendung hoher Spannungen im Bereich von nur 7 ± 5 Schaltereignissen $\cdot s^{-1}$. In den Untersuchungen zur Präsequenzpeptidsensitivität von *Tim23_c* kann gezeigt werden, dass das positiv geladene pCytOxIV spannungsabhängig vor die Pore getrieben wird, ohne Einfluss auf den Kanal zu nehmen. Es kommt zwar zu einer leicht erhöhten Schaltaktivität, aber nur zu einer geringen Stromreduktion ($\sim 12\%$) und zu keiner Veränderung des Umkehrpotenzials U_{rev} . Die Induktion von Schließereignissen ist nur durch die Zugabe von unphysiologisch hohen Präsequenzpeptidkonzentrationen möglich. Die Krümmung der Strom-Spannungskennlinie bei *Tim23_c* ist weniger stark ausgeprägt als bei Zugabe von pCytOxIV zu *Tim23_{WT}*. Es kommt zu keiner Abnahme des Leitwertes, was ein Hinweis dafür ist, dass pCytOxIV lediglich von der Spannung vor die Pore gedrückt, und nicht transloziert wird, d. h. die Ionen des Mediums können die Pore nur noch mit verringerter Flussdichte passieren. Die IMS-Domäne von *Tim23* dient also wahrscheinlich nicht nur der Bindung von Präsequenzpeptiden, sondern auch ihrer Orientierung vor der Pore. Dies könnte

dazu dienen, die jeweils richtige Pore mit dem passenden Präsequenzpeptid zu bestücken, da Tim23 sowohl für den Import von mitochondrialen Matrixproteinen, als auch für die Insertion von einzelnen Proteinen der IMM essenziell ist. Das könnte bedeuten, dass bestimmte Poren für den Import von speziellen Proteinen zuständig sind. Messungen mit P2 und SynB₂ hingegen zeigen, dass Signaltypen, die *in vivo* nicht mit dem Kanal interagieren und daher nur zu einem elektrophoretischen Verschluss der Pore führen. Die Gegenprobe bei Tim22 bestätigte diesen Befund. Während pCytOxIV und SynB₂ das Tim22_{rekom} nur elektrogen verschließen, so induziert die Zugabe von P2 ein von hohen Schwellenpotenzialen abhängiges schnelles Schalten (500 bis 600s⁻¹). Der TIM22-Komplex ist sogar nur durch P2 induzierbar und reagiert schon bei geringen Membranspannungen auf P2 mit einem koordinierten Schalten der beiden Komplexporen. Schon 1996 konnte bewiesen werden, dass der TIM22-Komplex essenziell an der Insertion von polytopischen Membranproteinen wie dem AAC (ATP/ADP Carrier) beteiligt ist. Es kommt zu keiner Interaktion zwischen dem AAC und dem TIM23.17-Komplex (Sirrenberg *et al.*, 1996).

Alles deutet daraufhin, dass das Membranpotenzial sowohl einen Einfluss auf das Vorstufenprotein, als auch auf den Kanal selbst ausübt. Im weiteren hat sich gezeigt, dass der TIM22-Komplex in Gegenwart einer Insertionskonsensus Sequenz (P2, Brix *et al.*, 1999) sein Schaltverhalten gegenüber dem Öffnungs- und Schließverhalten ohne P2 verändert. Ohne Zugabe von P2 führen schon relativ niedrige Spannungen (<60 mV) zum Schließen beider Poren des TIM22-Komplexes, während die Kanäle in Gegenwart von P2 auch nach längerer Spannungsexposition (1 min) noch in koordinierter Weise schalten. Die Charakteristika des koordinierten gekoppelten Schaltens beider Poren, lassen darauf schließen, dass der zu inserierende Carrier (hier P2) unterschiedliche Stationen am Insertionskomplex sequenziell okkupiert. Dies konnte auch durch biochemische Experimente am Tim22-Komplex nachgewiesen werden. Die Stufe IV und Stufe V Intermediate des DCC sind aufgrund ihrer jeweiligen unterschiedlichen Orientierung zum TIM22-Komplex verschieden stark resistent gegenüber der Ionenstärke des Mediums (Rehling *et al.*, 2003).

Ein weiteres Beispiel für die Insertion von Transmembranproteinen mit Hilfe von porinartigen Strukturen ist die Omp35 gesteuerte Insertion von PorA und PorB in die OM von *Neisseria* (Voulhoux, R. *et al.*, 2003). Omp35 zeigt Homologien zu Toc75, dem

Proteintranslokationskanal aus der OM von Chloroplasten (Reumann *et al.*, 1999). Für das cyanobakterielle Homolog SynToc75 von Toc75 und Omp35 wurde ebenfalls gezeigt, dass es Präsequenzpeptidsensitive Poren in der Membran bildet (Bölter, B. *et al.*, 1998).

Untersuchungen zum Transport von Präcursorproteinen über den Intermembranraum haben gezeigt, dass traversierende Proteine im IMS von kleinen löslichen α -helikalen Zinkfingerproteinen gebunden werden. Diese Proteine zählen zu den Tim9/10- Proteinen (Koehler *et al.*, 1998).

Die Analyse der Assemblierung des Tim10- Komplexes hat gezeigt, dass Tim9 und Tim10 jeweils mit hoher Affinität aneinander binden ($K_m < \mu M$) und so hochmolekulare Oligomere aufbauen. Der Tim10-Komplex besteht aus voneinander unabhängigen selbstassoziierenden Monomeren aus Tim9 und Tim10-Proteinen, die ein stabiles hexameres Chaperon assemblieren, das die vorzeitige Aggregation von zu inserierenden Proteinen verhindert (Adam *et al.*, 1999, Curran, S., *et al.*, 2002, Vial *et al.*, 2002).

Dieses Hexamer bindet den zu inserierenden Präcursor und bringt seine Einzelmodule in eine *loop*-Formation. Diese transportkompetente Form des Carriers kann im Anschluss dann mit der Insertionstranslokase interagieren. Größenbestimmungen der von Tim22 konstituierten Poren haben ergeben, dass sie in der Lage sind je zwei dicht gepackte Helices in einer *loop*-Formation aufzunehmen.

Da MCF-Proteine aus Modulen mit je zwei Membrandurchgängen bestehen (Klingenberg *et al.* 1989), die über den Tim10- Chaperonkomplex zum TIM22-Komplex geleitet werden (Koehler *et al.*, 1998), muss man schließen, dass die transportkompetente Form des Carriers essenziell für die Interaktion mit der von Tim22 konstituierten Doppelpore ist und so die Insertion des Substrates initiiert werden kann.

