

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der  
Proteintranslokasen der mitochondrialen Innenmembran  
von *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Christian Kozany  
aus München

München, 2004

Dissertation eingereicht am: 01. Dezember 2004

1. Gutachter: Professor Dr. Reinhold Herrmann
  2. Gutachter: PD Dr. Enrico Schleiff
- Sondergutachter: Professor Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2005

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Zytoplasmatische Faktoren für den Import von Proteinen in Mitochondrien</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Signalsequenzen für den Import in Mitochondrien</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Proteintranslokasen in Mitochondrien</b> .....	<b>5</b>
1.4.1 Die Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex).....	5
1.4.2 Die Proteintranslokasen der inneren mitochondrialen Membran.....	7
1.4.4 Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran über Oxa1 .....	15
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Chemikalien und Enzyme</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Geräte und sonstige Materialien</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Verwendete Medien</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.4.1 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme: .....	22
3.4.2 Verwendete Plasmide .....	22
3.4.3 Präparation von DNA .....	23
3.4.4 Klonierung von DNA Fragmenten .....	29
3.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	34
3.4.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	35
3.4.7 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	35
3.4.8 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels Hybridisierungssonden (Southernblot).....	36
<b>3.5 Genetische Methoden</b> .....	<b>41</b>
3.5.1 Methoden der Hefegenetik .....	41
3.5.2 Methoden der <i>Neurospora</i> -Genetik .....	45
<b>3.6 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>49</b>
3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
3.6.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure .....	49
3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
3.6.4 Anfärben von Proteinen im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 .....	50
3.6.5 Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel nach Blum (Blum <i>et al.</i> , 1987).....	51
3.6.6 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot).....	51
3.6.7 Quantifizierung durch Autoradiographie und Phosphoimaging .....	52
3.6.8 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine <i>in vitro</i> .....	52
3.6.9 Gelfiltrationschromatographie .....	53
3.6.10 Abschätzen des nativen Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch blaue Nativgele (Schägger <i>et al.</i> , 1994; Schägger <i>et al.</i> , 1991).....	54
3.6.11 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> Zellen.....	55
3.6.12 Reinigung von Proteinen mit N-terminalem Histidinylanhang aus <i>E. coli</i> Zellen.....	56
3.6.13 Reinigung von Tim22 aus <i>Neurospora crassa</i> .....	57
3.6.14 Quervernetzung von Proteinen.....	57
3.6.15 Rekonstitution von <i>NcTim22</i> in Lipidvesikel (Rigaud <i>et al.</i> , 2003).....	58

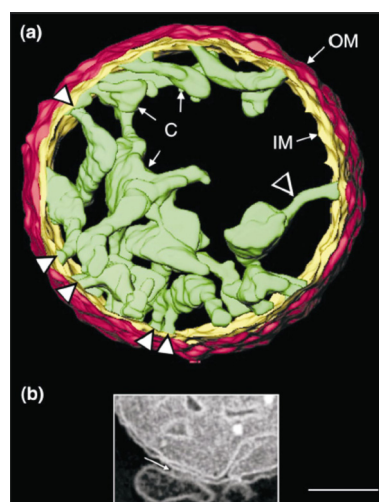
<b>3.7 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>60</b>
3.7.1 Aufschluss von Hefezellen durch alkalische Lyse (»Rödel-Aufschluß«) (Kushnirov, 2000) .....	60
3.7.2 Subfraktionierung von Hefezellen .....	61
3.7.3 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> (Herrmann <i>et al.</i> , 1994; Zinser <i>et al.</i> , 1995) .....	62
3.7.4 Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i> (Sebald <i>et al.</i> , 1979).....	63
3.7.5 Subfraktionierung von Mitochondrien .....	63
3.7.6 Import <i>in vitro</i> synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien.....	65
<b>3.8 Immunologische Methoden .....</b>	<b>66</b>
3.8.1 Antigengewinnung von <i>ScTim16</i> , <i>NcTim22</i> und <i>NcTim54</i> .....	66
3.8.2 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen (Sollner <i>et al.</i> , 1990).....	66
3.8.3 Kopplung von Antigenen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B .....	67
3.8.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	68
3.8.5 Koimmunfällung von Proteinen .....	68
3.8.6 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose- Membranen.....	69
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Identifikation von Komponenten der Proteinimportmaschinerien der inneren   mitochondrialen Membran in <i>Neurospora crassa</i> .....</b>	<b>70</b>
4.1.1 Identifikation von Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie mit degenerierten Primern .....	71
<b>4.2 Der TIM22-Komplex in <i>Neurospora crassa</i> .....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Nachweis der identifizierten Proteine Tim22 und Tim54 in Mitochondrien .....	80
4.2.2 Tim22 aus <i>Neurospora crassa</i> kann die Funktion von Tim22 in Hefe übernehmen .....	81
4.2.3 Lokalisation von Tim22 und Tim54 in <i>Neurospora crassa</i> .....	82
4.2.4 Import von Tim54 in Mitochondrien .....	84
4.2.4 Gibt es einen membranassoziierten TIM9/10-Komplex in <i>Neurospora crassa</i> ?....	85
4.2.5 Der TIM22-Komplex in <i>Neurospora crassa</i> .....	86
4.2.6 Herstellung von Stämmen von Tim22 und Tim54 mit Oktahistidinyl-Anhang.....	88
4.2.7 Reinigung des TIM22-Komplexes .....	90
4.2.8 Rekonstitution von Tim22 in Lipidvesikel.....	93

<b>4.3 Identifizierung von Tim16 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>96</b>
4.3.1 Koreinigung von Tim16 mit Tim14 mit N-terminalem Oktahistidinylanhang.....	96
4.3.2 Tim16 ist ein konserviertes Protein, welches dem J-Protein Tim14 strukturell ähnelt.....	98
4.3.3 Tim16 ist ein mitochondriales Matrixprotein, welches mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert ist .....	99
4.3.4 Tim16 ist ein essentielles Protein.....	101
4.3.5 Die Depletion von Tim16 beeinflusst den Import über den TIM23-Komplex .....	103
4.3.6 Tim16 ist eine Komponente des TIM23-Komplexes.....	106
4.3.7 Tim44 vermittelt die Interaktion des TIM14/16-Subkomplexes mit dem Tim17/23-Subkomplex.....	107
4.3.8 Tim16 ist in der Nachbarschaft translozierender Präproteine lokalisiert.....	108
4.3.9 Tim16 interagiert mit den mitochondrialen Motorkomponenten Tim14, Tim44 und mtHsp70 .....	109
4.3.10 Tim16 interagiert dynamisch mit den Motorkomponenten mtHsp70 und Tim44 .....	111
4.3.11 Tim16 ist essentiell für die Integrität des mitochondrialen Importmotors.....	111
4.3.13 Die Interaktion von Tim44 mit mtHsp70 ist unabhängig von Tim16.....	114
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>115</b>
<b>5.1 Vergleich der TIM-Translokasen von <i>N. crassa</i>, <i>S. cerevisiae</i> und dem Menschen</b> .....	<b>115</b>
<b>5.2 Charakterisierung des TIM22-Komplexes in <i>Neurospora crassa</i></b> .....	<b>117</b>
5.2.1 Die Lokalisation und Topologie der Komponenten Tim22 und Tim54 in <i>Neurospora crassa</i> .....	117
5.2.2 Aufbau und Stabilität des TIM22-Komplexes .....	119
5.2.3 Reinigung des TIM22-Komplexes und des Tim22 .....	120
5.2.4 Rekonstitution des TIM22-Komplexes in Lipidvesikel.....	122
<b>5.3 Das Kochaperon Tim16 des mitochondrialen Importmotors</b> .....	<b>124</b>
5.3.1 Identifizierung von Tim16 in <i>S. cerevisiae</i> .....	124
5.3.2 Tim16 ist eine essentielle Komponente der Importmotor-abhängigen-Translokation für Vorstufenproteine .....	125
5.3.3 Tim16 ist eine Komponente des mitochondrialen Importmotors des TIM23-Komplexes .....	126
5.3.5 Der mitochondriale Importmotor weist mit Tim44 und Tim16 zusätzliche Komponenten gegenüber dem bakteriellen DnaK/DnaJ/GrpE-System auf.....	127
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>130</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>132</b>
<b>8. Abkürzungen</b> .....	<b>151</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

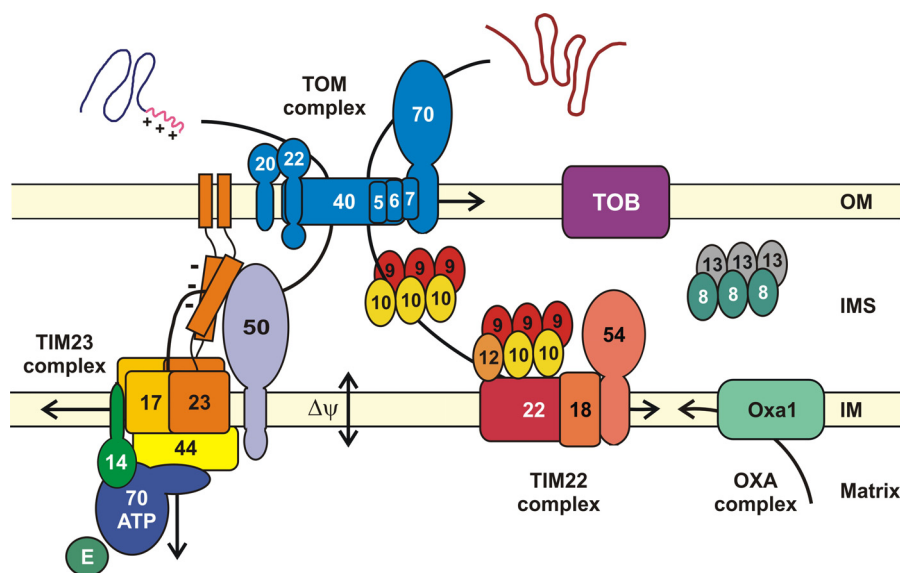
Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind. Die äußere Membran umschließt die Organelle, die innere Membran kann in zwei Bestandteile unterteilt werden. Zum einen gibt es den Membranbestandteil, der parallel zur äußeren Membran die innere Begrenzung der Mitochondrien bildet, die innere Grenzmembran. Zum anderen handelt es sich um die Cristae-Membran, in die Matrix hineingefaltete Bereiche der inneren mitochondrialen Membran (siehe Abb. 1). Außerdem besitzen Mitochondrien zwei interne Kompartimente: den Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Membran, und die mitochondriale Matrix, die von der inneren Membran umschlossen wird (siehe Abb. 1). Eine der Aufgaben der Mitochondrien besteht darin, Energie aus der Oxidation von Pyruvat zu gewinnen. Die Energie wird in Form von ATP gespeichert. Dazu beinhalten Mitochondrien die notwendigen Enzyme des Zitronensäurezyklus in der mitochondrialen Matrix, sowie Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase in der inneren Membran. Desweiteren spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Synthese von Eisen-Schwefel-*Cluster*-Verbindungen, bei der Apoptose und der Kontrolle des oxidativen Stress bei der Zellalterung.



**Abb. 1: Tomographie isolierter Rattenlebermitochondrien (Frey et al., 2000)**

(a) In rot dargestellt ist die äußere mitochondriale Membran (OM), in gelb die innere Grenzmembran. In grün abgesetzt sind die Cristae (C) der inneren mitochondrialen Membran (IM). Das Dreieck kennzeichnet eine tubuläre Region der Cristae, die sie mit der inneren Grenzmembran verbindet. In (b) ist der enge Kontakt der äußeren und inneren mitochondrialen Membran an Kontaktstellen zu sehen. Mit einem Pfeil gekennzeichnet ist ein Partikel, das vermutlich ein Vesikel des ER mit der äußeren mitochondrialen Membran verknüpft.

Um ihre Funktion auszuüben, haben Mitochondrien ein spezifisches Set an Proteinen. Obwohl Mitochondrien eigene DNA und einen eigenen Proteinsyntheseapparat besitzen, sind nur die wenigsten dieser Proteine mitochondrial kodiert. Der Großteil der benötigten Proteine ist im Zellkern kodiert und wird in die Mitochondrien importiert. Für die Translokation in die Mitochondrien sind mehrere Proteinkomplexe verantwortlich (siehe Abb. 2). Der TOM-Komplex transportiert Proteine über die äußere mitochondriale Membran. Die Insertion in die äußere Membran wird durch den TOM-Komplex oder für  $\beta$ -barrel Proteine durch den TOB-Komplex vermittelt (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003). Die Translokation über die innere mitochondriale Membran wird durch den TIM23-Komplex bewerkstelligt. Die Insertion in die innere mitochondriale Membran erfolgt durch den TIM23-Komplex, den TIM22-Komplex oder den OXA-Komplex (Neupert, 1997; Paschen *et al.*, 2001; Pfanner *et al.*, 2001; Rehling *et al.*, 2004).



**Abb. 2: Übersicht mitochondrialer Proteintranslokasen in *Saccharomyces cerevisiae* (Paschen *et al.*, 2001)**

In der äußeren mitochondrialen Membran sitzt der TOM-Komplex (Proteintranslokase der äußeren Membran). Er besteht aus den Rezeptorkomponenten Tom20, Tom22 und Tom70 und der porenbildenden Komponente Tom40 sowie den kleinen Tom-Proteinen Tom5, Tom6 und Tom7. Der TOB-Komplex (Topogenese von  $\beta$ -barrel-Proteinen der äußeren Membran) ist für die Insertion von  $\beta$ -barrel Proteinen in die äußere Membran verantwortlich. In der inneren mitochondrialen Membran findet man die sogenannten TIM-Komplexe (Proteintranslokase der inneren Membran). Der TIM23-Komplex ist für den Import von Präproteinen mit aminoterminaler Signalsequenz in die mitochondriale Matrix verantwortlich. Er besteht aus den integralen Komponenten Tim17, Tim23 und Tim50 sowie den Motorproteinen Tim44, mtHsp70, Tim14 und Mge1 in der mitochondrialen Matrix. Der TIM22-Komplex integriert Proteine mit multiplen Transmembrandomänen und internen Signalsequenzen in die innere mitochondriale Membran. Er besteht aus den Komponenten Tim22, Tim54, Tim18, Tim12, Tim9 und Tim10. Im Intermembranraum findet man zwei hexamere Komplexe aus kleinen Tim-Proteinen. Der TIM9/10-Komplex ist beteiligt am Import von Substraten des TIM22-Komplexes, der TIM8/13-Komplex am Import von TIM23. Eine weitere Translokase der inneren mitochondrialen Membran ist der OXA-Komplex, der an der Insertion von Proteinen aus der mitochondrialen Matrix in die innere mitochondriale Membran beteiligt ist.

## 1.2 Zytosolische Faktoren für den Import von Proteinen in Mitochondrien

Da mehr als 98% aller mitochondrialen Proteine im Kern kodiert sind, werden diese Proteine durch zytosolische Ribosomen synthetisiert. Zytosolische Chaperone der Hsp70 Familie aber auch spezifische Faktoren, wie beispielsweise MSF (mitochondrialen Import stimulierender Faktor), halten die zu importierenden Präproteine in einem importkompetenten Zustand (Hoogenraad *et al.*, 2002).

Die zytosolischen Chaperone Hsp70 und Hsp90 interagieren mit der Komponente Tom70 des TOM-Komplexes. Auf diese Weise werden Präproteine von diesen zytosolischen Chaperonen direkt auf den Importrezeptor Tom70 übertragen (Young *et al.*, 2003a; Young *et al.*, 2003b).