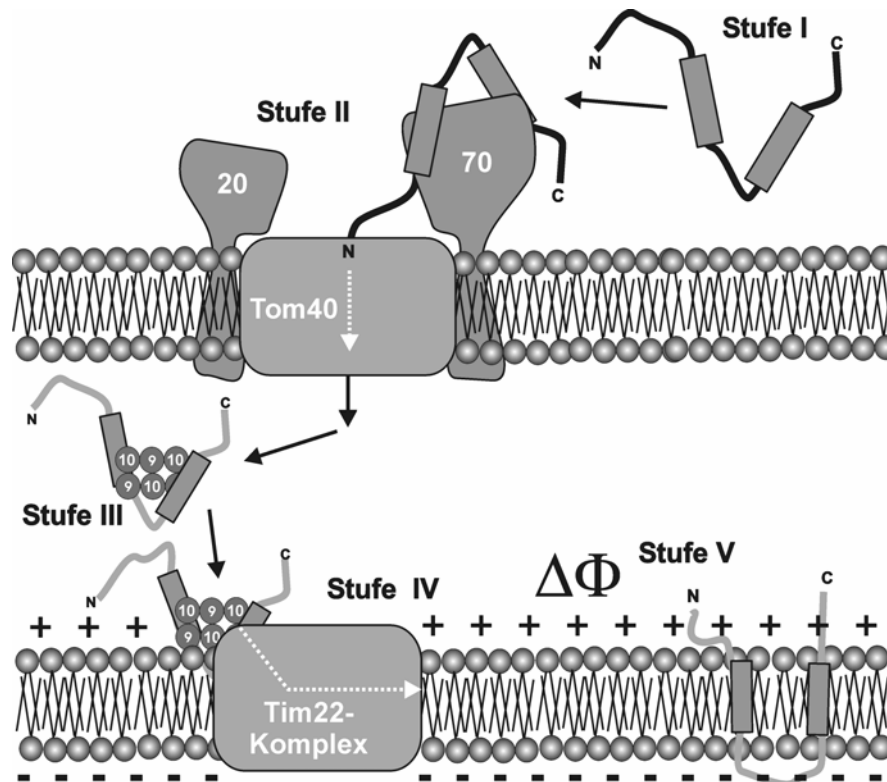


Abbildung 4.1: Modell des Imports von Carrierproteinen von MCF-Proteinen über 5 Insertionsschritte. Bei Stufe I liegt der Carrier mit cytosolischen Chaperonen assoziiert vor. Stufe 2 repräsentiert die an den Rezeptor gebundene Form des Carriers. Der Transport des Carriers über die OMM wird mit Hilfe von ATP-Hydrolyse angetrieben (Stufe III). In Gegenwart eines Membranpotenzials $\Delta\phi_{mem}$ über die IMM wird der Carrier inseriert (Stufe IV), wo er seine native aktive Form einnimmt (Stufe V). R = receptor, OM = outer membrane, IM = inner membrane, IMS = intermembrane space.

Weiter konnte gezeigt werden, dass einzelne Insertionsschritte abhängig von der Höhe des anliegenden Membranpotenzials ϕ_{mem} sind. Bei diesen Schritten durchläuft der Carrier sequenziell unterschiedliche molekulare Umgebungen (Rehling *et al.*, 2003). Während die eine Pore lediglich der Aufnahme von dicht gepackten Proteinsegmenten dient, scheint über die zweite Pore die laterale Ausschleusung des Substrates stattzufinden. Leitfähigkeitsmessungen haben gezeigt, dass die Asymmetrie der von Tim22 konstituierten Pore von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Unidirektionalität der beiden an der Insertion beteiligten Poren her rührt. Weiter zeigen Vergleiche zwischen elektronenmikroskopischen Aufnahmen des TOM-Komplexes und der Tim22-Translokase, dass eine der durch Tim22 konstituierten Zwillingsporen ein schwächeres Dichteprofil besitzt (Rehling *et al.*, 2003). Diese Pore scheint leicht zur Seite abgewinkelt zu sein und ist daher

der potenzielle Kandidat für die laterale Ausschleusung des Substrates. Das Insertionssignal wird erst später benötigt, denn das P2-Signalpeptid interagiert erst mit dem TIM22-Komplex, wenn das Modul vollständig in kompetenter Form in die Zwillingspore eingebracht wird und induziert dann ein schnelles Schalten des Kanals, welches als laterale Ausschleusung gedeutet wird. Diese Befunde sprechen dafür, dass für den Insertionsprozess von mitochondrialen Carrierproteinen die Assemblierung einer „Zwillingspore“ benötigt wird.

Nach der GHK-Spannungsgleichung (siehe 2.2) ergeben sich rechnerisch sehr hohe Transportraten ($\sim 40:1$) für Peptide gegenüber den transportierten Ionen. Hier stösst die GHK-Theorie an ihre Grenzen, denn dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung eines spannungsabhängigen Blocks der nur geringe Translokationsraten zulässt. Die Verminderung des Umkehrpotenzials U_{rev} spricht also nur für eine Bindung des Peptides an die extramembranöse N-terminale Domäne von Tim23, für die nachgewiesen werden konnte, dass sie mitverantwortlich ist für die Gesamtselektivität von Tim23_{rekom}. Das Einsetzen der Schaltaktivität, das durch die Bindung an die extramembranöse Domäne induziert wird, zeigt, dass der Kanal aktiviert wird, und spricht für die Translokation des Peptides. Die Seitenabhängigkeit der spannungsabhängigen Blockierung zeigt, dass der Kanal präferenziell über seine *trans*-Seite mit Peptiden interagiert. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Tim23 nur Zellkern codierte Proteine transloziert, die von der IMS-Seite in die mitochondriale Matrix transportiert werden sollen. Der Totalverschluss von Tim23 durch SynB₂ ist dadurch zu erklären, dass SynB₂ in wässriger Umgebung in einer *random-coil* Konformation vorliegt, die den Kanal unspezifisch verschließt. Für den Transport von Präsequenzpeptiden mit der Tim23-Pore scheint die amphipatische Struktur von pCytOxIV essenziell zu sein. Nur in dieser Konformation ist das Präsequenzpeptid in der Lage elektrophoretisch in die Pore gedrückt zu werden und den Kanal zu aktivieren. Der Block spricht dafür, dass es auch während der Translokation nur zu vernachlässigenden Leckströmen kommt und so das elektrochemische Potenzial über die IMM aufrecht erhalten werden kann. Wie bei eukaryotischen Mitochondrien, wurden auch bei Prokaryoten geladene Signalpeptide nachgewiesen, die aber die Insertion von Membranproteinen steuern. Bei Bakterien sind diese *targeting*-Sequenzen dreigeteilt. Sie bestehen aus drei Domänen (N-, H- und C-Domäne). Wie N-terminale mitochondrialen Präsequenzen, weisen die verschiedenen Transitsequenzen keine konservierten Strukturmerkmale auf, besitzen aber ähnliche