MSF, ein Heterodimer von 66 kDa, wurde erstmals aus Rattenleber im Zusammenhang mit der Stimulation des Imports von Preadrenodoxin isoliert (Hachiya *et al.*, 1993; Hachiya *et al.*, 1994; Hachiya *et al.*, 1995; Komiya *et al.*, 1996; Komiya *et al.*, 1997). Er benötigt ATP für seine Funktion und ist sensitiv gegenüber Behandlung mit N-ethylmaleimid. Jedoch sind nicht alle Präproteine auf MSF für ihren Import in Mitochondrien angewiesen. Es bleibt zu klären, ob MSF in ähnlicher Weise wie Hsp70 und Hsp90 mit dem TOM-Komplex interagiert.

## 1.3 Signalsequenzen für den Import in Mitochondrien

Nach der Synthese im Zytoplasma müssen mitochondriale Proteine spezifisch von Mitochondrien erkannt und aufgenommen werden. Dies geschieht mit Hilfe spezifischer Signalsequenzen. Mitochondriale Signalsequenzen lassen sich prinzipiell in zwei Klassen einteilen, N-terminale Signalsequenzen und interne Signalsequenzen.

Proteine, die in die mitochondriale Matrix importiert werden, tragen gewöhnlich aminoterminal Signalsequenzen, die beim Import in die Matrix durch die Protease MPP (mitochondriale Prozessierungsprotease) abgespaltet werden (Braun *et al.*, 1997). Es finden sich nur wenige Ausnahmen für Proteine der mitochondrialen Matrix, deren Signalsequenz im Verlauf des mitochondrialen Imports nicht abgespaltet wird, z.B. das Chaperonin 10 (Hsp10) (Rospert *et al.*, 1993a; Rospert *et al.*, 1993b). Die Signalsequenzen sind typischerweise 20 bis 60 Aminosäuren lang und enthalten positiv geladene und hydroxylierte, aber kaum negativ geladene Aminosäurereste. Signalsequenzen können amphipathische  $\alpha$ -Helices ausbilden, die auf einer Seite die positiv geladenen Aminosäurereste und auf der anderen hydrophobe Aminosäurereste exponieren (Roise *et al.*, 1988a; Roise *et al.*, 1988b; von Heijne, 1986). Die Struktur der Signalsequenz ermöglicht dessen Erkennung durch die Rezeptorkomponenten



Tom20 und Tom22 im TOM-Komplex (siehe 1.4.1). Die positive Nettoladung der Signalsequenz spielt möglicherweise eine Rolle für die Translokation in die mitochondriale Matrix (Martin *et al.*, 1991). Es wurde vorgeschlagen, dass das Membranpotential über die innere mitochondriale Membran einen elektrophoretischen Effekt auf die positiv geladene Präsequenz ausübt.

Einige Proteine zeigen bezüglich ihrer Signalsequenz Besonderheiten. Mit der DNA-Helicase Hmi1 konnte ein Protein identifiziert werden, das eine carboxyterminale, spaltbare Signalsequenz besitzt. Dieses Protein wird offensichtlich in reverser Orientierung transloziert (Lee *et al.*, 1999).

Die Protein Cytochrom *b*<sub>2</sub> besitzt ein zweigeteiltes Sortierungssignal (Glick *et al.*, 1992; Gruhler *et al.*, 1995; Hartl *et al.*, 1987; Hurt *et al.*, 1986; Koll *et al.*, 1992). Zwischen der N-terminalen Signalsequenz für den Import in die mitochondriale Matrix und dem reifen Protein findet man ein hydrophobes Sortierungssignal, das für die Insertion des Proteins in der inneren Membran verantwortlich ist. Prozessierung nach dem zweiten Sortierungssignal setzt das Protein in den Intermembranraum frei.

Das Protein Bcs1 weist ein internes Sortierungssignal auf (Fölsch *et al.*, 1996; Stan *et al.*, 2003). Dieses Sortierungssignal besteht aus einem hydrophoben Transmembransegment und einem C-terminal positiv geladenen Bereich mit dem Potential, eine amphipathische Helix auszubilden. Beide Segmente sind für die Integration des Proteins in die Innenmembran notwendig. Man nimmt an, dass die beiden Segmente eine Haarnadelstruktur ausbilden, die einer „verdickten“ amphipathischen Helix entsprechen. Ein internes Sortierungssignal dieser Art ist auch für das Cytochrome *c*<sub>1</sub> beschrieben worden und findet sich ebenso in der Aminosäuresequenz des Tim14 (Arnold *et al.*, 1998).

Eine Gruppe integraler Innenmembranproteine hat neben der N-terminalen Signalsequenz einen hydrophoben Sequenzabschnitt, der in der Kombination mit nachfolgenden Ladungen als „*Stop-Transfer*“-Signal dient. Dieses „*Stop-Transfer*“-Signal verhindert den weiteren Import in die mitochondriale Matrix und sorgt für die Insertion des Proteins in die Innenmembran. Beispiele für diese Gruppe sind die D-Laktatdehydrogenase (DLD) und die Cytochrom-Oxidase Untereinheit Va (CoxVa) (Gärtner *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993; Rojo *et al.*, 1998).

Proteine der mitochondrialen *Carrier*-Familie (MCF), zu welcher der *ADP/ATP-Carrier* (AAC) gehört, haben interne Signalsequenzen für die Insertion in die innere mitochondriale Membran. Diese Proteine besitzen sechs bzw. vier Transmembranhelices. Im Gegensatz zu den Proteinen, die in die mitochondriale Matrix transportiert werden, weisen diese Proteine

nicht notwendigerweise geladene Aminosäurereste auf. Der genaue Charakter der Signalsequenzen ist jedoch noch nicht geklärt (Brix *et al.*, 1997; Sollner *et al.*, 1990). Die *Carrier*-Proteine werden von dem Importrezeptor Tom70 erkannt (siehe 1.4.1).

## 1.4 Proteintranslokasen in Mitochondrien

### 1.4.1 Die Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex)

Der TOM-Komplex dient als Eintrittspforte für alle Proteine, die in Mitochondrien importiert werden oder in die äußere Membran inserieren. Er ist aufgebaut aus den Proteinen Tom5, Tom6, Tom7, Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70 (siehe Abb. 2). Als Rezeptoren dienen die Proteine Tom20, Tom22 und Tom70, die alle mit jeweils einer Transmembrandomäne in der äußeren Membran verankert sind (Neupert, 1997; Paschen *et al.*, 2001; Pfanner *et al.*, 2001).

Die mitochondrialen Präproteine, die eine N-terminale Signalsequenz tragen, werden zunächst durch den Tom20/22 Rezeptor gebunden. Die Bindung von Präsequenzen an Tom20 konnte durch eine NMR-Untersuchung näher bestimmt werden (Abe *et al.*, 2000; Muto *et al.*, 2001). Demnach bildet die zytosolische Domäne von Tom20 eine apolare Grube, die über hydrophobe Interaktionen mit der hydrophoben Seite der amphipathischen Helix interagiert. Ionische Wechselwirkungen spielen keine bedeutende Rolle bei der Erkennung der Präsequenz durch den Tom20-Rezeptor.

Proteine der mitochondrialen *Carrier*-Familie (MCF), welche interne Signalsequenzen besitzen, werden von dem Tom70-Rezeptor erkannt (Bomer *et al.*, 1996; Kaldi *et al.*, 1998; Steger *et al.*, 1990; Truscott *et al.*, 1999).

Obwohl es im TOM-Komplex Rezeptorproteine gibt, die für verschiedene Importwege spezialisiert sind, können einzelne Rezeptoren deletiert werden. Die Rezeptoren scheinen in ausreichender Weise die Funktion der jeweils anderen Rezeptoren übernehmen zu können (Lithgow *et al.*, 1994; Ramage *et al.*, 1993).

Die initialen Rezeptoren Tom20 und Tom70 transferieren das gebundene Vorläuferprotein an den Rezeptor Tom22 (Honlinger *et al.*, 1995; van Wilpe *et al.*, 1999). Tom22 transferiert die zu translozierende Polypeptidkette zur GIP (generelle Importpore), die aus den Komponenten Tom40, Tom22, Tom5, Tom6 und Tom7 aufgebaut ist. Die kanalbildende Komponente in der GIP ist das Tom40. Tom40 ist die einzige für das Zellwachstum essentielle Komponente des TOM-Komplexes (Baker *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1998; Kiebler *et al.*, 1990). Rekombinantes renaturiertes Tom40 als auch nativ aus Mitochondrien gereinigtes Tom40 wurde in

Liposomen rekonstituiert (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998a; Stan *et al.*, 2000). Dieses gereinigte Tom40 besitzt die Eigenschaft, Präsequenzen zu binden und einen kationenselektiven Kanal zu bilden (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998).

Aus *N. crassa* konnten der TOM-*holo*- und der TOM-*core*-Komplex isoliert werden. Die Komponenten des TOM-*core*-Komplexes sind neben Tom40 auch Tom22, Tom5, Tom6 und Tom7. Diese Komponenten sind wahrscheinlich für die Stabilität des Komplexes und für seine Regulation notwendig (Ahting *et al.*, 1999; Model *et al.*, 2001; van Wilpe *et al.*, 1999). Die Strukturen dieser Komplexe konnten durch Elektronenmikroskopie und tomographische 3D-Rekonstruktion aufgeklärt werden (Ahting *et al.*, 1999; Künkele *et al.*, 1998b). Demnach bildet der TOM-*holo*-Komplex zwei oder drei Poren aus, der TOM-*core*-Komplex jedoch nur zwei Poren, die möglicherweise jeweils einen Protein-translozierenden Kanal darstellen. Die Porengröße beträgt circa 22Å. Wahrscheinlich sind acht Tom40-Moleküle an der Bildung des TOM-*core*-Komplexes beteiligt. Somit ist denkbar, dass eine Pore aus zwei Tom40-Dimeren gebildet wird (Ahting *et al.*, 2001; Künkele *et al.*, 1998a; Rassow *et al.*, 1990b; Schwartz *et al.*, 1999).

Die Rolle der kleinen Tom-Proteine ist noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt Tom5 eine Rolle bei der Übertragung des Präproteins in den Translokationskanal (Dietmeier *et al.*, 1997). Tom6 und Tom7 könnten der Assemblierung und Stabilisierung des TOM-Komplexes, sowie der Verknüpfung zwischen den Rezeptoren und der Translokationspore dienen (Alconada *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1995; Honlinger *et al.*, 1996; Kassenbrock *et al.*, 1993; Model *et al.*, 2001). Die räumliche Nähe der kleinen Proteine Tom6 und Tom7 zu translozierenden Präproteinen wurde durch Quervernetzung gezeigt (Dembowski *et al.*, 2001).

Für die Translokation von Präsequenzen über die äußere Membran sind weder Membranpotential noch ATP notwendig. Die Triebkraft für die Translokation der Präsequenz durch die Pore ist nicht eindeutig geklärt. Nach der sogenannten „*acid-chain-hypothesis*“ spielen ionische Wechselwirkungen zwischen positiven Ladungen der Präsequenz und negativ geladenen Resten verschiedener Tom-Komponenten eine Rolle (Komiya *et al.*, 1998; Schatz, 1997). Aber es scheinen auch nichtionische Wechselwirkungen beteiligt zu sein. Nach der sogenannten „*binding-chain-hypothesis*“ bewirken verschiedene transiente, nicht kovalente Interaktionen des Präproteins zu Bindungsstellen im TOM-Komplex die gerichtete Translokation durch den TOM-Komplex (Abe *et al.*, 2000; Brix *et al.*, 1999; Meisinger *et al.*, 2001). Die vollständige Translokation eines Proteins mit Präsequenz benötigt das Zusammenspiel mit Komponenten der Innenmembran.

## 1.4.2 Die Proteintranslokasen der inneren mitochondrialen Membran

### 1.4.2.1 Der TIM23-Komplex

In der inneren mitochondrialen Membran findet man zwei verschiedene Translokasen, den TIM22- und den TIM23-Komplex (siehe Abb. 2). Der TIM23-Komplex ist für die Translokation von Präproteinen in die mitochondriale Matrix und die Insertion einiger Proteine, wie zum Beispiel Proteine mit „*Stop-Transfer*“-Signal in die innere mitochondriale Membran verantwortlich (Koehler, 2000; Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 2001; Pfanner *et al.*, 2002; Rehling *et al.*, 2003b). Die Translokation von Präproteinen über beide Membranen erfolgt an Stellen wo die innere und äußere Membran der Mitochondrien in engen Kontakt kommen. Solche „Kontaktstellen“ werden nach Bedarf dynamisch während der Translokation des Präproteins zwischen dem TOM-Komplex und dem TIM23- oder TIM22-Komplex gebildet (Donzeau *et al.*, 2000; Endres *et al.*, 1999; Rassow *et al.*, 1989; Reichert *et al.*, 2002; Schleyer *et al.*, 1985). Das Fehlen von löslichen Intermediaten im Intermembranraum bestätigt die funktionelle Kooperation des TOM-Komplexes und der TIM-Komplexe beim Import von Proteinen (Endres *et al.*, 1999; Schulke *et al.*, 1999). Durch Arretierung eines Präproteins während der Translokation kann ein Intermediat erzeugt werden, das beide Membranen gleichzeitig durchspannt (Rassow *et al.*, 1989). Auf diese Weise kann ein Superkomplex isoliert werden, der sowohl den TOM-Komplex als auch den TIM23-Komplex beinhaltet. Ein solcher Komplex zeigt eine Molekularmasse von etwa 600 kDa (Dekker *et al.*, 1997; Schulke *et al.*, 1999). Wie Versuche mit Mitoplasten nach Öffnen der äußeren mitochondrialen Membran gezeigt haben, ist der TIM23-Komplex in der Lage, auch ohne Kooperation mit dem TOM-Komplex, Präproteine in die mitochondriale Matrix zu importieren (Hwang *et al.*, 1989).