physikalische Eigenschaften. Die N-Domäne (Aminosäuren 1 bis 5) trägt eine positive Nettoladung und dient aufgrund ihrer Ladung zur Orientierung des zu inserierenden Proteins. Die positive Ladung verhindert eine Translokation des N-Terminus und hält ihn so im bakteriellen Cytosol. Weiter soll dieser Teil mit SecA und mit negativ geladenen Phospholipiden interagieren. Die H-Domäne (Aminosäuren 7-15) stellt den hydrophoben Kern des Signalpeptides dar. Diese α -helikalen Elemente bilden in wässriger Umgebung eine G- und P-reiche *hairpin*-Struktur, die das Insertionssignal repräsentiert, und die in Lipiddoppelschichten eindringen kann. In der LDS nehmen diese Peptide dann eine α -helikale Struktur an. Die C-Domäne besteht aus 3 bis 7 polaren Aminosäuren mit Spaltungsstellen für Peptidasen. Die für die Spaltung essenzielle Konformation wird durch einen orientierenden Effekt durch die H-Domäne erreicht.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die rekombinanten Proteine Tim23 und Tim22 aus *Saccharomyces cerevisiae* eine kationenselektive Pore mit sonst unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften bilden. Bei den Messungen an Innenmembranvesikeln wurde mit Hilfe von Antikörpern ein dem rekombinanten Tim23 identischer Kanaltyp identifiziert. Die Leitwerte der untersuchten Proteine konnten bestimmt werden. Die Strom-Spannungskennlinien der beiden Tim-Kanäle weisen unterschiedliche Charakteristika auf. Während die Kennlinie von Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV} linear verläuft, zeigt Tim22_{rekom} eine asymmetrische Kennlinie. Für Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV} ergibt sich jeweils ein Hauptleitwert von ~ 450 pS und auch Tim22_{rekom} und der TIM22-Komplex zeigen bei voll geöffneter Pore identische Leitwerte von ~ 540 pS (näheres hierzu siehe Tabellen in 3.13.4). So konnten erstmalig die Porengrößen der Translokator-Kanäle ermittelt werden. Für Tim22_{rekom} ergibt sich ein dynamischer Porenradius von 11,6 (17 Å) für den inneren Restriktionsbereich und 18 (23 Å) im äußeren Vestibülbereich. Tim23_{rekom} bildet Poren derselben Größenordnung mit einem Radius von 13 Å an der engsten Stelle und 24 Å im Vestibül. Die durch Tim22_{rekom} und Tim23_{rekom} gebildeten Membrankanäle öffnen bei hohen Membranspannungen und interagieren jeweils spannungs- und seitenabhängig mit Präsequenzpeptiden bzw. internen Zielerkennungsmodulen. Ein derartiges Segment (P2) konnte hierbei erstmalig identifiziert werden. Eine Abschätzung der Anzahl Poren/aktiver Komplex ergab 3 Poren für Tim23_{rekom} und 2 Poren für Tim22_{rekom}. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Charakterisierung von Tim22_{rekom} konnten sowohl über Messungen am rekonstituierten Komplex aus IMV, als auch über elektronenmikroskopische Befunde bestätigt werden. Bei Tim23_{rekom} können die Ergebnisse hingegen mit Messungen an Innenmembranvesikeln bestätigt werden. Mutanten von Tim23 zeigen Unterschiede in der Interaktion mit Präpeptiden gegenüber Tim23_{rekom}. *tim23-1* ist gegenüber Präpeptiden am insensitivsten, während *tim23-2* noch leicht aktivierbar ist. Der TIM22-Komplex wird durch das Membranpotenzial moduliert. Die Insertion von IMM-Proteinen ist stufenweise spannungsabhängig. Biochemisch und elektrophysiologisch wurde gezeigt, dass die Anbindung an den Komplex und die Einfädung in die Poren jeweils unterschiedliche Stärken des Membranpotenzials erfordern (<60 mV/ >70 mV). Messungen am rekonstituierten Komplex zeigen, dass dieser schon bei geringen Spannungen mit Peptiden interagieren kann.

Aus den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen ergibt sich zum Ablauf der Translokation über die IMM folgendes Bild. (1) Der N-Terminus von Tim23 dient als Rezeptor zur Erkennung und Bindung von Präproteinen, während (2) der C-Terminus eine wässrige Pore durch die IMM konstituiert. (3) Das Membranpotenzial und Präsequenzpeptide aktivieren in Abhängigkeit voneinander Tim23. (4) Die Pore erlaubt die Translokation von bis zu zwei Helices simultan über die IMM.

Der Insertionsprozess von Präproteinen in die IMM konnte ebenfalls in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. (1) Carrierproteine werden über den doppelporigen TIM22-Komplex in die IMM inseriert. (2) Tim22 bildet das porenbildende Kernprotein und konstituiert Doppelporen, die gross genug sind, um je zwei Helices gleichzeitig von der IMS-Seite her aufzunehmen. (3) Das Membranpotenzial und interne ungeladene Erkennungssequenzen aktivieren den Insertionskomplex voneinander abhängig. (4) Die Anbindung von Carrierproteinen an und die Einfädung in den Komplex verläuft in Schritten mit unterschiedlicher Abhängigkeit vom Membranpotenzial.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA	Acrylamid
AAC	ATP / ADP Carrier
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AD/DA	Analog-Digital / Digital-Analog
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest	doppelt destilliert
BN	<i>Blue Native</i> (Blau nativ)
c	<i>closed</i> (geschlossen)
C	<i>capacity</i> (Kapazität)
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CR – Glied	Kondensator-Widerstands Glied (Hochpassfilterschaltung)
C - terminal	Carboxyterminal
C - Terminus	Carboxyterminus
Chl	Chloroform [CHCl ₃]
CMC	<i>Critical Micellar Concentration</i> (Kritische Mizellen Konzentration)
Cox IV	Cytochrom oxidase Untereinheit IV
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleacid (Desoxyribonukleinsäure)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol [CH ₃ CH ₂ OH]
F	Farad
FET	Feldemissionstransistor
ϕ_{mem}	Membranpotenzial
g	Zentrifugalkonstante
GHK	Goldmann-Hodgkin-Katz
GIP	<i>General-Import -Pore</i>
h	<i>hour</i> (60 min)
HAc ⁻	Essigsäure [CH ₃ CH ₂ COO ⁻]

HTGP	n-Heptyl-β-thioglucopyranosid (C ₁₃ H ₂₆ O ₅ S)
I	Strom
<i>I_{Bilayer}</i>	Strom über den Bilayer
Ig	Immunoglobulin
IMM	Inner Mitochondrial Membrane (Innere Mitochondrienmembran)
IMS	Inter Membrane Space (Intermembranraum)
IMV	Innere Mitochondrien Membranvesikel
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	kilo Dalton
LDS	Lipiddoppelschicht
max	Maximum
MCC	Multiple Conductance Channel
Mega - 9	Nonaoyl-N- Methylglucamid
MetOH	Methanol [CH ₃ -OH]
Min	Minute
min	Minimum
mM	milliMol [10 ⁻³ M]
ms	Millisekunde [10 ⁻³ s]
MOPS	3-(N- Morpholino)propansulfonsäure
MPP	Mitochondrial matrix Processing Peptidase
<i>m - state</i>	matrix facing state
MtHsp70	Mitochondriales Heatshockprotein, 70 kDa
mV	Millivolt [10 ⁻³ V(∼J·C ⁻¹)]
MV	mean variance (Mittlere Varianz)
min	Minuten
nS	nanoSiemens [10 ⁻⁹ Ohm ⁻¹]
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NPC	nuclear pore complex
o	open (offen)
OCE	outer chloroplastic envelope
OMM	outer mitochondrial membrane (Äussere Mitochondrienhüllmembran)
OPA	operational amplifier
P	Permeabilität
P2	<i>Synonym für:</i> interne Transitsequenz des Phosphatcarriers aus der IMM

pA	pico Ampere
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
P _i C	Phosphat-Carrier
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P _{offen}	Offenwahrscheinlichkeit
pS	pico Siemens (=10⁻¹² Ohm⁻¹)
R	resistance (Widerstand)
RC-Glied	Widerstands-Kondensator-Glied (Tiefpassschaltung)
R _f	feedback resistor (Rückkopplungswiderstand)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SIV-S	Soybean lipid IV von Sigma
SDS	Sodiumdodecylsulphate (Natriumdodecylsulfat)
TCA	Trichloroacetate
Temp.	Temperatur
Tom5	Translocase of the outer membrane 5 kDa
Tom6	“ “ “ 6 kDa
Tom7	“ “ “ 7 kDa
Tim9	“ inner “ 9 kDa
Tim10	“ “ “ 10 kDa
Tim12	“ “ “ 12 kDa
Tim17	“ “ “ 17 kDa
Tom20	“ outer “ 20 kDa
Tom22	“ “ “ 22 kDa
Tim22	“ inner “ 22 kDa
Tim23	“ “ “ 23 kDa
Tom40	“ outer “ 40 kDa
Tim44	“ inner “ 44 kDa
Tim50	“ inner “ 50 kDa
Tim54	“ “ “ 54 kDa
Tom70	“ outer “ 70 kDa
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan

U	Spannung
U _A	Ausgangsspannung (OPA)
U _E	Eingangsspannung (OPA)
ULV	<i>unilamellar vesicles</i> (unilamellare Vesikel)
ÜN	über Nacht
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
YPG	<i>yeast peptone glycerol</i> (Wachstumsmedium)

FASTA /BLASTp - Aminosäurecode

A	alanine	P	proline
B	aspartate or asparagine	Q	glutamine
C	cystine	R	arginine
D	aspartate	S	serine
E	glutamate	T	threonine
F	phenylalanine	U	selenocysteine
G	Glyzine	V	valine
H	histidine	W	tryptophan
I	isoleucine	Y	tyrosine
K	lysine	Z	glutamate or glutamine
L	leucine	X	any
M	methionine	*	translation stop
N	asparagine	-	gap of indeterminate length

6.2 Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1: ClustalW-Alignment von Hefe Tim23 mit den Mutanten *tim23-1* und *tim23-2*

1.2: Modell des mitochondrialen Imports von Matrix- und von Carrierproteinen

1.3: ClustalW-Alignment der in dieser Arbeit charakterisierten PRAT-Proteine

2. Material und Methoden

2.1: Beispiel für eine Proteinprimärsequenz im FASTA-Format

2.2: Calcium induzierte Fusion von Proteoliposomen

2.3: mechanischer Aufbau *Bilayer* – Messkammer

2.4: Herstellung eines *Bilayers*.

2.5: Schematisches Schaltbild einer *Bilayer*messkammer..

- 2.6: *Dose-response* Funktion
- 2.7: Beispiel für eine *Mean-Variance* Darstellung
- 2.8: Sequenz von pCytOxIV₁₋₂₃
- 2.9: Sequenz von SynB₂
- 2.10: Aminosäuresequenzen von P1 bis P4
- 2.11: Zielsequenz von Ig133
- 2.12: Bindestelle von Ig133-7
- 2.13: Bindestelle von Ig239-4

3. Ergebnisse

- 3.1: SDS-PAGE Analyse der Expression und Aufreinigung von Tim23_{rekom}
- 3.2: Trennung von OMV und IMV bei *S. cerevisiae*
- 3.3: Schaltverhalten von Tim23_{IMV}
- 3.4: Selektivität von Tim23_{IMV}
- 3.5: Strom-Spannungskennlinie des Hauptleitwertes von Tim23_{rekom}
- 3.6: Schaltverhalten von Tim23_{rekom}
- 3.7: Spannungsaktivierung von Tim23_{rekom}
- 3.8: Bestimmung der Anzahl Poren·Tim23_{rekom}·Einheit⁻¹
- 3.9: Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von Tim23_{rekom} vom pH
- 3.10: Einfluss von pCytOxIV und SynB₂ auf Tim23_{rekom}
- 3.11: Einfluss von pCytOxIV auf Tim23_{IMV}
- 3.12: Vergleich des Einflusses von b₂-Δ-DHFR und P2 auf Tim23_{rekom}
- 3.13: Bestimmung des Porenradius von Tim23_{rekom} mit der PEG-Methode.
- 3.14: Effekt von Ig239-4 auf Tim23_{rekom} und Tim23_{IMV}.
- 3.15: Wirkung von Ig 133-7 auf Tim23_{rekom}.
- 3.16: Domänenstruktur von Tim23; Isolierung von Tim23_C und Tim23_N.
- 3.17: Stromspuren eines Bilayers mit Tim23_C
- 3.18: Effekt von mikromolaren Konzentrationen an pCytOxIV auf Tim23_C.
- 3.19: Isolation von tim23-2 und BN-PAGE-Analyse des Tim23-Komplexes.
- 3.20: Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von tim23-1_{rekom} und tim23-2_{rekom}.
- 3.20: Vergleich des Einflusses von pCytOxIV auf die Schaltaktivität von Tim23_{rekom}, tim23-1_{rekom} und tim23-2_{rekom}
- 3.21: Isolation von Tim22_{rekom}
- 3.22: Elektrophysiologische Charakteristika von Tim22_{rekom}I.
- 3.23: Elektrophysiologische Charakteristika von Tim22_{rekom}II.
- 3.24: Einfluss von SynB₂ auf Tim22_{rekom}
- 3.25: Bestimmung der Anzahl Poren·Tim22_{rekom}·Einheit⁻¹.
- 3.26: Bestimmung des Porendurchmessers von Tim22_{rekom} mit der PEG-Methode.
- 3.27: Einfluss von P1, P2, P3, P4 auf Tim22_{rekom}.
- 3.28: Einfluss von P2 auf Tim22_{rekom} I
- 3.29: Einfluss von P2 auf Tim22_{rekom} II
- 3.30: ClustalW-Alignment von PiC mit 3 Isoformen des mitochondrialen AAC
- 3.31: ClustalW-Alignment von PiC mit typischen Mitgliedern der MCF
- 3.32: ClustalW-Alignment von Tim23, Tim17, 2-ODC 1, 2-ODC 2 und PiC

- 3.33: ClustalW-Alignment von PiC mit mitochondrialen Matrixproteinen Cox1p, 3p, 4p
- 3.34: Aufreinigung des TIM22-Komplexes aus Hefe-Mitochondrien.
- 3.35: Akkumulation eines Vorstufenproteins
- 3.36: Membranpotenzialabhängigkeit der einzelnen Stufen des Importes von Carriern
- 3.37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae*
- 3.38: Strom-Spannungskennlinien des nativen TIM22-Komplexes
- 3.39: Selektivität von TIM22-Komplexen
- 3.40: Charakteristische positive Stromspuren des nativen TIM22-Komplexes
- 3.41: Einfluss von P2 auf die Offenwahrscheinlichkeit vom TIM22-Komplex
- 3.42: Einfluss von P2 auf das Schaltverhalten des TIM22-Komplexes.