Die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Komponenten des TIM23-Komplexes waren die integralen Transmembranproteine Tim23 und Tim17 sowie das peripher mit der Innenmembran assoziierte Tim44. Alle drei Komponenten scheinen in äquimolaren Mengen am Aufbau des TIM23-Komplexes beteiligt zu sein (Berthold *et al.*, 1995; Blom *et al.*, 1995; Dekker *et al.*, 1993; Moro *et al.*, 1999). Tim17 und Tim23 sind zueinander homologe Proteine; sie sind aber nicht in der Lage ihre Funktion wechselseitig zu übernehmen. Beide Proteine sind essentiell für das Wachstum der Hefezellen. Für beide Proteine sind vier Transmembranhelices vorhergesagt, wobei der Amino- und Carboxyterminus der Proteine in den Intermembranraum exponiert werden (Dekker *et al.*, 1993; Emtage *et al.*, 1993; Maarse *et*

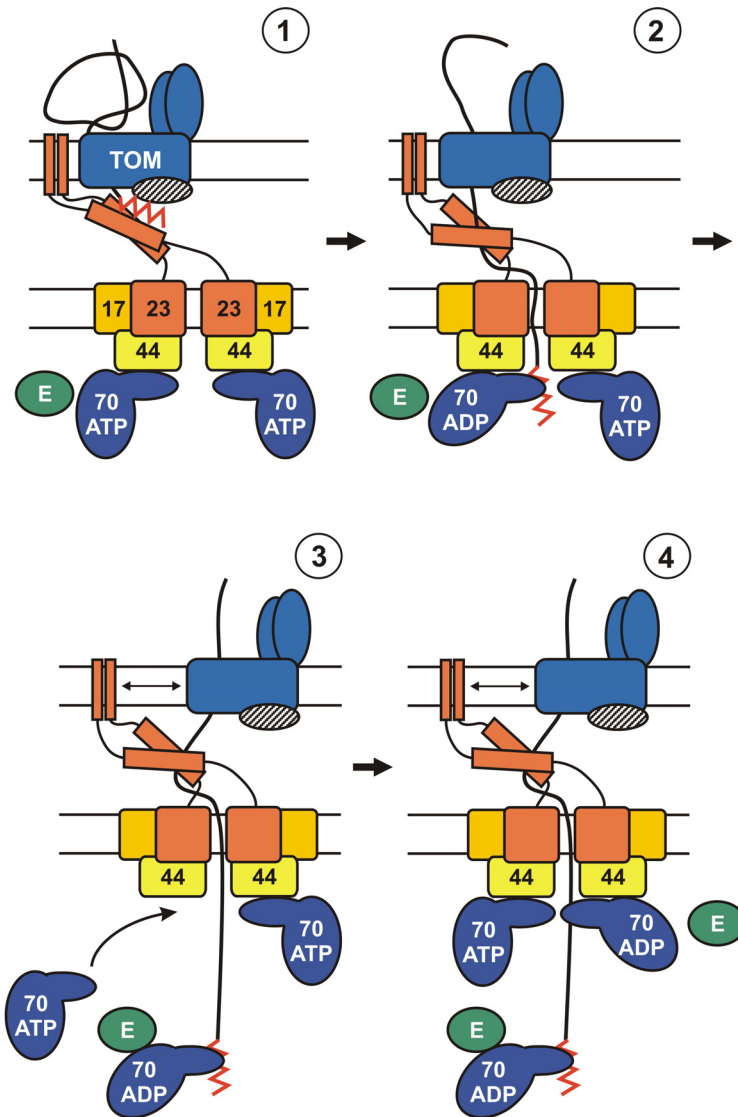
*al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1994). Wahrscheinlich wird die Importpore in der Innenmembran durch diese Transmembranhelices gebildet (Kübrich *et al.*, 1994; Lohret *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1998). Die molekulare Funktion von Tim17 in dem Komplex ist nicht bekannt. Tim23 aus *S. cerevisiae* besitzt im Vergleich zu Tim17 ein um ca. 100 Aminosäuren längeres aminotermiales Segment. Die Aminosäuren 50 bis 100 dieses Segments sind im Intermembranraum lokalisiert, besitzen hydrophilen Charakter und sind in der Lage zu dimerisieren. Da diese dimere Struktur in der Lage ist, Signalsequenzen zu binden, schreibt man ihr eine Rezeptorfunktion im Intermembranraum zu (Bauer *et al.*, 1996). Die Aminosäuren 1-49 von Tim23 sind in der äußeren Membran integriert, wobei der N-Terminus auf der Oberfläche der Mitochondrien exponiert ist (Donzeau *et al.*, 2000). Damit ist Tim23 in *S. cerevisiae* das erste Protein, welches die beiden mitochondrialen Membranen durchspannt. Neuen Erkenntnissen zufolge ist Tim23 alleine in der Lage, einen präsequenz- und spannungsabhängigen Kanal zu bilden (Truscott *et al.*, 2001). Dazu wurde Tim23 aus *S. cerevisiae* in *E. coli* synthetisiert, unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, und für elektrophysiologische Messungen verwendet. Demnach bildet der C-terminale Bereich von Tim23 einen kationenspezifischen Kanal hoher Leitfähigkeit. Der Durchmesser der gemessenen Tim23-Poren beträgt etwa 13 Å und ist damit groß genug eine  $\alpha$ -Helix aufzunehmen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Importstudien, dass Präproteine im entfalteten Zustand in Mitochondrien importiert werden.

Für die Translokation der Präsequenz durch den Kanal des TIM23-Komplexes wird das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) über die Innenmembran benötigt. Die Rolle des  $\Delta\Psi$  ist noch nicht geklärt. Es könnte für die Dimerisierung des Tim23 und damit der Ausbildung eines Präsequenzrezeptors sorgen (Bauer *et al.*, 1996). Zusätzlich könnte das  $\Delta\Psi$  eine elektrophoretische Kraft auf das Präprotein ausüben und somit den Transport der Präsequenz über die Membran ermöglichen (Martin *et al.*, 1991). Um das Membranpotential über die Innenmembran nicht zu zerstören, muss die Öffnung des Tim23-Kanals *in vivo* streng kontrolliert sein und nur den Durchtritt von Präproteinen erlauben. Es ist anzunehmen, dass es sich um einen sehr dynamischen Komplex handelt (Truscott *et al.*, 2001). Kürzlich wurde mit Tim50 ein weiteres Protein des TIM23-Komplexes identifiziert (Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003a; Yamamoto *et al.*, 2002). Diese Komponente spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Transfer von Präproteinen vom TOM-Komplex zum TIM23-Komplex durch den Intermembranraum.

Die integralen Membranproteine des TIM23-Komplexes werden durch Tim44 mit dem mitochondrialen Importmotor verbunden. Neben Tim44 sind das molekulare Chaperon

mitochondriales Hsp70 (mtHsp70) und dessen Nukleotidaustauschfaktor (Mge1) weitere Bestandteile des Importmotors (Horst *et al.*, 1993; Kronidou *et al.*, 1994; Maarse *et al.*, 1992; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994). Während diese Arbeit angefertigt wurde, wurde mit Tim14 ein weiteres Protein identifiziert, das als DnaJ-Homolog die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimuliert (D'Silva *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2003b; Truscott *et al.*, 2003). Bei Tim14 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das ATP-abhängig sowohl mit Tim44 als auch mtHsp70 interagiert. Tim14 weist die charakteristische Sekundärstruktur von J-Proteinen auf und besitzt das, für J-Proteine essentielle, HPD-Motiv in der Aminosäuresequenz. Die Deletion von Tim14 oder Mutationen im HPD-Motiv sind für die Hefe letal. Die Depletion von Tim14 führt zu Defekten im Import von Präproteinen, die abhängig vom Importmotor über den TIM23-Komplex importiert werden. Der Importmotor sorgt unter Verbrauch von ATP für die vollständige Translokation der Präproteine in die mitochondriale Matrix (Martin *et al.*, 1991; Schleyer *et al.*, 1982). Für die Arbeitsweise des mitochondrialen Importmotors sind zwei Modelle vorgeschlagen.

Im sogenannten *Brownian ratchet model* geht man von einer Brown'schen Molekularbewegung der zu translozierenden Polypeptidkette im Translokationskanal aus (Neupert *et al.*, 2002; Neupert *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1992) (siehe Abb. 3). Tim44 ist peripher am TIM23-Komplex assoziiert und in der Lage mtHsp70 in der ATP-Form (mtHsp70<sub>ATP</sub>) an den Translokationskanal auf der Matrixseite zu rekrutieren. Die Hydrolyse von ATP führt dann zur effektiven Bindung des mtHsp70 in der ADP-Form (mtHsp70<sub>ADP</sub>) an die zu translozierende, entfaltete Polypeptidkette. MtHsp70<sub>ADP</sub> löst sich von Tim44. Die Bindung von mtHsp70 an die Polypeptidkette verhindert das Zurückgleiten in den Translokationskanal aufgrund Brownscher Molekularbewegung und bewirkt eine gerichtete Bewegung in die mitochondriale Matrix. Das freie Tim44 ist in der Lage, neues mtHsp70<sub>ATP</sub> zu rekrutieren. Die Wiederholung dieses Zyklus führt zum effektiven Import des zu transportierenden Proteins (Neupert *et al.*, 2002).



**Abb. 3: Import von Präproteinen über den TIM23-Komplex nach dem „Brownian ratchet model“ (Paschen et al., 2001)**

- 1) Präproteine mit aminoterminaler Präsequenz werden durch den TOM-Komplex transloziert. Die Intermembrandomäne von Tim23 kann eine Rezeptorfunktion übernehmen. Mthsp70 ist in der ATP-Form an Tim44 gebunden.
- 2) Das Präprotein wird durch den TIM23-Komplex transloziert. Die Hydrolyse von ATP zu ADP führt zur effektiven Bindung von mHsp70 an die translozierende Polypeptidkette.
- 3) Mthsp70 in der ADP-Form dissoziiert von Tim44 ab. Aufgrund spontaner lokaler Entfaltung und Brownscher Molekularbewegung kann sich das Präprotein in die mitochondriale Matrix bewegen.
- 4) Hydrolyse eines weiteren ATP-Moleküls führt zur Bindung eines weiteren mHsp70 in der ADP-Form an die translozierende Polypeptidkette. Dies verhindert das Zurückgleiten in den Translokationskanal und ermöglicht einen gerichteten Import in die mitochondriale Matrix.

Das sogenannte *Pulling model* geht wie das *Brownian ratchet model* von einer Konformationsänderung des mHsp70 Moleküls durch die Hydrolyse von ATP aus. Dabei ist mHsp70 sowohl an Tim44 als auch die zu translozierende Polypeptidkette gebunden. Gemäß des *Pulling models* übt diese Konformationsänderung einen aktiven Zug auf die gebundene Polypeptidkette aus und führt zur Freisetzung von Tim44 (Glick, 1995; Glick et al., 1993;

Pfanner *et al.*, 1995). Das freie Tim44-Molekül steht dann für die Bindung eines weiteren mtHsp70<sub>ATP</sub>-Moleküls zur Verfügung. Interaktionen der translozierenden Polypeptidkette mit dem Translokationskanal sollen das Zurückgleiten in den Translokationskanal verhindern (Chauwin *et al.*, 1998; Dekker *et al.*, 1998). Mehrere solche Zyklen führen zum vollständigen Import des Präproteins.

Allerdings sprechen Importversuche mit Präproteinen, die immunglobulinartige Domänen des menschlichen Titinproteins enthalten, für das *Brownian-ratchet-model* (Moro *et al.*, 2002; Neupert *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002)(siehe Abb. 3). Dem *Pulling-model* zufolge kommt es durch das Ausüben einer Kraft, bewerkstelligt durch die Konformationsänderung von mtHsp70, zu der Entfaltung von Proteindomänen an der mitochondrialen Oberfläche. Erst diese Entfaltung und die gerichtete Kraft ermöglichen den Import in die mitochondriale Matrix. Die immunglobulinartigen Domänen von Titin sind allerdings sehr stabil gefaltet. Es würden Kräfte von 200 bis 300 pN benötigt, um eine solche Domäne zu entfalten. Es ist zwar nicht bekannt, welche Kraft durch die Konformationsänderung generiert werden könnte, jedoch können andere molekulare Motoren wie Myosin- und Kinesinmotoren nur etwa eine Kraft von 5 pN aufbringen. Auch die Hydrolyse eines ATP-Moleküls birgt die Energie von lediglich 14 pN. Die Ergebnisse favorisieren daher spontanes Entfalten des Präproteins und den Import aufgrund der Brownschen Molekularbewegung nach einem *ratchet*-Mechanismus.

#### 1.4.2.2 Der TIM22 Komplex und der TIM9/10/12-Komplex

Der TIM22-Komplex ist verantwortlich für den Import von Proteinen der inneren Membran, die mehrere Transmembransegmente und interne Signalsequenzen besitzen. Dazu gehören zum einen die Proteine der mitochondrialen Importmaschinerien Tim17, Tim22 und Tim23, zum anderen Proteine der mitochondrialen *Carrier*-Familie (MCF) (Endres *et al.*, 1999; Kaldi *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 1998a; Kübrich *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1996). Der TIM22-Komplex war zu Beginn der Arbeit nur in *S. cerevisiae* bekannt. In diesem Organismus besteht der Komplex aus den Komponenten Tim22, Tim54, Tim18, Tim12, Tim10 und Tim9 (Adam *et al.*, 1999; Kerscher *et al.*, 1997; Kerscher, 2000; Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Koehler *et al.*, 2000; Sirrenberg *et al.*, 1996; Sirrenberg *et al.*, 1998) (siehe Abb. 2). Die integralen Membranproteine Tim22, Tim54 und Tim18 interagieren mit einem heterohexameren Komplex aus Tim12, Tim10 und Tim9, der peripher an der Intermembranraumseite der Innenmembran assoziiert ist. Neben Tim12 befinden sich zwei Moleküle Tim10 und drei Moleküle Tim9 in diesem Subkomplex. Zusätzlich bilden Tim10

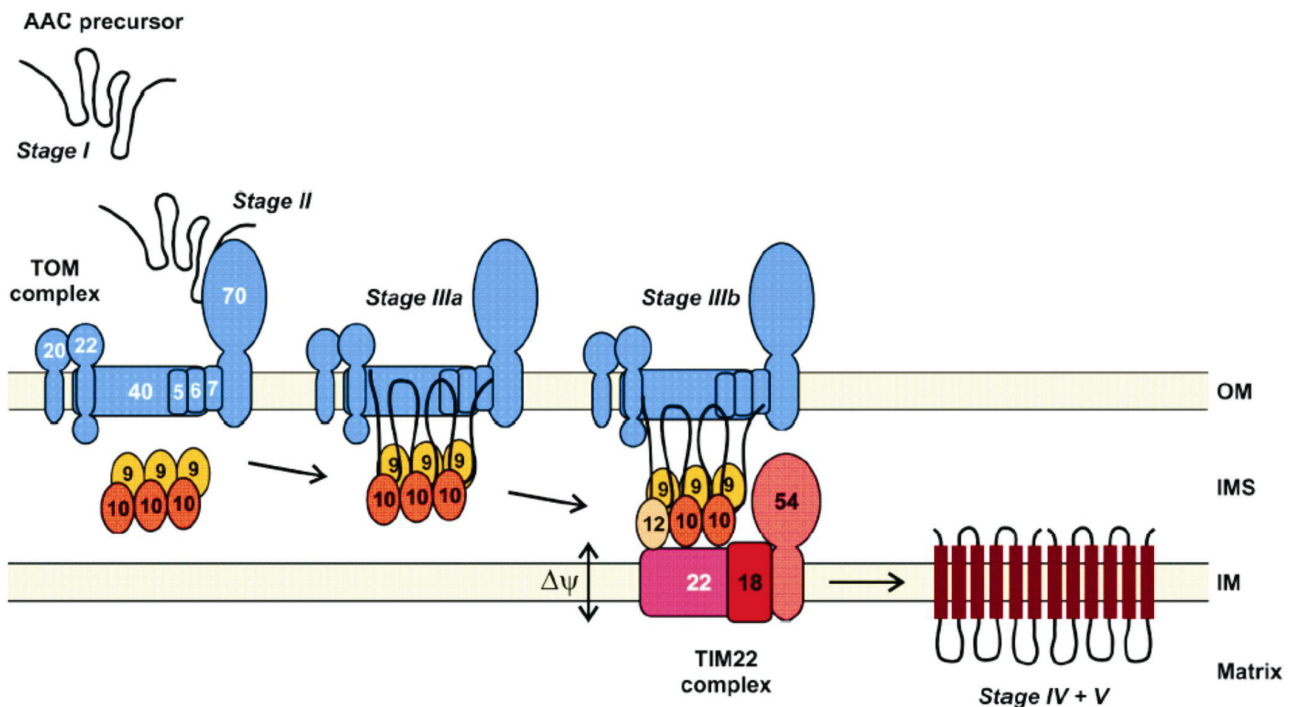


und Tim9 in äquimolaren Mengen einen löslichen heterohexameren Komplex von etwa 70 kDa im Intermembranraum, der an dem Import der Proteine der *Carrier*-Familie über den TIM22-Komplex beteiligt ist. Der ADP/ATP-*Carrier* ist das am besten untersuchte Substrat dieses Importweges.