4. Diskussion

- 4.1: Modell des Imports von Carrierproteinen von MCF-Proteinen

6.3 Tabellenverzeichnis

2. Material und Methoden

- 2.1: Aufstellung über die verwendeten Lösungen bei der SDS- PAGE (nach Laemmli).
- 2.2 Die Eisenmannreihen
- 2.3: Äquivalenzleitfähigkeiten monovalenter Alkaliionen
- 2.4: Aufstellung der verwendeten PEG´s

3. Ergebnisse

- 3.1 : Ergebnisse der bi- ionischen Messungen an Tim23_{rekom}

4. diskussion

- 4.1 Vergleich der elektrophysiologischen Grundcharakteristika
- 4.2: Übersicht der mit Präpeptiden erzielten Ergebnisse
- 4.3: Übersicht der aus dem Leitwert ermittelten Porengrößen
- 4.4 : Übersicht der aus den PEG-Daten ermittelten Porengrößen.

6.4 Literaturverzeichnis

Adam, A., Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W. und Brunner M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* **15**, 313- 319.

Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. und Nussberger, S. (2001) Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell. Biol.* **153**, 1151-1160.

Akabas, M. H. (1998). Channel-lining residues in the M3 membrane-spanning segment of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem.* **37**, 12233-12240.

Altschul, S. F., Madden, T. F., Schäffer, A., A., Zhang, J., Zheng, Z., Miller, W. und Lipman, D., J. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

Armstrong, G. A. und Binstock, L. (1965). Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chlorid. *J. Gen. Physiol* **48**, 859-872.

Bainbridge, G., Gokce, I., und Lakey, J. H. (1998) Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin β -barrel membrane channels. *FEBS Lett.* **431**, 305-308.

Bairoch, A. und Apweiler, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucl. Acids Res.* **28**, 45-48.

Banerjee-Bhatnagar, N., Bolt, C. R. und Williams, J. C. (1996) Pore-forming activity of *Coxiella burnetii* outer membrane protein oligomer comprised of 29,5- and 31-kDa polypeptides. Inhibition of porin activity by monoclonal antibodies 4E8 and 4D6. *Ann N Y Acad Sci* **791**, 378-401.

Bauer, M. F., Sirrenber, C., Neupert, W. und Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**, 33-47.

Bauer, M. F., Hofmann, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria : the role of TIM Komplexes. *TI Cell Biol.* **10**, 25-31.

Benz, R., Schmid, A. und Hancock, R. E. (1985) Ion selectivity of gram- negative bacterial porins. *J. of Bact.* **162**, 722-727.

Berrier, C., Besnard, M. und Ghazi, A. (1997) Electrophysiological characteristics of the PhoE porin channel from Eschericia coli – implications for the possible existence of a superfamily of ion channels. *J. Membr. Biol.* **156**, 105 – 115.

Bezrukov, S. M. und Voydanoy, L. (1993) Probing alamethicin channels with water soluble polymers. Effects on conductance of channel states. *Biophys. J.* **64**, 16-25.

Bezrukov, S. M. und Kasianowicz, J. J. (1997) The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore. *Eur. Biophys. J.* **26**, 471 – 476.

Bölter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S. und Wagner, R. (1998) Origin of a chloroplast protein importer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15831- 15836.

Böttcher, B., Wynne, S. A., Crowther, A. (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**, 88 – 91.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 84-86.

Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. und Pfanner, N. (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22 and Tom70 in a presequence carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16522 - 16530.

- Brunen, M. und Engelhardt, H. (1993). Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers. *Eur. J. Biochem.* **212**, 129-135.
- Bustamante ,J. O., Michelette, E. R. F., Geibel, J. B., David A. Dean, Hanover, J. A. und McDonnell ,T. J. (2000) Calcium, ATP and nuclear pore gating. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* **439**, 433 – 444.
- Chen und Eisenberg (1993) Charges, currents and potentials in ionic channels of one conformation. *Biophys. J.* **64**, 1405-1421.
- Chich, J. F., Goldsmith, D., Thieffry, M. und Henry, J. P. (1990) A peptide-sensitive channel of large conductance is localized on mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **196**, 29-35.
- Chung, S. H., Hoyles ,M. A., Allen, T., und Kuyucak, S. (1998). Study of ionic currents across a model membrane channel using brownian dynamics. *Biophys. J.* **75**, 793-809.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. und Rosenbusch, J. P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727-733.
- Criado, M. und Keller, B. U. (1987) A membrane fusion strategy for single channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes. *FEBS Lett.* **224**, 172-176.
- Crouzy, S. C. und Sigworth, F. J. (1993). Fluctuations in ion channel gating currents. Analysis of nonstationary shot noise. *Biophys. J.* **64**, 68-76.
- Curran, S., Leuenberger, D., Opplinger, W. und Koehler, C. M. (2002) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ATP/ADP carrier. *EMBO J.* **21**, 942-953.
- Dayhoff, M. O. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* **5**

Davis, A. J., Ryan, K. R. und Jensen, R. E. (1998) Tim23p contains separate and distinct signals for targeting to mitochondria and insertion into the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2577-2593.

Dekker, P. J. T. , Keil, P., Rassow, J., Pfanner, N. und Meijer, M. (1993) Identification of Mim23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett.* **331**, 66-70.

Dekker, P. J. T., Müller, H., Rassow, J. und Pfanner, N. (1996) Characterisation of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol. Chem.* **377**, 535-538.

Dekker, P. J. T., Martin, F., Maarse, A. C., Bömer, U., Müller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J. und Pfanner, N. (1997) The Tim core complex defines the number of of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J.* **16**, 5408-5419.

Delcour, A. H. (1997) Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 115-123.

Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M. F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* **101**, 401-412.

Dutzler, R., Rummel, G., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Phale, P., Rosenbusch, J., Benedi, V., und Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure. Fold. Des* **7**, 425-434.

Eisenberg, R.S. (1996) Computing the fields in proteins und channels. *J. Membr. Biol.* **150**, 1-25.

Emtage, J. L. T. und Jensen, R. E. (1993) mas-6 encodes an essentiell inner membrane component of the yeast mitochondrial import pathway. *J. Cell. Biol.* **122**, 1003-1012.

Endres, M., Neupert, W. und Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* **18**, 3214-3221.

Enz, C., Steinkamp, T. und Wagner, R. (1993) Ion channels in the thylakoid membrane (a patch-clamp study). *BBA* **1143**, 67-76.