Um die verschiedenen Schritte des Imports von AAC besser beschreiben zu können, wurde der Import in verschiedene Stufen gegliedert (Endres *et al.*, 1999; Pfanner *et al.*, 1987b; Ryan *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001) (siehe Abb. 4). Der im Zytosol synthetisierte AAC (Stufe I) wird zunächst von den Rezeptoren im TOM-Komplex erkannt (Stufe II). Nach partieller Translokation durch den TOM-Komplex interagiert der AAC mit dem TIM9/10-Komplex im Intermembranraum (Stufe IIIa) und wird dann auf den TIM9/10/12-Komplex übertragen, der mit dem TIM22-Komplex interagiert (Stufe IIIb). Ist Membranpotential vorhanden, erfolgt die Integration des *Carriers* über den TIM22-Komplex in die innere mitochondriale Membran (Stufe IV). Die Dimerisierung des *Carriers* in der Innenmembran bezeichnet man als Stufe V.

Tim22, die erste identifizierte Komponente des TIM22-Komplexes, weist Homologie zu den Komponenten Tim17 und Tim23 auf, und stellt die Hauptkomponente des Komplexes dar. Auch Tim22 besitzt vier Transmembranhelices und könnte ähnlich wie Tim23 die Fähigkeit besitzen, eine Pore zu bilden. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass der TIM22-Komplex von *S. cerevisiae* zwei Poren besitzt, die durch Tim22 gebildet werden (Kovermann *et al.*, 2002; Rehling *et al.*, 2004; Rehling *et al.*, 2003a). Die Insertion in die innere Membran wird in einem dreistufigen Prozess vermittelt, der sowohl durch das Membranpotential als auch durch interne Signalpeptide der Substrate reguliert wird.

Tim54 wurde zunächst in einem *two-hybrid-screen* als ein Protein gefunden, das potentiell mit dem Außenmembranprotein *mmm1* (*maintenance of mitochondrial morphology*) interagiert (Kerscher *et al.*, 1997). Die Lokalisation von Tim54 ergab, dass es sich um ein integrales Protein der inneren mitochondrialen Membran handelt. Experimente mit Mitochondrien der temperatursensitiven Mutante *tim54-1* zeigten reduzierte Importraten für AAC (Kerscher *et al.*, 1997). Dies wies auf die Beteiligung von Tim54 am Import mitochondrialer *Carrier*-Proteine hin. In der Tat wurde eine physikalische Interaktion von Tim54 mit Tim22 durch Koimmunfällung nachgewiesen (Kerscher *et al.*, 1997). Da die *tim54-1* Mutante reduzierte endogene Mengen an Tim22 und Tim54 zeigt, könnte Tim54 eine stabilisierende Funktion auf den TIM22-Komplex besitzen. Dafür spricht, dass die Überexpression von Tim22 den temperatursensitiven Phänotyp der *tim54-1* Mutanten rettet.



**Abb. 4: Insertion des ADP/ATP-Carriers in die innere mitochondriale Membran über den TIM22 Komplex (Paschen *et al.*, 2001)**

Stufe I: Das *Carrier*-Protein ist nach dessen Translation im Zytosol lokalisiert.

Stufe II: Der *Carrier* wird durch den Tom70-Rezeptor des TOM-Komplexes erkannt und gebunden.

Stufe IIIa: Der *Carrier* wird in die Translokationspore des TOM-Komplexes inseriert und ist bereits zum Teil transferiert. In den Intermembranraum exponierte Teile des *Carriers* werden durch den TIM9/10-Komplex gebunden.

Stufe IIIb: Der *Carrier* ist noch an den TOM-Komplex gebunden, wurde jedoch bereits an den TIM9/10/12 Komplex weitergereicht, der am TIM22-Komplex lokalisiert ist.

Stufe IV: Der *Carrier* löst sich vom TOM-Komplex und wird durch den TIM22-Komplex in die innere Membran inseriert.

Stufe V: Der *Carrier* assembliert in der inneren Membran zu funktionellen Dimeren

Mit Tim18 wurde nachfolgend eine weitere Komponente des TIM22-Komplexes identifiziert (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Strukturell ist Tim18 mit der Untereinheit IV der Succinatdehydrogenase verwandt. Tim18 ist ein integrales Membranprotein der inneren mitochondrialen Membran mit drei vorhergesagten Transmembrandomänen. Einerseits erwies sich Tim18 nach Überexpression als Suppressor der temperatursensitiven *tim54-1* Mutation, andererseits wurde Tim18 bei Immunfällungen des TIM22-Komplexes angereichert. Native Gelelektrophorese-Experimente bestätigten Tim18 als Bestandteil des TIM22-Komplexes. Darüberhinaus sprechen auch genetische Interaktionen für die funktionelle Zuordnung von Tim18 zum TIM22-Komplex. Tim18 ist zwar ein nicht essentielles Protein, dessen Deletion erwies sich aber bei Stämmen, die bereits eine temperatursensitive Mutation in *TIM54*, *TIM9*

oder *TIM10* aufwiesen, bereits unter permissiven Bedingungen als letal. Die Deletion von Tim18 führt zu einem verlangsamten Wachstum der Hefen bei 24°C. Dieser Wachstumsdefekt kann durch Überexpression von Tim22 gerettet werden. Tim18 scheint eine Rolle für die Stabilität des TIM22-Komplexes oder dessen Assemblierung zu spielen.

Die Komponenten Tim9, Tim10 und Tim12 im Intermembranraum stellen, wie Tim22, für das Wachstum der Hefe essentielle Proteine dar (Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Sirrenberg *et al.*, 1998). Der TIM9/10-Komplex im Intermembranraum fungiert möglicherweise als ein Chaperonsystem (Endres *et al.*, 1999; Pfanner *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2002). *Carrier*-Proteine, die teilweise über den TOM-Komplex transportiert wurden, werden vom TIM9/10-Komplex im Intermembranraum gebunden. Dadurch werden wahrscheinlich die hydrophoben Bereiche der integralen Membranproteine abgesättigt, um die Aggregation der Proteine im wässrigen Milieu des Intermembranraumes zu verhindern (Endres *et al.*, 1999). Die Komponente Tim12 des membranassoziierten TIM9/10/12-Komplexes vermittelt vermutlich die Assoziation mit den Membranbestandteilen des TIM22-Komplexes. Möglicherweise ist Tim12 an der Insertion des *Carrier*-Proteins in den putativen Tim22-Kanal beteiligt (Koehler *et al.*, 1998a; Sirrenberg *et al.*, 1998).

Den Proteinen Tim9, Tim10 und Tim12 gemeinsam sind vier konservierte Cysteine in der Aminosäuresequenz (Lister *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2003; Sirrenberg *et al.*, 1998). Mit rekombinanten Proteinen wurde gezeigt, dass die kleinen Tim-Proteine Zinkionen in äquimolaren Mengen binden. Zinkionen sind auch für den Import von *Carrier*-Proteinen in isolierten Mitochondrien notwendig. Es wurde vorgeschlagen, dass die kleinen Tim-Proteine eine „Zinkfinger“-ähnliche Struktur einnehmen, die es ihnen ermöglicht, die zu importierenden *Carrier*-Moleküle zu binden (Bauer *et al.*, 2000; Sirrenberg *et al.*, 1998). Allerdings deuten andere Ergebnisse darauf hin, dass die kleinen Tim-Proteine im Tim9/Tim10-Komplex intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Allen *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004a; Lu *et al.*, 2004b).

#### 1.4.2.3 Der TIM8/13-Komplex

Neben dem TIM9/10-Komplex findet man im Intermembranraum einen zweiten Komplex aus kleinen Tim-Proteinen, den TIM8/13 Komplex (Koehler *et al.*, 1999) (siehe Abb. 2). Tim8 und Tim13 zeigen hohe Homologie zu den kleinen Tim-Proteinen Tim9, Tim10 und Tim12. Wie diese haben Tim8 und Tim13 vier konservierte Cysteinreste. Diese sind in der Lage, Zink zu koordinieren, bilden aber möglicherweise auch Disulfidbrücken im Tim8/Tim13-Komplex

aus (Curran *et al.*, 2002b; Lutz *et al.*, 2003). Der TIM8/13-Komplex bildet einen heterohexameren Komplex aus drei Tim8- und drei Tim13-Molekülen. Im Gegensatz zu den anderen kleinen Tim-Molekülen sind die Komponenten Tim8 und Tim13 nicht essentiell für das Wachstum der Hefe. Bezüglich seiner Rolle beim Import unterscheidet sich der TIM8/13-Komplex vom TIM9/10-Komplex. Der TIM8/13-Komplex ist nicht am Import von *Carrier*-Proteinen, sondern am Import von Tim23 beteiligt (Davis *et al.*, 2000; Paschen *et al.*, 2000). Wenn der TIM8/13 Komplexes fehlt, wird Tim23 mit geringerer Effizienz, aber noch in ausreichender Menge, importiert. Der TIM9/10 Komplex scheint das Fehlen des TIM8/13-Komplexes zu kompensieren. Erst unter nicht optimalen Importbedingungen wird TIM8/13-Komplex benötigt. Bei niedrigem Membranpotential ist die Insertion von Tim23 in die innere mitochondriale Membran sehr ineffizient. Unter diesen Bedingungen verbessert der TIM8/13-Komplex die Insertion wesentlich (Davis *et al.*, 2000; Paschen *et al.*, 2000). Der TIM8/13-Komplex bindet bereits an das translozierende Tim23-Protein, wenn es noch im TOM-Komplex steckt. Dann hält er das Tim23 im Intermembranraum in einer transportkompetenten Form und unterstützt dessen Import in die Innenmembran (Rothbauer *et al.*, 2001).

Beim Menschen führen Mutationen im humanen Tim8 Homolog, hDDP1 (humanes *deathness dystonia peptide 1*) zu einer Erkrankung. Es handelt sich dabei um das Mohr-Traeneberg-Syndrom (MTS), einer neurodegenerativen Erkrankung, die mit Taubheit, Dystonie, kortikaler Blindheit, spastischen Lähmungen, Demenz und mentaler Retardierung einhergeht (Binder *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1999). Das MTS ist die einzige bekannte Krankheit, die auf einem Fehler im Proteinimportsystem in Mitochondrien beruht. Das hDDP1 bildet mit hTim13 einen 70 kDa großen Komplex, der in der Lage ist, den TIM8/13-Komplex in der Hefe funktionell zu ersetzen (Rothbauer *et al.*, 2001).

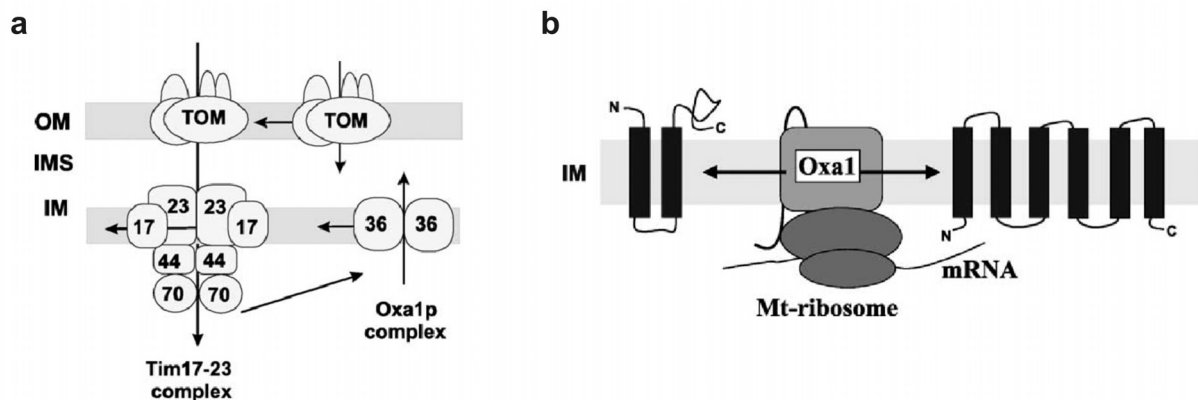
#### **1.4.4 Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran über Oxa1**

Oxa1 ist ein hoch konserviertes Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3 Proteinfamilie und besitzt Homologe sowohl im Reich der Prokaryoten als auch der Eukaryoten (Hamel *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 2003).

Oxa1 ist essentiell für Wachstum der Hefe auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Ohne Oxa1 assembliert die Cytochrom-Oxidase der Atmungskette nicht, und es gibt keine funktionelle Cytochrom-Oxidase (Bonney *et al.*, 1994; Hamel *et al.*, 1997). Desweiteren weisen die ATP-Synthase, die Ubiquinol-Cytochrom C Oxido-Reduktase und in *N. crassa* der Komplex 1 eine deutlich geringere Aktivität in Deletionsstämmen von Oxa1 auf (Altamura *et*

*al.*, 1996; Hamel *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1997). Diese Defekte beruhen auf einer fehlenden Sortierung von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in die mitochondriale Innenmembran. Insbesondere wird Oxa1 für den Export der N- und C-Termini der Cox2 Untereinheit des Cytochrom C Oxidase-Komplexes in den Intermembranraum benötigt. Fehlt funktionelles Oxa1, akkumuliert Cox2 in der Matrix, und es findet keine Translokation in den Intermembranraum statt (He *et al.*, 1996; Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2000).

Bei Oxa1 handelt es sich um ein eine kernkodierte Translokase der inneren mitochondrialen Membran, die für die Insertion mitochondrial kodierter und kernkodierter Proteine aus der mitochondrialen Matrix in die innere Membran verantwortlich ist (Herrmann *et al.*, 2004; Herrmann *et al.*, 1997; Szyrach *et al.*, 2003). Kernkodierte Substrate von Oxa1, wie z.B. Oxa1 selbst, werden zunächst über den TOM- und TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix importiert. In der Matrix wird die Präsequenz abgeschnitten, und das reife Protein wird vom OXA-Komplex in die mitochondriale Innenmembran inseriert (Stuart, 2002) (siehe Abb. 5). Mitochondrial kodierte Proteine werden kotranslational von dem OXA-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert (Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 2001) (siehe Abb. 5). Der C-Terminus von Oxa1 bildet hierbei eine  $\alpha$ -helicale Domäne, die in der Lage ist, direkt mitochondriale Ribosomen zu binden (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003).



**Abb. 5: Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran über den OXA1-Komplex (Stuart, 2002)**

Es gibt zwei Wege der Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran über den homooligomeren OXA1-Komplex. (a) Kernkodierte Proteine werden über den TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix importiert, durch MPP prozessiert und über den OXA1-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert. (b) Mitochondrial kodierte Proteine werden in der mitochondrialen Matrix translatiert. Oxa1 interagiert dabei mit der naszierenden Polypeptidkette und ist assoziiert mit mitochondrialen Ribosomen.

## **2. Fragestellung und Zielsetzung**

Zu Beginn der Arbeit waren zahlreiche Komponenten der Translokationskomplexe der mitochondrialen Innenmembran in *S. cerevisiae* identifiziert und charakterisiert. Allerdings war die Rekonstitution und die Aufklärung der Struktur der TIM-Komplexe noch nicht erreicht worden. Für derartige Versuche werden große Mengen der gereinigten Proteinkomplexe benötigt. Der Organismus *Neurospora crassa* kann in sehr großen Kulturen angezogen werden, und ermöglicht im Vergleich zu *S. cerevisiae* die Isolierung einer deutlich größeren Menge an Mitochondrien. Somit ist *N. crassa* für die Reinigung der TIM-Komplexe geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen für die strukturelle Analyse des TIM22-Komplexes und dessen funktionelle Untersuchung im rekonstituierten System geschaffen werden. Da zu Beginn der Arbeit das Genom dieses Organismus nicht sequenziert war, und die Translokationskomponenten der Innenmembran nicht bekannt waren, mussten die Komponenten des TIM22-Komplexes von *N. crassa* zunächst identifiziert werden. Die Proteine des TIM22-Komplexes sowie der TIM22-Komplex sollten charakterisiert werden, und die Reinigung dieses Komplexes sollte etabliert werden. Der gereinigte Komplex sollte in Lipidvesikel rekonstituiert werden, um ein definiertes System zur Untersuchung der Funktionsweise des TIM22-Komplexes zu gewinnen. Eine weitere Aufgabe bestand darin, parallel Komponenten der TIM23-Translokase in *N. crassa* zu identifizieren. Desweiteren sollte die Suche nach neuen Komponenten der TIM-Komplexe in *S. cerevisiae* vorangetrieben werden. Frühere Quervernetzungsexperimente ließen die Beteiligung bisher unbekannter Komponenten am mitochondrialen Importmotor vermuten. Gefundene Proteine waren bezüglich ihrer Lokalisation, Topologie und Interaktionspartner zu charakterisieren. Es sollte untersucht werden, ob diese Komponenten am Import von Proteinen in die Mitochondrien beteiligt sind und welche Funktionen sie in diesem Prozess übernehmen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Buchler, Braunschweig:	ECL Reagens für Westernblots, Taq-DNA-Polymerase, [ <sup>35</sup> S]-Methionin (1100-1400 Ci/mmol)
BioRad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege)
Biozym, Hameln:	SP6 Polymerase
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
Fluka, Buchs, CH:	Trichloressigsäure
Genomed, Bad Oeyenhausen:	„Jetstar“-Kit
Gerbu, Gaiberg	Acrylamid, Ampicillin
GIBCO-BRL, Karlsruhe:	Agarose (ultra rein, geringe Endosmose)
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Nestle-Alete, München:	Magermilchpulver
New England Biolabs, Schwalbach:	Restriktionsenzyme, Amylose-Säulenmaterial
GE-Bioscience, Freiburg:	7-Methyl-Guanosintriphosphat ( <sup>7</sup> mGpppG)
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Reticulozytenlysat, pGEM-Vektoren, TNT®-Lysat
Riedel de Haen, Seelze:	K-Acetat
Roche:	NTP, NADH, Proteinase K, DTT, Lysozym, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, dNTP, Oligomycin, Restriktionsenzyme, Tris
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulosemembran (0,2 mm), Faltenfilter, Filterpapier
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Siliconlösung, Spermidin, TEMED
Sigma ARK, Darmstadt:	Oligonukleotide
Metabion international AG, Planegg-Martinsried	Oligonukleotide
Sigma, München:	Ammoniumperoxodisulfat (APS), BSA (fettsäurefrei), Glycerin, β-Mercaptoethanol, Molekulargewichtstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A

Von der Firma Merck, Darmstadt, wurden alle übrigen Chemikalien als analysenreine Substanzen bezogen.

### 3.2 Geräte und sonstige Materialien

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Entwicklermaschine Gevomatic® 60
Amersham Pharmacia, Freiburg:	Spannungsgeräte, Laserdensitometer, Densitometer, Chromatographiesysteme wie Äkta Prime®
Appligene, Heidelberg:	Agarosegel-Imaging-System „The Imager™“
Beckman Instruments, München:	Kühlzentrifugen J2-21 und Avanti J-25, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich Rotoren und Zentrifugenröhrchen
Bender und Hobein, München:	Mixer zum Vortexen
Biometra, Göttingen:	TRIO-Thermoblock
BioRad, München:	Elektroporationsgerät Gene Pulser, <i>BioBeads</i> Adsorbens
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler
Eppendorf, Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße
Fuji:	Röntgenfilme, Phospho-Imager BAS-1500
Genser, Rothenburg:	Geltrockner Jet1
Heraeus Christ, Osterode:	Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Qiagen	Ni-NTA-Agarose, QiaQuick Gel Extraction Kit, Qiaquick PCR Purification Kit
JY HORIBA, Longjumeau, Frankreich:	Fluoreszenzphotometer SPEX FluoroMax
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat XR
Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada:	DNAMAN 4.1 (Molekularbiologische Software)
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
MWG-Biotech Ag, Ebersberg:	Primus 25 Personal Thermal Cycler System für PCR
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Semi-Dry-Blotkammern
Schleicher & Schüll, Dassel:	Whatman-3MM-Filterpapier
Schütt, Göttingen:	"Bioclav"-Autoklav
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-240 und UV-120-02
Sigma, München:	Tisch-Kühlzentrifugen
Werkstatt des Instituts, München:	Semidry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern



### 3.3 Verwendete Medien

Die angegebenen Medien wurden für die Zellzucht in Flüssigmedium verwendet. Zur Anzucht auf Platten wurden jeweils noch 2% (w/v) Bacto- Agar hinzugefügt. Bacto-Agar, Zucker und Medien wurden getrennt autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte erst, wenn das Medium auf etwa 50°C abgekühlt war.

#### 3.3.1.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;  
1% (w/v) NaCl

LB<sup>Amp</sup>-Medium: LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin

SOC-Medium: 2% (w/v) Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,058% (w/v) NaCl;  
0,019% (w/v) KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 20mM Glucose

#### 3.3.1.2 Medien für Hefe

5x SD: 4,35 g Yeast Nitrogen Base; 12,5 g Ammoniumsulfat;  
10% Glucose ad 500 ml H<sub>2</sub>O

SD-Medium: 0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und  
Ammoniumsulfat; 0,5% (w/v) Ammoniumsulfat; 0,02 mg/ml  
Adenin, 0,02 mg/ml Histidin, 0,03 mg/ml Leucin, 0,03 mg/ml  
Lysin, 0,02 mg/ml Tryptophan, 0,02 mg/ml Uracil  
(zur Selektion auf einen Auxotrophiemarker wurde die  
entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt);  
2% (w/v) Glukose bzw. 3% (w/v) Glyzerin bzw. 2% (w/v)  
Galaktose

YP-Medium: 1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Pepton, pH 5 mit HCl  
einstellen

YPD-Medium: YP-Medium mit 2% (w/v) Glukose

YPG-Medium: YP-Medium mit 3% (w/v) Glycerin

Laktatmedium: 3 g Hefeextrakt; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{NaCl}$ ; 1,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 ml 1% (w/v)  $\text{FeCl}_3$ ; 22 ml 90% (v/v) Milchsäure; ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 5,5 mit KOH einstellen

Sporulationsplatten: 1% (w/v) Kaliumacetat; 2% (w/v) Agarose

### 3.3.1.3 Medien für *N. crassa*

Spurenelementlösung: 5 g Citrat\* $\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  Anhydrit; 0,05 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 Tropfen Chloroform; ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Biotinlösung: 5 mg Biotin; ad 100 ml 50% (v/v) Ethanol

Vogel's Stammlösung: 300 g tri-Natriumcitrat  $\times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 500 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 200 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 20 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 g  $\text{CaCl}_2$  Anhydrit; 10 ml Spurenelementlösung; 10 ml Biotinlösung; 10 ml Chloroform; ad 1,5 l  $\text{H}_2\text{O}$

Vitamin-Stammlösung: 10 mg Thiamin; 5 mg Riboflavin; 5 mg Pyridoxin; 5 mg Aminobenzoessäure; 5 mg Nicotinamid; 100 mg Colin/HCl; 1 mg Folsäure; 100 mg Inositol; 50 mg Calciumpantothenat; ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

Minimal-Medium: 2% Vogel's Stammlösung; 2% (w/v) Glukose

Vollmedium: 2% Vogel's Stammlösung; 1% (w/v) Glycerin; 1% (w/v) Haushaltszucker; 1% Vitaminlösung; 0,25% (w/v) Hefeextrakt; 0,1% (w/v) Caseinhydrolysat

Mikrokonidienmedium:	0,5% (w/v) Saccharose; 0,1x SC-Stammlösung; 1 mM Iodoacetat; 2% (w/v) Agar
SC-Stammlösung:	1 g KNO <sub>3</sub> ; 0,7 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0,1 g CaCl <sub>2</sub> ; 0,1 g NaCl; 0,1 ml Biotinlösung, 15 g Saccharose, 0,1 ml Spurenelementlösung; ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 6,5
Sorbose-Platten:	2% Vogel's Stammlösung; 0,003% (w/v) Glukose; 1% (w/v) Sorbose; 2% (w/v) Agar
Sorbose <sup>Hyg</sup> -Platten:	Sorbose-Medium; 150 µg/ml Hygromycin

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Verwendete *E. coli* Stämme:

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZDM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene
MH1	MC1061 derivative; <i>araD139 lacX74 galU galK hsr hsm1 strA</i>	(Casadaban <i>et al.</i> , 1980)

#### 3.4.2 Verwendete Plasmide

Ausgangsplasmide für Klonierungen und als Matrize für PCR-Reaktionen	
pGEM4	Promega
pMal-cRI	Stratagene
pCB1179	(Sweigard, 1997)
pKS- <i>bar-cpcI</i> -	PD Dr. Martha Merrow
pVT-U-102	(Vernet <i>et al.</i> , 1987)
hDDP1 in pVT-trp	PD Dr. Matthias Bauer
pRS426	BioLabs
pQE30	Qiagen
pTL26	(Lafontaine <i>et al.</i> , 1996)
pFA-HIS3MX6	(Wach <i>et al.</i> , 1997)

Konstrukte in pGEM3 bzw. pGEM4 für Transkription / Translation	
pSu9(1-69)DHFR ( <i>Nc</i> )	(Pfanner <i>et al.</i> , 1987c)
AAC ( <i>Nc</i> )	(Pfanner <i>et al.</i> , 1987a)
pcytb <sub>2</sub> Δ19(167)DHFR ( <i>Sc</i> )	(Schneider <i>et al.</i> , 1994)
pcytb <sub>2</sub> Δ19 (167)DHFR <sub>K5</sub> ( <i>Sc</i> )	(Schneider <i>et al.</i> , 1994)
F1β ( <i>Nc</i> )	(Rassow <i>et al.</i> , 1990a)
CoxVa ( <i>Sc</i> )	(Gärtner <i>et al.</i> , 1995)
CoxVaΔ(26-89) ( <i>Sc</i> )	(Gärtner <i>et al.</i> , 1995)
Tim23 ( <i>Sc</i> )	(Berthold <i>et al.</i> , 1995)
CCHL ( <i>Sc</i> )	(Steiner <i>et al.</i> , 1995)
Tim16 ( <i>Sc</i> )	diese Arbeit
Tim22 ( <i>Nc</i> )	diese Arbeit
Tim54 ( <i>Nc</i> )	diese Arbeit
Tim54(1-58) ( <i>Nc</i> )	diese Arbeit
Tim54(1-93) ( <i>Nc</i> )	diese Arbeit
Konstrukte für Expression in <i>E. coli</i>	
Tim16 ( <i>Sc</i> ) in pQE30	diese Arbeit
Tim54 (75-295) ( <i>Nc</i> ) in pQE30	diese Arbeit
Tim22 (1 – 128) ( <i>Nc</i> ) in pMal-cRI	diese Arbeit
Hefeexpressionsplasmide	
Tim14 ( <i>Sc</i> ) in pVT-trp	diese Arbeit
Tim14mut ( <i>Sc</i> ) in pVT-trp	diese Arbeit
Tim16 ( <i>Sc</i> ) in pVT-U-102	diese Arbeit
Tim16 ( <i>Sc</i> ) in pVT-trp	diese Arbeit
Tim22 ( <i>Nc</i> ) in pRS426	diese Arbeit
Tim54 ( <i>Nc</i> ) in pRS426	diese Arbeit
Plasmide zur Expression Proteinen in <i>Neurospora crassa</i>	
His-Tim22 ( <i>Nc</i> ) in pKS-bar-cp1	diese Arbeit
Tim54-His ( <i>Nc</i> ) in pCB1179	diese Arbeit

### 3.4.3 Präparation von DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterienzellen und anschließender Fällung mit Ethanol (Birnboim *et al.*, 1979). Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden nach alkalischer Lyse der Zellen mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt.

#### 3.4.3.1.1 Plasmid-Mini-Präparation

400 µl einer Übernachtskultur wurden 30 sec bei 15000xg in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Lösung E1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde 400 µl Lösung E2 zugegeben. Dann wurde durch Kippen vorsichtig gemischt, um das Scheren der bakteriellen DNA zu verhindern. Anschließend wurde 400 µl Lösung E3 zum Neutralisieren des Ansatzes zugesetzt und wiederum vorsichtig gemischt. Durch Zentrifugation bei 4°C und 15000xg für 10 Minuten wurden ausgefällte Proteine und Zelltrümmer abgetrennt. Man überführte 850 µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß und versetzte ihn mit 650 µl Isopropanol, mischte wiederum durch Kippen, inkubierte 2 Minuten auf Eis und pelletierte die gefällte DNA durch Zentrifugation bei 4°C und 15000xg für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Durch Zugabe von 500 µl Ethanol und Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurde die DNA abermals präzipitiert und durch Zentrifugation wie zuvor pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl 20 mM Tris, pH 7,5 aufgenommen.

Lösung E1:	50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA
Lösung E2:	0,2 M NaOH; 1% SDS
Lösung E3:	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5 (einstellen mit 99% Essigsäure)
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

#### 3.4.3.1.2 Plasmid-Midi-Präparation

Größere Mengen Plasmid-DNA (bis zu 0,5 mg) wurde mit Hilfe des „Jetstar“ Kits (Genomed) isoliert. *E. coli*-Zellen aus 40 ml Übernachtskultur wurden bei 3000xg für 5 Minuten durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in 4 ml Lösung E1 (siehe 3.4.3.1.1) resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (siehe 3.4.3.1.1) und vorsichtiges Mischen wurden die Zellen lysiert. Nach Zusetzen von 4,4 ml Lösung E3 (siehe 3.4.3.1.1) und Mischen durch Kippen, wurden ausgefällte Proteine und genomische DNA durch Zentrifugation abgetrennt (15000xg, 10 Minuten). Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule geladen, die vorher mit 10 ml Lösung E4 äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Lösung E5 gewaschen und mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation pelletiert (13000xg,

30 Minuten, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 150 µl Wasser resuspendiert.

Lösung E4: 600 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat, pH 5  
 Lösung E5: 800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat, pH 5  
 Lösung E6: 1250 mM NaCl; 100mM Tris-HCl, pH 8,5

#### 3.4.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Neurospora crassa*

Genomische DNA aus *Neurospora crassa* wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Ethanolfällung präpariert (Lee *et al.*, 1988). Dazu wurden 0,5 bis 1 g Hyphen einer Übernachtskultur geerntet und in einen Mörser überführt. Durch Zusetzen von flüssigem Stickstoff wurden die Hyphen schockgefroren und konnten zu einem feinen Pulver zerrieben werden. Ein Eppendorfgefäß wurde mit den geriebenen Hyphen etwa zu 2/3 befüllt, mit 750 µl Lysepuffer versetzt und 1 h bei 65°C erhitzt. Dieser Ansatz wurde dann mit 700 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, kurz kräftig gemischt und 10 Minuten bei 12000xg zentrifugiert. Die wässrige klare Phase (oben) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt. Zur Phasentrennung wurde wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abermals abgenommen, mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt und die präzipitierte DNA 30 Sekunden in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet getrocknet, in 300 µl TER-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetat und 600 µl Ethanol (-20°C) nochmals präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau wurden 5-10 µl dieser Lösung eingesetzt.