Eppens, E. F., Saint, N., van Gelder, P., Van Boxtel, R. und Tommassen, J. (1997) Role of the constriction loop in the gating of outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **415**, 317-320.

Frank, J. und Van Heel, J. (1982) Correspondence analysis of aligned images of biological particles. *J. Mol. Biol.* **161**, 134 – 137.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y. H., Ladjadj, M., Leith, A. (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struc. Biol.* **116**, 190 – 199.

Geissler, A., Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J. und Pfanner, N. (2000) Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3977 – 3991.

Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N. und Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* **111**, 507-518.

Gonnet, G., Cohen, M. A. und Benner, S. A. (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* **256**, 1443 1445.

Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., Kuchler, M., Hörmann, F., Sveshnikov, D. und Soll, J. (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* **21**, 2626-2625.

Heiber, T., Steinkamp, T., Hinnah, S., Schwarz M., Flügge U. I., Weber, A. und Wagner, R. (1995) Ion channels in the chloroplast envelope membrane. *Biochemistry* **12**, 15906-15917.

Henikoff, S. und Henikoff, J. G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *PNAS* **89**, 10915-10919.

Henry, J. P., Chich, J. F., Goldsmith, D. und Thieffry, M. (1989) Ionic mitochondrial channels: characteristics and possible role in protein translocation. *Biochim.* **71**, 963-968.

Henry J., P., Juin P., Vallette F. und Thieffry M. (1996) Characterization and function of the mitochondrial outer membrane peptide-sensitive channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 101 – 8.

Higgins, D., G., Thompson, J., D. und Gibson, T., J. (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.*, **266**, 383-402 .

Hill, K., Model, K., Wagner, R. und Pfanner, N. (1998) Tom 40 forms the hydrophilic import pore for preproteins in the inner mitochondrial membrane. *Nature* **395**, 516-521.

Hinnah, S. C., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R. und Soll, J. (2002) The chloroplast import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophys. J.* **83**, 899-911.

Horst, M., Azem, A., Schatz, G. und Glick, B. S. (1996) What is the driving force for protein import into mitochondria ? *BBA* **1318**, 71-78.

Hoch D. H., Romero-Mira M., Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., Das Gupta B. R., Simpson L. L. (1985) Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82 (6), 1692-1696.

Huang, S., Ratliff, K. S., Matouschek, A. (2002) Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat. Struct. Biol.* 4, 234-236.

Hunter, M. und Giebisch, G. (1987). Multi-barrelled K⁺ channels in renal tubules. *Nature* 327, 522-524.

Jap, B. K. und Walian, P. J. (1996) Structure and functional mechanism of porins [review]. *Physiolog. Rev.* 76, 1073-1088.

Kaldi, K., Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W. und Brunner, M. (1998) Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM-Machinery for matrix-targeted preproteins. *EMBO J.* 17, 1569-1576.

Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1994) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of preproteins. *Nature* 348, 137-143.

Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S. W., Ladenstein, R. und Schirmer, T. (1994) Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 240, 372 – 384.

Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S. und Jensen, R. (1997) The Tim54p-22p complex mediates insertion of proteins into the inner mitochondrial membrane. *J. Cell. Biol.* 139, 1663-1675.

Klingenberg, M. (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys* 270, 1-14.

Krasilnikov, O. V., Sabirov, R. Z., Ternovsky, V. I., Merzliak, P. G. und Murathkhodjaev, J. N. (1992) A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Micobiol. Immunol.* **5**, 93-100.

Krasilnikov, O. V., Da Cruz, J. B., Yuldasheva, L. N., Varanda, W. A., und Nogueira, R. A. (1998). A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **161**, 83-92.

Kinnally, K. W., Campo, M. L., Tedeschi, H. (1989) Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg. Biomembr.* **21**, 497-506.

Kinnally, K. W., Lohret A., Campo, M. und Manella, C. (1995) Perspectives on the mitochondrial Multiple Conductance Channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 115-123.

Klebba, P. E. und Newton, S. M. (1998). Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 238-247.

Koehler, C. M., Merchant, S., Opplinger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und Tokatlidis, K. (1998) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* **17**, 6477-6486.

Koehler, C. M., Merchant, S. und Schatz, G. (1999) How membrane proteins travel the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 428-432.

Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. und Mihara, K. (1998) Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J.* **17**, 3886-3898.

Korizova, L. K. und Montal, M. (2002) Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat. Struct. Biol.* **10**, p.1-70.

Kuan und Saier (1993a) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 209-33

Kuan und Saier (1993b) Expansion of the mitochondrial carrier family. *Res Microbiol* **144**, 671-672.

Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P. J. T., Blom, J., Meijer, M. und Pfanner, N. (1994) The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett.* **349**, 215-221.

Kübrich, M., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1995) Genetic and biochemical dissection of the mitochondrial protein-import machinery. *Curr. Genet.* **27**, 393-403.

Kunkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. und Neupert, W. (1998a) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* **93**, 1009-1019.

Kyte, J., Doolittle, A. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105 – 132.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Laio, A. und Torre, V. (1999) Physical origin in ionic channels of biological membranes. *Biophys. J.* **76**, 129-148.

Laver, D. R. und Gage, P. W. (1997) Interpretation of Substates in Ion Channels: Unipores or Multipores? *Prog. Biophys. molec. Biol.* **67**, 99-140.

Li, S. H., Hoyles, M., Kuyucak, S. und Chung, S. H. (1998) Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys. J.* **74**, 37-47.

Lithgow, T., Glick, B. S. und Schatz, G. (1995) The protein import receptor of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 98-101.

Lohret, T. A. und Kinally, K. (1995) Multiple conductance channel activity of wild-type and VDAC-less yeast mitochondria. *TIBS* **20**, 98-101.

Lohret, T. A., Jensen, R. E. und Kinally, K. (1995) Targeting peptides transiently block a mitochondrial channel. *J. Biol. Chem.* **270**, 15950-15953.

Lohret, T. A., Jensen, R. E. und Kinally, K. (1997) Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane is required for normal activity of the Multiple Conductance Channel, MCC. *J. Cell Biol.* **137**, 377-386.

Miller, C. und White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chlorid channels of Torpedo electroplax. Intimations of molecular structure from quirks of single-channel function. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **81** , 2772-2775.

Muro., C., Grigoriev, S. M., Pietkiwicz, D., Kinnally, K. und Campo, M. (2003) Comparison of the TIM and TOM channel activities of the mitochondrial protein import complexes. *Biophys. J.* **84**, 2981-2989.

Maarse, A. C., Blom, J., Grivell, L. A. und Meijer, M. (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein , is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* **10**, 3619-3628.

Marabini, R. und Carazo, J. M. (1994) Pattern recognition and classification of images of biological macromolecules using artificial neural networks. *Biophys. J.* **66**, 1804-1814.

Marabini, R., Masegosa, I.M., San Martin, M.C., Marco, S., Fernandez, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, J. M. und Carazo, J. (1996) Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**, 237- 240.

Mathes, A. und Engelhardt, H. (1998) Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophys. J.* **75**, 1255-1262.

Manning D. S., Reschke D. und K., Judd R. C. (1997) Omp85 proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* are similar to *Haemophilus influenzae* D-15-Ag and *Pasteurella multocida* Oma87. *Microb. Pathog.* **25**, 11-21.

McGuffin L. J., Bryson K. und Jones, D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405.

Meisinger, C., Sommer, T. und Pfanner, N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal. Biochem.* **287**, 339-42.

Miroux, B. und Walker, J. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298.

Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W. und Hell, K. (2003) Tim50, a novel component of the Tim23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 816-825.

Model, K., Prinz T, Ruiz T, Radermacher M, Krimmer T, Kuhlbrandt W, Pfanner N, Meisinger C (2002) Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* **316**, 657-66.

Moran, O., Sandri, G., Panfili, E., Stühmer, W. und Sorgato, M. C. (1990) Electrophysiological characterization of contact sites in brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 908-913.

Mueller, P., Rudin, D., Tien, H.T. und Westcott, W.C. (1962) Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro. *Circ. Res.* **26**, 1167-1171.

Nazos, P. M., Antonucci, T. K., Landick, R., Oxender, D. L. (1986) Cloning and characterization of livH, the structural gene encoding a component of the leucine transport system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **166**, 565-73

Neher, E., Sakmann, B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 779-802.

Nelson, D. R., Felix C. M., und Swanson, J. M. (1998). Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* **277**, 285-308.

Neugebauer, J. A. *A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry.* 1997

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

Nonner, W., Chen, D. P., und Eisenberg, B. (1999) Progress and prospects in permeation. *J. Gen. Physiol* **113**, 773-782.

Ostermann, J., Voos, W., Kang, P. J., Craig, E. A., Neupert, W. und Pfanner, N. (1990) Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS Lett.* **277**, 281-284.

Patlak, B. J. (1988) Sodium channel subconductance states measured with a new variance – mean analysis. *J. Gen. Physiol.* **98**, 413-430.

Palmieri, F. (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* **346**, 48-54.

Palmieri F., Bisaccia F., Capobianco L, Dolce V., Fiermonte G., Iacobazzi V., Indiveri C. und Palmieri L. (1996). Mitochondrial metabolite transporters. *BBA* **1275**, 127-132.

Pfanner N., Hoeben P., Tropschug M., Neupert W. (1987a) The carboxy-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 14851 - 14854.

Pfanner, N., Rassow, J., van der Klei, I. J., Neupert, W. (1992) A dynamic model of the mitochondrial protein import machinery. *Cell* **20**; 68(6), 999 – 1002

Pfanner, N., Craig, E. A. und Meijer, M. (1994) The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 368 - 372.

Pfanner, N. und Meijer, M. (1997) Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biol.* **7**, R100 - R103.

Pfanner, N. (1998) Mitochondrial import: Crossing the aqueous intermembrane space. *Curr. Biol.* **8**, R262 - R265.

Pfeffer und Rothman (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 829 - 852.

Phale, P. S., Philippsen, A., Widmer, C., Phale, V. P., Rosenbusch, J. P., und Schirmer, T. (2001) Role of charged residues at the ompf porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochem.* **40**, 6319-6325.

Phale, P. S., Schirmer, T., Prilipov, A., Lou, K. L., und Hardmeyer, A. (1997) Voltage gating of *Escherichia coli* porin channels: Role of the constriction loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6741-6745.

Prat, A. G. und Cantiello, H. F. (1996) Nuclear ion channel activity is regulated by actin filaments. *Am. J. Physiol.* **270**, 1532 - 43.

Rassow, J., Hart, 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., Dekker, P. J., van Wilpe, S., Meijer, M. und Soll, J. (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* **286**, 105-20.

Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K. N., und Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* **299**, 1747 - 1751.

Reumann, S., Davila-Aponte, J. und Keegstra, K. (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 784-789.

Ryan, K. R., Menold, M. M., Garrett, S. und Jensen, R. E. (1994) SMS1, a high-copy suppressor of the yeast *mas6* mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* **5**, 529 – 38.

Sabirov, R. Z., Krasilnikov, O. V., Ternovsky, V. I., und Merzliak, P. G. (1993). Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes. A novel method of pore size determination. *Gen. Physiol Biophys.* **12**, 95-111.

Saint, N., Lou, K. L., Widmer, C., Luckey, M., Schirmer, T., und Rosenbusch, J. P. (1996) Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* **271**, 20676-20680.

Samartzidou, H. und Delcour, A. H. (1998) E. coli PhoE porin has an opposite voltage dependence to the homologous OmpF. *EMBO J.* **17**, 93-100.

Samartzidou, H. und Delcour, A. H. (1999) Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators. *FEBS Lett.* **444**, 65-70.

Sansom, M. S. und Kerr, I. D. (1995) Transbilayer pores formed by beta-barrels: molecular modeling of pore structures and properties. *Biophys. J.* **69**, 1334-1343.

Sansom, M. S., Shrivastava, I. H., Ranatunga, K. M. und Smith G. R. (2000) Simulations of ion channels-watching ions and water move. *Trends Biochem Sci.* **25**, 368-374.

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

Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, p. 223 – 231.

Scherer, P. G., Krieg, U. C., Hwang, S. T., Vestweder, T. 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.

Schirmer, T. und Phale, P. S. (1999) Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* **294**, 1159-1167.

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

Schwartz, M. P., Matouschek, A. (1999) The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *PNAS* **96**, 13086-13090.

Smart, O. S., Breed, J., Smith, G. R. und Sansom, M. S. P. (1997) A novel method for structural-based prediction of ion channel conductance properties. *Biophys. J.* **72**, 1109-1126.

Simon, S. M. und Blobel, G. (1991) A protein- conducting channel in the endoplasmatic reticulum. *Cell* **65**, 371-380.

Simon, S. M. und Blobel, G. (1992) Signal peptides open protein- conducting channels in *E. coli*. *Cell* **69**, 677-684.

Sines, J. J., Allison, S. A., und McCammon, J. A. (1990) Point charge distributions and electrostatic steering in enzyme/substrate encounter: Brownian dynamics of modified copper/zinc superoxide dismutases. *Biochem.* **29**, 9403-9412.

Siniossoglou, S., Hurt, E.C. und Pelham, H. R. B. (2000) Psr1/Psr2p, two plasma membrane phosphatases with an essentiell DXDX(T/V) motif required for sodium stress response in yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 19352-19360.

Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**, 582-585.

Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. H., Neupert, W. und Brunner, M. (1997) Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membranes of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**, 29963-29966.

Smart, O. S., Breed, J., Smith, G. R., Sansom, M. (1997) A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties. *Biophys. J.* **72**, 1109-1126.

Stange, M., Tripathy, A. und Meissner, G. (2001) Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle Ca²⁺- release channel. *Biophys. J.* **81**, 1419-1429.

Stoops, J. K., Kolodziej, J. P., Schroeter, J. P., Breaudiere, J. P., Wakil, S. J. (1992) Structure-function relationships of the yeast fatty acid synthase: negative-stain, cryo-electron microscopy, and image analysis studies of the end views of the structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6585- 6589.