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM EDTA;  
 1% (v/v) β-Mercaptoethanol; 3% (w/v) SDS;  
 0,1 mg/ml RNase A  
 TER-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase A

## 3.4.3.3 Amplifizieren von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

## 3.4.3.3.1 Verwendete Primer

Die Basenangaben für die degenerierten Primer erfolgten nach dem IUPAC-Code:

Neben den gebräuchlichen Abkürzungen A, G, T und C wurden folgende Abkürzungen verwendet:

M = A, C / R = A, G / W = A, T / S = C, G / Y = C, T / K = G, T / V = A, C, G / H = A, C, T / D = A, G, T / B = C, G, T / N = A, C, G, T

Degenerierte Primer zur Identifizierung von <i>NcTim44</i>	
Tim44-1	AAR TCI CAR GAR YTN CA
Tim44-2	AAR GCI TCC GAR WS
Tim44-3	YTC IGG IAC DAT RTA YTC
Tim44-4	GAR GCI TAY GTI AAR GGN GA
Tim44-5	TCG ACI CCI CKI ATR TCN ARR AT
Degenerierte Primer zur Identifizierung von <i>NcTim54</i>	
Tim54-3	CCC WSI MGI AAY TGG ATG ATH TT
Tim54-4.1	AGR AAI ACI GTN ARY TTN CG
Tim54-5	ATI CCR TCI CCN GGN GG
Tim54-6	ATI GGY TTN ACR TAY TC
Tim54-7	TAR TCI ARI GCN GCN GC
Degenerierte Primer zur Identifizierung von <i>NcTim22</i>	
Tim22-1	YTS ACI CCI GAR GAR
Tim22-2	GGG GTC ACC GGI TTY GSI YTR GGN GG
Tim22-3	WSI GCI AAR AAY TTY GG
Tim22-4.1	TTG TAG ATR TCI KTY TTN GCV CG
Tim22-4.2	TTG TAG ATR TCI KTY TTX GCY CT
Tim22-5	RAA RCC IGC NCC NCC
Tim22-7.1	TGT TST GCY AAR AAY TTT GG
Primer zur Identifizierung des Startmethionins von <i>NcTim54</i>	
Tim54-PS1:	GAA TGG CTT ATC GGC TTA TCG C
Tim54-PS2:	TCA CAG TAA GCT GCA TGC GCC
Tim54-PS3:	ACA CTT TAT ACC ATG GCC GAC C
Tim54-PS4:	ATG TTA CAC TTT GGC TCC TTC GC
Tim54-PS6:	TCC CAG TCC AAG CCA CTG GC

Primer zur Identifizierung des Startmethionins von <i>NcTim22</i>	
Tim22A:	CGC GGA TCC CTA GAC AAG ATG AAC TTC CCT
Tim22B:	CGC GGA TCC ATG GTT AGT AGT TAC CCT ACC
Tim22C:	CGC GGA TCC ATG GTG GCT ATG GTA GTC AAG G
Tim22D:	CGC GGA TCC ATG ATG CTA ACG AGA CGA CG
Tim22Ab2:	GGG AAG CTT TTA ATC ATT CTT CGC CCT CAA TCC
Primer für die Herstellung einer Sonde gegen <i>Tim22</i>	
Tim22C	CGC GGA TCC ATG GTG GCT ATG GTA GTC AAG G
Tim22Hind	GGG AAG CTT TTA GTCCTC CTC ACT AGG CAT

Die Primer Tim54-PS1 bis Tim54-PS4 und die Primer Tim22A bis Tim22D beinhalten die Sequenz potentieller Startcodons. Der Primer Tim54-PS6 sowie der Primer Tim22Ab2 sind revers orientiert und binden eine Sequenz im offenen Leserahmen für *tim54* bzw. *tim22*.

Um sie später auch für Klonierungen nutzen zu können, wurden die Primer Tim22A bis Tim22D mit einer *Bam*HI-Schnittstelle versehen, der Primer Tim22Ab2 beinhaltet eine *Hind*III Schnittstelle.

#### 3.4.3.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Man nutzt dabei die Eigenschaft von thermostabilen DNA-Polymerasen, beispielsweise aus *Thermus aquaticus*, einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufzufüllen, wenn ein kurzer doppelsträngiger Bereich mit freiem 3`OH-Ende zur Elongation zur Verfügung steht. Dieses freie 3`OH Ende wird in der PCR von Primern geliefert. Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide von ca. 20 Nukleotiden Länge, die an die Matrizensequenz binden.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion basiert auf 3 sich wiederholenden Schritten. Üblicherweise wurden 20 bis 30 Zyklen der drei folgenden Schritte durchgeführt.

Denaturierung (94°C, 1 Minute): Die ds-DNA-Matrize wird bei 94-96°C in Einzelstränge getrennt.

Annealing (45-65°C, 1 Minute): die Oligonukleotidprimer lagern sich an die Matrizensequenz an. Die Temperatur errechnet sich aufgrund der Zusammensetzung der verwendeten Primer nach folgender Richtlinie: 4°C pro G-C Basenpaarung + 2°C pro A-T Basenpaarung – 5°C





#### 3.4.3.3.3 Suche von *E. coli* Transformanden durch PCR

Um Transformanden auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids zu testen, bediente man sich der Polymerase-Kettenreaktion, da diese eine schnelle Überprüfung vieler Klone erlaubte. Dazu überführte man mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie transformierter Bakterien in 25 µl steriles Wasser. Von dieser Bakteriensuspension wird 1 µl in einen 15 µl PCR-Ansatz als Matrize eingesetzt. Als Primer verwendete man entweder die Primer, die für die Klonierung eines Konstruktes verwendet worden waren, oder die innerhalb des klonierten Fragmentes binden oder die ihr Template im verwendeten Plasmid finden. Idealerweise war es so möglich, Transformanden zu identifizieren, die das korrekte Plasmid mit dem gewünschten Insert enthielten. Um die *E. coli* Zellen effektiv zu öffnen, wurde bei der Durchführung der PCR-Reaktion der Schritt der Anfangsdenaturierung von 5 auf 10 Minuten verlängert. Die restliche Suspension positiver *E. coli* Transformanden wurde für das Beimpfen einer Übernachtskultur verwendet.

#### 3.4.3.3.4 Suche von *S. cerevisiae* Transformanden durch PCR

Ähnlich wie bei *E. coli* wurde nach Transformation von *S. cerevisiae* etwas Zellmaterial der gewachsenen Hefeklonen auf den Boden eines PCR-Gefäßes gepickt. Um die Zellwand zu öffnen, wurden die Zellen in 50 µl Zymolyase (20 U/ml in H<sub>2</sub>O) resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2300xg in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen 5 Minuten bei 94°C inkubiert. Die Pellets wurden in 25 µl PCR-Reaktionsmix mit geeigneten Primern resuspendiert und die PCR-Reaktion nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt (siehe 3.4.3.3.1).

### **3.4.4 Klonierung von DNA Fragmenten**

#### 3.4.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Zum Verdau von DNA wurden Restriktionsenzyme (2-3 U/µg DNA) der Firma New England Biolabs verwendet. Die Reaktionen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen bei 37° inkubiert. Plasmid-DNA wurde mindestens 1 Stunde, PCR-Produkte und genomische DNA mindestens 3 h verdaut. Die geschnittene DNA wurde zur weiteren Analyse oder Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.4.5).

## 3.4.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verknüpft zwei DNA-Fragmente. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz (10µl) mit Reagentien der Firma Gibco/BRL verwendet. 1µl Ligationspuffer, 1 U T4-DNA-Ligase, 50-200 ng linearisierte Vektor-DNA und Insert-DNA in 2-5 fachem molaren Überschuss gegenüber Vektor-DNA. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

10x Ligationspuffer            50 mM Tris-HCL, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5% (w/v) PEG-8000;  
1 mM DTT; 1 mM ATP

## 3.4.4.3 Klonierungsstrategien und TA-Klonierung von PCR-Produkten

Plasmid	Insert	Primer	Template	Restriktionsenzyme	Ausgeschnitten aus Plasmid
pGEM4	<i>TIM16</i> aus <i>Sc</i>	<b>BamMia1:</b> CCG GAT CCA TGG CTC ACA GGG CTT TCA TAC  <b>Mia1Pst:</b> GGG CTG CAG CTA CTG ATT GCT GCT TGC AC	<i>Sc</i> genom. DNA	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	/
pGEM4	<i>tim22</i> aus <i>Nc</i>	<b>EcoTim22Start:</b> AAA GAA TTC AAC ATG AAC TTC CCT GGT ATG CCT GG  <b>Tim22Hind:</b> GGG AAG CTT TTA GTC CTC CTC ACT AGG CAT	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	/
pGEM4	<i>tim54</i> aus <i>Nc</i>	<b>EcoTim54Start:</b> AAA GAA TTC ACA CTT TAC ACC ATG GCC GAC C  <b>Tim54-Stop/HIII:</b> GGG GAA GCT TTT ATT CAA CAT CCT TAT CCT CC	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	/

Plasmid	Insert	Primer	Template	Restriktionsenzyme	Ausgeschnitten aus Plasmid
pGEM4	<i>tim54</i> (1-174) aus <i>Nc</i>	<b>EcoTim54:</b> AAA GAA TTC ATG GCC GAC CCA GTA CCC CC  <b>T54preBam:</b> AAA GGA TCC ATT TCG GGA GGG GAG CTT	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	/
pGEM4	<i>tim54</i> (1-537) aus <i>Nc</i>	<b>EcoTim54:</b> AAA GAA TTC ATG GCC GAC CCA GTA CCC CC  <b>T54TM-Bam:</b> AAA GGA TCC GTG CTC GAC GGC GTG TCT CC	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	/
pQE30	<i>TIM16</i> aus <i>Sc</i>	/	/	<i>BamHI</i> / <i>PstI</i>	<i>TIM16</i> in pGEM4
pQE30	<i>tim54</i> (75-885) aus <i>Nc</i>	<b>BamHI-T54:</b> AAA GGA TCC GAC CGC CGC GAG AAG AGG CG  <b>T54-Stop HIII:</b> GGG GAA GCT TTC AAG TTC CTG TGG CGT CAG GGG	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>BamHI</i> / <i>HindIII</i>	/
pMalcRI	<i>tim22</i> (1-384) aus <i>Nc</i>	<b>Tim22A:</b> CGC GGA TCC CTA GAC AAG ATG AAC TTC CCT G  <b>Tim22Ab2:</b> GGG AAG CTT TTA ATC ATT CTT CGC CCT CAA TCC	$\lambda$ -ZAP2- cDNA von <i>Nc</i>	<i>BamHI</i> / <i>HindIII</i>	/
pVT-U-102	<i>TIM16</i> aus <i>Sc</i>	/	/	<i>BamHI</i> / <i>PstI</i>	<i>TIM16</i> in pGEM4
pVT-trp	<i>TIM16</i> aus <i>Sc</i>	/	/	<i>BamHI</i> / <i>PvuII</i>	<i>TIM16</i> in pVT-U-102

Plasmid	Insert	Primer	Template	Restriktionsenzyme	Ausgeschnitten aus Plasmid
pVT-trp	<i>TIM14</i> aus <i>Sc</i>	/	/	<i>Bam</i> HI / <i>Pvu</i> II	<i>TIM14</i> in pVT-U-102 (Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
pVT-trp	<i>TIM 14<sub>mut</sub></i> aus <i>Sc</i>	/	/	<i>Bam</i> HI / <i>Pvu</i> II	<i>TIM14</i> in pVT-U-102 (Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
pRS426	<i>tim22</i> aus <i>Nc</i>	<b>EcoT22Start:</b> AAA GAA TTC AAC ATG AAC TCC CCT GGT ATG CCT GG  <b>T22StopBamHI:</b> CCG GAT CCC CTT AGT CCT CCT CAC TAG GCA TCC	$\lambda$ -ZAP2-cDNA von <i>Nc</i>	<i>Eco</i> RI / <i>Bam</i> HI	/
pRS426	<i>tim54</i> aus <i>Nc</i>	/		<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>tim54</i> in pGEM4
pKS-bar-cpcl	<i>tim22</i> aus <i>Nc</i>	<b>EcoT22StartHis:</b> AAA GAA TTC AAC ATG CAC CAC CAT CAC CAC CAT CAC CAC CAT AAC TTC CCT GGT ATG CCT GG  <b>T22-5'Xho:</b> CCG CTC GAG CCC CGA AAT GCT AGG GGA GC	<i>Nc</i> genom. DNA	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I	/
pCB1179	<i>tim54</i> + 3' und 5' flankierende Sequenzen	<b>EcoRI-T54P:</b> CCG GAA TTC GCG CCA TGG ACA CCG CAT CTT CC  <b>T54-His/XbaI:</b> GCT CTA GAT TAG TGA TGG TGA TGG TGG TGA TGG TGT TCA ACA TCC TTA TCC TCC AAA GG  <b>ClaI-T54D1:</b> TTA TCG ATG GCT AGG TGT TAG CGG TTG C  <b>T54D2-EcoRI:</b> AAA GAA TTC CAT GAA ATG AGC CAC CTG CG	<i>Nc</i> genom. DNA	<i>Eco</i> RI / <i>Xba</i> I  <i>Eco</i> RI / <i>Cla</i> I	/

PCR-Produkte, die mit degenerierten Primern gewonnen worden waren, und die keine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme enthielten, wurden in das kommerziell verfügbaren Plasmid pCRII-Topo (Invitrogen) kloniert, das an den 3'-Enden ungepaarte

T-Überhänge trug. Da die *Taq*-Polymerase an den 5'-Enden häufig einzelsträngige A-Überhänge generiert, konnten diese PCR-Produkte direkt in das Plasmid eingesetzt werden. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben 5 – 60 Minuten bei Raumtemperatur.

#### 3.4.4.4 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit 5 ml *E. coli* Übernachtskultur wurden 500 ml LB-Medium (siehe 3.3.1.1) angeimpft und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4400xg, 5 Minuten, 2°C) geerntet und das Zellpellet zunächst mit 500 ml, dann 250 ml und schließlich 50 ml 10% Glycerol (v/v) gewaschen. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.4.4.5 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

40 µl kompetente *E. coli* Zellen wurden mit 1 µl Ligationsansatz gemischt und 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Dadurch wurde die Bindung der DNA an die Bakterienoberfläche gewährleistet. Die Bakteriensuspension wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, dann wurde die Transformation in einem Elektroporationsgerät durchgeführt (Einstellungen: 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms). Der Ansatz wurde sofort mit 500 µl LB-Medium (siehe 3.3.1.1) oder SOC-Medium (siehe 3.3.1.1) versetzt und 30 – 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden durch kurze Zentrifugation pelletiert und das Medium bis auf ca. 100 µl abgenommen. Im verbleibenden Medium wurden die Zellen resuspendiert und auf LB<sup>Amp</sup>-Platten (siehe 3.3.1.1) ausplattiert.