Strong, M., Chandy, K. G., und Gutman, G. A. (1993) Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes-on the origins of electrical excitability. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 221-242.

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.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

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

Ungermann, C., Guiard, B. J., Neupert, W. und Cyr, D. M. (1996) The role of hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* **266**, 1250-1253.

Van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A. C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P. J. T., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Hönlinger, A. und Pfanner, N. (1999) Tom22 is multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**, 485-489.

Van Gelder, P., Saint, N., Phale, P., Eppens, E. F., Prilipov, A., van Boxtel, R., Rosenbusch, J. P. und Tommassen, J. (1997) Voltage sensing in the PhoE und OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: role of charged residues. *J. Mol. Biol.* **269**, 468-472.

Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J. (2002) Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional Chaperone. *J. Biol. Chem.* **277**, 36100-36108.

Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. und Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262-265.

Watanabe, M., Rosenbusch, J. P., Schirmer, T., und Karplus, M. (1997) Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **72**, 2094-2102.

Weast, R. C. (1978) in: Handbook of chemistry and physics, CRC-Press.

Wiedemann, N., Pfanner, N. und Ryan, M. T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* **20**, 951-960.

Wilmsen, U., Methfessel, W., Hanke, W. und Boheim, G. (1983) in: *Physical chemistry of transmembrane ion motion*. Elsevier, Amsterdam, 479-485).

Yellen, G. (1984). Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} activated K^{+} channels of bovine chromaffin cells. *J. Gen. Phys.* **84**, 157-186.

Zara, V., Rassow, J., Wachter, E., Tropschug, M., Palmieri, F., Neupert, W. und Pfanner, N (1991) Biogenesis of the mitochondrial phosphate carrier. *Eur. J. Biochem.* **198**, 405-410.

6.4.1 Publikationen:

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

Truscott Kaye. N., **Kovermann Peter**, Geissler Andreas., Merlin Alessio., Meijer Michiel, Driessen, Arnold J. M., Rassow, Joachim, Pfanner Nikolaus und Wagner Richard (2001). A voltage activated- and presequence sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase is formed by Tim23. *Nat. Struc. Biol.* **8**, 1074-1082.

Kovermann Peter, Truscott Kaye N., Guiard Bernard, Rehling Peter, Sepuri Naresh B., Müller Hanne, Jensen E. Robert, Wagner Richard und Pfanner Nikolaus (2002). Tim22, the essentiell core of the mitochondrial preprotein insertion complex forms a voltage activated and signal-gated channel. *Mol Cell.* **9**, 363-373.

Rehling Peter, Model Kirsten, Brandner, Katrin, **Kovermann, Peter**, Sickmann Albert, Meyer Helmut E., Kühlbrandt, Werner, Wagner, Richard, Truscott Kaye N., und Pfanner Nikolaus (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, **299**, 1747-1751.

Des weiteren war der Autor während seiner Promotion an folgenden weiteren Publikationen beteiligt.

Hill Kerstin, Hemmler Roland, **Kovermann Peter**, Georg Kreimer und Wagner Richard (2000) A Ca^{2+} - and voltage-modulated flagellar ion channel is a component of the mechanoshock response in the unicellular green alga *Spermatozopsis similis*. *Biochim Biophys Acta Jun 1*; **1466** , 187-204.

6.5 Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Abteilung Biophysik des Fachbereiches Biologie/Chemie an der Universität Osnabrück unter der Leitung von Professor Richard Wagner.

Im folgenden möchte ich all denjenigen gegenüber Dank aussprechen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Zu allererst gilt mein ganz besonderer Dank Prof. Richard Wagner für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas, und für die jederzeit verfügbare freundschaftliche Hilfsbereitschaft während der Dissertation und auch in den Jahren davor. Ich danke witerhin Joachim Rassow (Universität Hohenheim), Gunnar Jeserich (Universtät Osnabrück) und Thomas Krüppel (Universität Osnabrück) für die wissenschaftliche Beguachtung dieser Arbeit. Ich danke der DFG (Deutsche Forschungs Gesellschaft) für die finanzielle Unterstützung meines Projektes. Prof. Dr. Wolfgang Junge möchte ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für sein Interesse an dieser Arbeit danken. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nikolaus Pfanner und seiner Arbeitsgruppe, besonders Peter Rehling, Kaye Truscott und Andreas Geissler (Universität Freiburg), für die Überlassung der ausgezeichneten Präparationen und für den guten Email Kontakt sowie die finanzielle Unterstützung von der Universität Freiburg in den Jahren 2000-2001. Ausserdem danke ich Dr. Kirstin Model und Werner Kühlbrandt (MPI Frankfurt) für die freundliche Überlassung der EM-Bilder vom TIM22-Komplex zur Präsentation in dieser Arbeit. Die EM-Befunde haben wesentliche Punkte in dieser Arbeit bestätigt. Meinen Kollegen in der Abteilung Biophysik danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und besonders der P16-Crew für nette gesellige Abende und Hilfe bei der Bearbeitung dieses Themas. Dr. Roland Hemmler (Universität Münster) danke ich besonders für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für diverse gemeinsame freizeitliche Aktivitäten. Andreas Wirth danke ich vor allem für seine angenehme Begleitung bei beruflich bedingten Auswärtsaufenthalten

Zu allerletzt, aber nicht weniger danke ich meiner besseren Hälfte Sonja für ihre seelische Unterstützung, sowie meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung in den Jahren vor und während der Dissertation.

6.6 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Osnabrück, im Juni 2003

Peter Alexander Kovermann

Lebenslauf

Name: Peter Alexander Kovermann

Geburtstag: 30.12.1970

Geburtsort: Osnabrück

Beruf: Diplom-Biologe

Eltern: Klaus und Christel Kovermann

- | | |
|-----------|--|
| 1977-1981 | Grundschule Haste |
| 1981-1992 | Orientierungstufe Belm |
| 1983-1992 | Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium |
| 1992 | Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife |
| 1993-1999 | Diplomstudiengang Biologie an der Universität Osnabrück |
| 1997 | Hilfswissenschaftliche Tätigkeit bei der Erstellung der „ <i>Electronic library</i> “ (DFG-Projekt) |
| 1998-2002 | Hilfswissenschaftliche Tätigkeit in der Internetöffentlichkeitsarbeit des Fachbereichs Biologie/Chemie bei Prof. Richard Wagner. |
| 1999-2000 | Diplomarbeit am Fachbereich Biophysik unter der Leitung von Prof. Richard Wagner und Prof. Wolfgang Junge. |
| 2000-2003 | Dissertation am Fachbereich Biophysik unter der Leitung von Prof. Richard Wagner |
| 2000-2001 | Anstellung bei der Albert-Ludwig-Universität Freiburg |
| 2001-2003 | Anstellung im Sonderforschungsbereich 431 |

Sprachkenntnisse: Deutsch, Russisch, Englisch.

Ersatzdienst: geleistet im Landeskrankenhaus Osnabrück (1992-1993)

Osnabrück im Juni 2003,

Peter Alexander Kovermann