#### 3.4.4.6 Blau-Weiß-Selektion

Bei der Blau-Weiß Selektion von Bakterien nutzt man die Möglichkeit aus zwei inaktiven Proteinfragmenten ein aktives Enzym wieder herzustellen. Bei Plasmiden, deren multiple Klonierungsstelle im lacZ Gen liegt, wird bei Subklonierung eines DNA-Fragments die kodierende Sequenz des lacZ-Gens unterbrochen. Ein Beispiel dafür ist das verwendete Plasmid pCRII-Topo (Invitrogen). Seine Klonierungsstelle liegt im  $\alpha$ -Fragment des lacZ-Gens der  $\beta$ -Galaktosidase, das für die ersten 146 Aminosäuren kodiert. Dieses Peptid ist enzymatisch inaktiv. Bakterien mit der Deletion  $\Delta$ M15 exprimieren ebenfalls ein inaktives Fragment des Enzyms, dem die Aminosäuren 11-41 fehlen. Durch Transformation des Plasmids mit dem  $\alpha$ -Fragment in Bakterien mit der Deletion kann die aktive  $\beta$ -Galaktosidase rekonstituiert werden. Die rekonstituierte  $\beta$ -Galactosidase wandelt das farblose Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indeolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo um. Bakterienklone, die mit einem derartigen Plasmid mit Insertion eines DNA-Fragments in die multiple Klonierungsstelle transformiert wurden, bilden weiße Kolonien. In diesem Fall wurde die die kodierende Sequenz des  $\alpha$ -Fragments unterbrochen, und es kann kein aktives Enzym gebildet werden. Blaue Kolonien dagegen enthalten keine Fremd-DNA in der Klonierungsstelle des Vektors. Der verwendete Bakterienstamm TOP10F' überexprimiert den lac-Repressor, IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) muss zur Expression des  $\alpha$ -Fragments zugesetzt werden.

Die durch Elektroporation transformierten TOP10F' *E. coli*-Zellen wurden auf LB<sup>Amp</sup>-Platten (siehe 3.3.1.1) ausplattiert, auf die man vorher 40  $\mu$ l 40 mg/ml X-Gal und 40  $\mu$ l 100 mM IPTG aufgebracht hat. Durch die Blau-Weiß-Selektion kann man zwischen Bakterien mit und ohne Insertion von DNA im Plasmid unterscheiden.

#### 3.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in einem horizontalen Gelsystem nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Entsprechend der Größe der nachzuweisenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 bis 2 % (w/v) hergestellt. Zur Herstellung der Gele und als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und bei einer Feldstärke von bis zu 13 V/cm elektrophoretisch getrennt. Um die DNA auf einem UV-

Transilluminator sichtbar zu machen, wurde die Agaroselösung vor der Herstellung des Gels mit Ethidiumbromid zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml versetzt.

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 20 mM Na-Acetat ; 1 mM EDTA

DNA-Auftragspuffer: 0,2 M Tris, pH 7,5; 5 mM EDTA; 15% Ficoll 400 (w/v);  
0,05% Bromphenolblau (w/v) ; 0,05% Xylenxyolanol (w/v) ;  
0,5% SDS (w/v)

### 3.4.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdau, die in Klonierungen eingesetzt werden sollen, wurden zur Abtrennung von unerwünschten DNA-Fragmenten einer Gelelektrophorese unterworfen. Das gewünschte DNA-Fragment kann auf dem UV-Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mithilfe des Gelextraktionskits der Firma Qiagen mittels Anionenaustauschchromatographie. Die Extraktion wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.4.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Darauf basierend kann die Konzentration von DNA in wässriger Lösung photometrisch bestimmt werden. Die Extinktion verschiedener Verdünnungen einer DNA-Probe in Wasser wurden in einer Quarzküvette gegen Wasser als Nullwert gemessen. Die gemessenen Werte sollten in einem Bereich zwischen 0,1 und 1 OD liegen, da nur dann ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Extinktion und Nucleinsäurekonzentration gewährleistet ist. Die Berechnung der Nucleinsäurekonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:  $c = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon / d^{-1}$

$c$  = Nucleinsäurekonzentration

$OD_{260}$  = Extinktion bei 260nm

$d$  = Schichtdicke (bei der verwendeten Quarzküvette  $d=1$ )

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient



Die Werte für den Extinktionskoeffizient hängen von der Art der Nukleinsäure ab.

ds DNA	c=50 µg/ml
RNA	c=40 µg/ml
ss DNA	c=30 µg/ml
Oligonukleotide	c=20 µg/ml

### **3.4.8 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels Hybridisierungs sonden (Southernblot)**

Diese Methode dient dem Nachweis spezifischer DNA-Fragmente in einem komplexen DNA-Gemisch mit Hilfe von Sonden, die spezifisch gegen bestimmte DNA-Bereiche gerichtet sind. Genomische DNA wurde mit ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut und das Fragmentgemisch durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für den Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran wurde das Gel zunächst 10 Minuten in 0,25% (v/v) HCl inkubiert. Dies führt zu partieller Depurinierung der DNA-Fragmente und zu Strang-Brüchen, was den Transfer erleichtert. Anschließend wurde das Gel zweimal zwanzig Minuten in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH inkubiert. Durch diesen Denaturierungsschritt wird Einzelstrang-DNA erzeugt. Da die Effizienz des Bindens an die Nylonmembran bei pH Werten >9 weniger effizient ist, wurde nach dem Denaturierungsschritt das Gel zweimal zwanzig Minuten in 1,5 M NaCl, 1 M Tris, pH 8 inkubiert.

Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte dann mittels Kapillarblot. Das Agarosegel wird auf eine Unterlage gelegt, die über ein feuchtes Filterpapier Verbindung zu einem Reservoir an 2x SSC-Puffer hat. Auf das Gel wurde eine Nylonmembran und mehrere Schichten Papierhandtücher aufgelegt und durch ein Gewicht beschwert. Durch Kapillarkräfte wurde der Puffer durch das Gel in die Papierhandtücher gesaugt, und die DNA dadurch auf die Nylonmembran transferiert. Nach 16 h bis 20 h Transfer wurde die DNA auf der Membran durch Erhitzen für 2h auf 80°C fixiert. Der Nachweis erfolgte dann durch DNA-Hybridisierung (siehe 3.4.8.3).

20xSSC: 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl

### 3.4.8.1 Lyse einzelner *E. coli* Kolonien und Fixierung der DNA auf Nitrozellulose

Für die Analyse von Cosmid-DNA Banken wurde die Technik der Koloniehybridisierung verwendet. Dazu werden Klone der pMOcosX Cosmid-DNA-Bank auf LB<sup>Amp</sup>-Platten gestempelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden durch zweiminütiges Auflegen einer Nylonmembran auf diese übertragen. Zur Lyse der *E. coli*-Zellen wurde die Membran 2x 5 Minuten mit Lösung 1 und anschließend zur Neutralisation zweimal für 5 Minuten mit Lösung 2 inkubiert. Danach folgte eine Inkubation für 5 Minuten mit 2x SSC. Um das Abschwemmen der Kolonien von der Nylonmembran zu verhindern, wurde die Membran auf ein Filterpapier gelegt, das mit der entsprechenden Lösung getränkt war. Die DNA wurde durch zweistündiges Erhitzen der Membran auf 80°C fixiert, der Nachweis erfolgte durch DNA-Hybridisierung.

Lösung 1:	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Lösung 2:	1 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl
20xSSC:	300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl

### 3.4.8.2 Herstellen einer digoxigeninmarkierten Sonde

Zunächst wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion über den Bereich durchgeführt, der von der Sonde erkannt werden sollte. Die spezifische Bande des gewünschten Amplifikats wurde mit einer gelben Spitze im Agarosegel angestochen und eine geringe Menge als Template in einen weiteren PCR-Reaktionsansatz (100 µl) überführt, der digoxigeningekoppeltes dUTP enthielt (Dig Luminescent Detection Kit, Roche). Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde durch paralleles Auftragen markierten und unmarkierten PCR-Produkts getestet. Die markierten Amplifikate bewegten sich aufgrund des eingebauten Dig-11-dUTPs langsamer durch ein Agarosegel.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 100 µl markiertes PCR-Produkt in 50 ml Hybridisierungspuffer verdünnt, 10 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt, um Doppelstränge der DNA zu denaturieren. Zur Erstellung der Sonden gerichtet gegen *tim44* bzw. *tim54* aus *N. crassa* wurden die degenerierten Primer verwendet, die zur Identifizierung des entsprechenden Gens geführt hatten. Für die Sonde gegen *tim22* aus *N. crassa* verwendete man Primer, die im ersten Intron und am Ende des Gens binden konnten.

20xSSC:	300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl
Hybridisierungspuffer:	7% (w/v) SDS; 50% (v/v) Formamid; 5x SSC; 2% (w/v) Blockreagenz der Firma Roche aus 10% Stammlösung
Blockreagenz: (10% Stammlösung)	10% (w/v) Blockreagenz; 100 mM Maleinsäure; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0; 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin

### 3.4.8.3 Nachweis von Genfragmenten durch DNA-Hybridisierung (Engler-Blum *et al.*, 1993)

Die Membran wurde zunächst 2 h bei 39°C in Hybridisierungspuffer (siehe 3.4.8.2) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Hybridisierung der digoxigeninmarkierten Sonde ebenfalls bei 39°C über Nacht. Als nächstes wurde die Membran zweimal mit 2x Waschpuffer bei Raumtemperatur und dann zweimal bei 68°C mit 0,5x Waschpuffer gewaschen. Der Nachweis der Sonde erfolgte durch die Immundetektion von Digoxigenin. Dazu wurde die Membran 30 Minuten in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine abzusättigen. Dann wurde sie weitere 30 Minuten mit Anti-Digoxigeninlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Membran mit CSPD\*-Detektionspuffer benetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Exposition eines Röntgenfilms konnten die Digoxigenin markierten Banden detektiert werden.

20xSSC:	300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl
2x Waschpuffer:	2x SSC; 0,1% (w/v) SDS
Blockpuffer, pH7,5:	1% (w/v) Blockreagenz der Firma Roche; 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl
Anti-Digoxigeninlösung:	$\alpha$ -Digoxigeninlösung 1:10000 in Blockpuffer
CSPD*-Detektionspuffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl

#### 3.4.8.4 Durchsuchen einer $\lambda$ -Zap2-Phagen-cDNA-Bank

Für die Identifizierung von cDNA-Sequenzen in *Neurospora crassa* noch nicht bekannter Tim-Komponenten wurden cDNA-Banken verwendet, die im Bakteriophagen *lambda* ( $\lambda$ )-Zap2 generiert worden war. Ein Teil des Phagengenoms enthält die DNA-Sequenz des Plasmids pBluescript SK<sup>-</sup>, in dessen multiple Klonierungsstelle Inserts eingebaut sind, die die gesamte cDNA von *Neurospora crassa* repräsentieren. Somit handelt es sich hierbei um ein zusammengesetztes Vektorsystem aus pBluescript SK<sup>-</sup> und dem Bakteriophagen  $\lambda$  und vereint die Vorteile eines Plasmids mit denen eines Bacteriophagen. Mithilfe eines Helferphagen kann der Bacteriophage in das Plasmid pBluescript SK<sup>-</sup> umgewandelt werden.  $\lambda$ -Zap2 ist in der Lage *E. coli* XLI-Blue zu infizieren und dessen Proteinsyntheseapparat zur eigenen Synthese zu benutzen. Auf diese Weise kann sich der Phage vermehren und weitere benachbarte *E. coli*-Zellen infizieren. So entstehen Plaques auf einem Bakterienrasen, die auf einen Phagenklon zurückzuführen sind. Die verwendete Phagen-cDNA-Bank wurde von Professor Frank Nargang (Edmonton, Kanada) unter Verwendung des Uni-Zap-XR-Systems (Stratagene) hergestellt, und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

##### 3.4.8.4.1 Infektion, Anzucht und Isolieren von $\lambda$ -Zap2 Phagen (Sambrook, 1989)

Für die Infektion mit  $\lambda$ -Zap2 Phagen wurde eine Kolonie *E. coli* XLI-Blue in 100 ml LB-Medium (siehe 3.3.1.1) angeimpft, das mit 0,2% Maltose und 10 mg/l Tetracyclin versetzt worden war. Die Maltose erleichtert die Infektion der Bakterien mit den Phagen. Diese Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation (5 Minuten, 3000xg, Raumtemperatur) geerntet und in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 2 eingestellt. 90  $\mu$ l dieser Bakterienkultur wurden mit 10  $\mu$ l der  $\lambda$ -Zap2-Bibliothek gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Phagen/Zellsuspension mit 3 ml Topagar gemischt, den man auf 50°C temperiert hatte. Dieses Gemisch brachte man auf eine auf 37°C temperierte NZY-Agarplatte mit 10 mg/l Tetracyclin auf, und inkubierte über Nacht bei 37°C. Es war deutliche Plaquebildung auf dem Bakterienrasen erkennbar. Die Identifizierung positiver Plaques erfolgte durch Transfer der Plaques auf eine Nylonmembran (*Phage lift*) und DNA-Hybridisierung.

Plaques, die ein positives Signal lieferten, wurden aus dem Agar ausgeschnitten, in 100  $\mu$ l SM-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C gelagert, um die Phagen in die Lösung diffundieren zu lassen.

Da die Phagenplaques dicht nebeneinander gelegen waren, wurden die so gewonnen Phagen noch einmal für die Infektion von *E.coli* XL1-Blue-Zellen verwendet. Die Wiederholung des *Screenings*schrittes gewährleistet die Isolation eines Phagenklones, der nur auf einen Ursprungshagen zurückzuführen ist.

NZY-Agar:	1 % NaCl; 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt
Top-Agar:	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 2 % Agar; 0,7 % Agarose
SM-Puffer:	100 mM NaCl; 2 % MgSO <sub>4</sub> ; 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 0,0025 % Gelatine

#### 3.4.8.4.2 Umwandeln von Phagen in pBluescript SK<sup>-</sup>

Zur Umwandlung des Phagen in pBluescript SK<sup>-</sup>, wird ein Helferphage benötigt. Zu 200 µl ein *E. coli* XL-1-Blue Suspension einer OD<sub>600</sub> von 1 wurden 100 µl isolierte Phagensuspension und 1 µl der Suspension des Helferphagen R 408 (Stratagene) zugesetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in 5 ml 2-fach konzentriertes LB-Medium (siehe 3.3.1.1) überführt. Dieser Ansatz wurde zur Synthese und Freisetzung von Einzelstrangphagen 4 bis 6 Stunden bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml des Infektionsansatzes wurden für 20 Minuten auf 70°C erhitzt, um die Bakterien abzutöten. Durch anschließende Zentrifugation für 5 Minuten in der Tischzentrifuge wurden die abgetöteten Bakterien pelletiert. Der Überstand, der Einzelstrangphagen enthält, wird erneut für die Infektion von *E. coli*-XL1-Blue Zellen verwendet. Dazu wurden 200 µl *E. coli*-XL1-Blue Zellen der OD<sub>600</sub> von 1 mit verschiedenen Verdünnungen des Überstandes gemischt und 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die infizierten Bakterien auf LB<sup>Amp</sup>-Agarplatten ausplattiert. Kolonien, die nach Inkubation bei 37°C über Nacht gewachsen waren, enthielten das, aus dem Phagen herausgelöste Plasmid pBluescript SK<sup>-</sup>, einschließlich des gesuchten Inserts.

### 3.5 Genetische Methoden

#### 3.5.1 Methoden der Hefegenetik

##### 3.5.1.1 Verwendete Hefestämme

YPH500	(Sikorski <i>et al.</i> , 1989)
YPH501	(Sikorski <i>et al.</i> , 1989)
W334	(Hovland <i>et al.</i> , 1989)
BY4743	Euroscarf
<i>TIM22/tim22::HIS3</i>	Euroscarf
<i>TIM54/tim54::HIS3</i>	Euroscarf
<i>TIM16/tim16::HIS3</i>	diese Arbeit
GAL-TIM14	(Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
GAL-HisTim14	(Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
GAL-Tim16	diese Arbeit
GAL-Tim22	(Sirrenberg <i>et al.</i> , 1996)
GAL-Tim44	(Milisav <i>et al.</i> , 2001)
GAL-Tim17	(Milisav <i>et al.</i> , 2001)
Tim44His	(Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
mtHsp70-His	(Kronidou <i>et al.</i> , 1994)
GAL-ScTIM22 / <i>Nctim22</i>	diese Arbeit
<i>TIM22/tim22::HIS3</i> – <i>Nctim22</i>	diese Arbeit

##### 3.5.1.2 Kultur von Hefezellen

Die Anzucht von Hefezellen erfolgte standardgemäß nach Sambrook *et al.* entweder auf YP-Vollmedien (siehe 3.3.1.2) oder auf SD-Medien, falls eine Selektion auf Auxotrophiemarker erforderlich war (siehe 3.3.1.2). Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Hefen unter respiratorischen Bedingungen auf Laktatmedium (siehe 3.3.1.2) kultiviert. Als Kohlenstoffquellen dienten entweder 0,1% (w/v) Glukose oder 1% Galaktose, die den jeweiligen Medien zugesetzt wurden. Die Anzucht erfolgte bei 30°C. Die Kultivierung in flüssigen Medien erfolgte unter Schütteln (120-160 rpm) in Erlenmeyerkolben.

Um den Wachstumsdefekt bei Depletion von Tim22 und die positive Beeinflussung des Wachstumsphänotyps bei Expression von *NcTim22* zu zeigen, wurden Verdünnungsreihen verschiedener Kulturen auf Agarplatten aufgetropft. Die Stämme wurden hierzu in der logarithmischen Wachstumsphase in Flüssigmedium gehalten. 0,5 OD-Einheiten jeder Kultur wurden isoliert und in 500 µl Wasser resuspendiert. Diese Kulturen wurden anschließend

fünfmal je 1:10 mit Wasser verdünnt und von jeder Kultur 3 µl auf die Platte aufgetropft. Die Ergebnisse konnten nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C ausgewertet werden.

### 3.5.1.3 Transformation Lithiumacetat-konditionierter Hefezellen (Gietz *et al.*, 1992)

Eine Kultur von Hefezellen (50 ml) wurde in YP- oder SD-Medium mit 0,1% Glukose oder 1% Galaktose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000xg, 5 Minuten, RT) geerntet, mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Hefezellen erneut durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (15000xg, 30 sec, RT) geerntet, in 500 µl 100 mM LiAc resuspendiert, zu 50 µl portioniert und erneut reisoliert. Das Zellpellet wurde mit dem Transformationsansatz, bestehend aus 50% (w/v) PEG 3350, 36 µl 1 M LiAc und 25 µl einzelsträngige, denaturierte DNA (2 mg/ml), in dieser Reihenfolge überschichtet. Die einzelsträngige DNA wurde unmittelbar vor der Zugabe für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort schnell auf 4°C abgekühlt. Zu dem Transformationsansatz wurde 1-5 µg des Plasmids bzw. des PCR-Fragmentes zugesetzt, der Ansatz durch starkes Schütteln gemischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 20 Minuten bei 42°C wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation geerntet, in 200 µl Wasser aufgenommen und auf SD-Agarplatten (siehe 3.3.1.2) ausplattiert.

### 3.5.1.4 Generierte Hefestämme

#### 3.5.1.4.1 Generieren eines haploiden Hefestammes mit Tim16 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors

Der haploide Hefestamm mit *TIM16* unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors wurde durch homologe Rekombination eines PCR-Produkts generiert (Lafontaine *et al.*, 1996). Das Amplifikat wurde durch Verwendung der Primer MIA-downfor-100 und MIA-downrevmut-0 mit dem Plasmid pTL26 als Matrize generiert und besteht aus dem Auxotrophiemarker *HIS3* aus *S. pombe*, dem *GAL10*-Promotor und homologen Sequenzen im Bereich des *TIM16* Promotors. Das PCR-Produkt wurde in den Hefestamm YPH500 transformiert und positive Klone auf Medium ohne Histidin selektioniert. Die gewonnen Klone wurden mittels PCR überprüft.

MIA-downfor-100: CGT TTA TCA TTT TTC ACG TAG CAA ATT AGC TTC AAC  
TTA TAC TCT TGG CC TCC TCT AGT

MIA-downrevmut-0: TTG AGT TCC TGT GAT TAT AAC CTG TAT GAA AGC CCT  
GTG AGC CAT TAA GCC CGA ATT CCT TGA ATT TTC AAA-3'

#### 3.5.1.4.2 Disruption von *TIM16* (Wach, 1996; Wach *et al.*, 1997; Wach *et al.*, 1994)

Die Disruption von *TIM16* in dem diploiden Hefestamm YPH501 wurde durch den Austausch eines Allels von *TIM16* mit der Auxotrophiemarkerkassette *HIS3* mittels homologer Rekombination erhalten. Das Amplifikat, das die *HIS3*-Kassette sowie flankierende Sequenzen des *TIM16* Locus enthielt, wurde durch die Verwendung der Primer MIA-S2 und MIA-S3 und dem Plasmid pFA6a-HIS3MX6 als Matrize gewonnen. Das Amplifikat wurde in den diploiden Hefestamm YPH501 transformiert und positive Klone auf Medium ohne Histidin selektioniert. Die Disruption wurde durch PCR-Analyse überprüft.

MIA-S1: CTT CGT GAC TTG AGC ATA AGA AAA ACA TAG ACT TGT  
TGG ATA TAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC

MIA-S3: CTG CAT GCT TTC GAT AAC ACT TGT GAC GTA ATG ATG  
GAG GCT TCC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G

#### 3.5.1.4.3 Generieren des Hefestammes GAL-*ScTim22* - *Nctim22*

Durch Transformieren des Plasmids pRS426 – *Nctim22* (siehe 3.4.4.3.14) in den Stamm GAL-*ScTim22* und darauffolgender Selektion auf SGal-Ura Platten konnte ein Stamm generiert werden, bei welchem das endogene *ScTim22* durch Wachstum auf Medium ohne Galaktose depletiert werden konnte, welches aber *NcTim22* vom Plasmid exprimiert.

#### 3.5.1.4.4 Generieren des Hefestammes *TIM22/tim22::HIS3* – *Nctim22*

Durch Transformieren des Plasmids pRS426 – *Nctim22* (siehe 3.4.4.3.14) in den Stamm *TIM22/tim22::HIS3* und darauffolgender Selektion auf SGal-Ura Platten konnte ein Stamm generiert werden, welcher neben dem endogenen *ScTim22* auch *NcTim22* vom Plasmid exprimiert.



### 3.5.1.5 Sporulation von Hefezellen

Diploide Hefestämme können durch Wachstum auf einem nährstoffarmen Medium zur Sporulation angeregt werden. Dies wurde für einen diploiden Hefestamm durchgeführt, bei welchem eine Kopie von *TIM16* disruptiert worden war und der Tim16 von einem Plasmid exprimiert (pVT-Tim16-URA). Die Platten wurden etwa eine Woche bei 30°C inkubiert und mikroskopisch auf Sporulation untersucht. Sobald etwa 50% der Hefezellen Asci gebildet hatten, wird etwas Zellmaterial in 50 µl Zymolyaselösung (0,5 mg/ml) aufgenommen und etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wird dann auf eine YPD-Platte überführt, mit Hilfe eines Mikromanipulators die Sporen eines Ascus getrennt und an definierten Punkten der Platte abgelegt. Die YPD-Platte wird 3 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert. Die gewonnenen haploiden Stämme wurden durch PCR auf die Disruption von *TIM16* und den Paarungstyp überprüft.

Sporulationsmedium: 1% (w/v) KAc; 2% (w/v) Bacto-Agar

### 3.5.1.6 Komplementation der Disruption des *TIM16*-Gens in *S. cerevisiae* durch *Plasmid-shuffling*

Da es sich bei Tim16 um ein essentielles Protein handelt, konnte es nur im diploiden Hefestamm YPH501 mit der *HIS3*-Kassette disruptiert werden. So wurden diploide Stämme generiert, bei welchen eine Kopie des Gens durch die *HIS3*-Kassette ersetzt war, die jedoch eine weitere Kopie des Gens besaßen und daher lebensfähig waren. Ein solcher Stamm wurde mit dem pVT-U-102 Plasmid transformiert, in welches die kodierende Sequenz von *TIM16* kloniert worden war. Die Stämme wurden auf SD-Medium (siehe 3.3.1.2) ohne Histidin und Uracil selektioniert. Durch Sporulation wurden haploide Stämme dieses Ausgangsstamms generiert, bei welchen *TIM16* disruptiert war, die jedoch durch die Expression des plasmidkodierten Tim16 gerettet wurden. Ein solcher haploider Stamm wurde entweder mit dem Plasmid pVT-trp-Tim16, pVT-trp-Tim14 oder pVT-trp-Tim14<sub>mut</sub> transformiert. Diese Transformanden wurden auf SD-Platten (siehe 3.3.1.2) ohne Histidin, Uracil und Tryptophan selektioniert. Dann wurden die Klone auf 5-Fluoroorotsäure-Platten ausgestrichen. Auf diesen Platten können nur die Klone wachsen, bei welchen der Verlust von *TIM16* im Genom durch die Expression des Proteins, das in das pVT-trp Plasmid kloniert worden war, gerettet werden kann.

5-FOA-Agar (ad 100ml):	20 ml	5x SD (siehe 3.3.1.2)
	100 mg	5-FOA
	2,5 ml	Uracil (2 mg/ml)
	200 µl	Histidin- Stock (10 mg/ml)
	200 µl	Tryptophan (10 mg/ml)
	2 %	Agar

### 3.5.2 Methoden der *Neurospora*-Genetik

#### 3.5.2.1 Verwendete *Neurospora crassa* Stämme

Stamm	Mating type	Referenz
<i>St. Lawrence 74A K93-12A</i>	A	Fungal Genetics Stock Center (FGSC) #2489 (74-OR23-1VA)
HisTim22	A, bar <sup>R</sup>	diese Arbeit
Tim54His	A, hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit

#### 3.5.2.2 Kultur von *Neurospora crassa*

Die Kultivierung von *Neurospora crassa* erfolgte gemäß beschriebener Standardmethoden (Davis *et al.*, 1970).

#### 3.5.2.3 Gewinnung von Konidien

Die Anzucht der Konidien erfolgte auf Vollmedium mit 2% Agar in 250 ml Erlenmeyerkolben (siehe 3.3.1.3). Das Medium wurde mit silikatgetrockneten Konidien beimpft und 3-7 Tage bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Um die Ausbildung von Konidien zu stimulieren, wurden die Kulturen anschließend bei RT und Tageslicht für weitere 3 bis 5 Tage inkubiert. Das Ernten der Konidien erfolgte dann durch Abschwemmen mit 50 ml sterilem Wasser. Um die Konidien von Hyphen zu trennen, wurde die abgeschwemmte Suspension durch sterile Watte filtriert. Die gewonnen Konidien wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskops ausgezählt.

### 3.5.2.4 Anzucht von Hyphen

Die Kultivierung von *Neurospora crassa* erfolgte für 15 h bei 25°C in MIN-Medium (siehe 3.3.1.3), das mit  $2 \times 10^9$  Konidien pro Liter Kultur angeimpft wurde. Um ein gutes Wachstum zu ermöglichen, wurden die Kulturen belüftet und beleuchtet (Davis *et al.*, 1970).

### 3.5.2.5 Konservierung von Konidien durch Silikattrocknung

Die aus einem Anzuchtkolben gewonnenen Konidien wurden mit 10 ml steriler Milch geerntet und durch sterile Watte filtriert. Anschließend wurden dreimal je 1 ml dieser Suspension mit etwa 1g sterilem Kieselgel vermischt und 2-3 Wochen in einem Exsikkator getrocknet. Die Kulturen können über mehrere Jahre bei -80°C gelagert werden.

sterile Milch: 10% (w/v) Milchpulver in Wasser autoklavieren

### 3.5.2.6 Transformation von *Neurospora crassa*

#### 3.5.2.6.1 Gewinnung transformationskompetenter Sphäroplasten (Royer, 1992)

Für die Transformation von *N. crassa* Stämmen mussten zunächst Sphäroplasten des entsprechenden Stammes hergestellt werden. Dazu wurden  $2 \times 10^9$  Konidien in MIN-Medium (siehe 3.3.1.3) angeimpft und solange bei 30°C inkubiert, bis etwa 90% der Konidien begannen auszukeimen (~ 4-6 h). Dies konnte unter dem Lichtmikroskop verfolgt und abgeschätzt werden. Dann wurden die Konidien geerntet (480g, 10 Minuten), mit Wasser gewaschen und in 10 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Zur Herstellung von Sphäroplasten wurde die Zellwand mit Novozym 234 (3 mg/ml) 30 bis 60 Minuten bei 30°C verdaut. Das Enzym wurde danach durch zweimaliges Waschen mit 1 M Sorbitol und STC-Puffer entfernt. Das Pellet wurde in 15 ml STC-Puffer, 4 ml PTC und 200 µl DMSO resuspendiert. Die Sphäroplastensuspension wurde portioniert und zunächst langsam bei -20°C eingefroren, später dann bei -80°C verwahrt.

STC-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M Sorbitol

PTC-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 40% (w/v) PEG

### 3.5.2.6.2 Transformation von Sphäroplasten (Staben *et al.*, 1989; Vollmer *et al.*, 1986)

100 µl Sphäroplastensuspension wurden mit einer Mischung aus 5 µl DNA (~1-5 µg), 2 µl Spermidin/HCl (50 mM) und 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC-Puffer) versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit 1 ml PTC-Puffer (siehe 3.5.2.6.1) heftig gemischt und 20 Minuten bei RT belassen. Der Ansatz wurde in 7,5 ml erwärmten Top-Agar aufgenommen und auf FIGS-Agarplatten, angereichert mit der zur Selektion des transformierten Plasmids geeigneten Reagenz, ausgegossen. Dabei überträgt das Plasmid pCB1179 die Resistenz gegen Hygromycin (200 µg/ml FIGS-Agar) und das Plasmid pKS-bar-cpc1 die Resistenz gegen BASTA (3% (w/v) in FIGS-Agar). Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Top-Agar:	1x Vogels; 18% (w/v) Sorbitol; 3% (w/v) Agar
FIGS-Agarplatten:	1x Vogels, 2% (w/v) Sorbose; 0,05% (w/v) Fruktose; 0,05% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Agar
STC-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 M Sorbitol

### 3.5.2.7 Gewinnung von Mikrokonidien zur Herstellung homokaryotischer Stämme (Ebbole *et al.*, 1990)

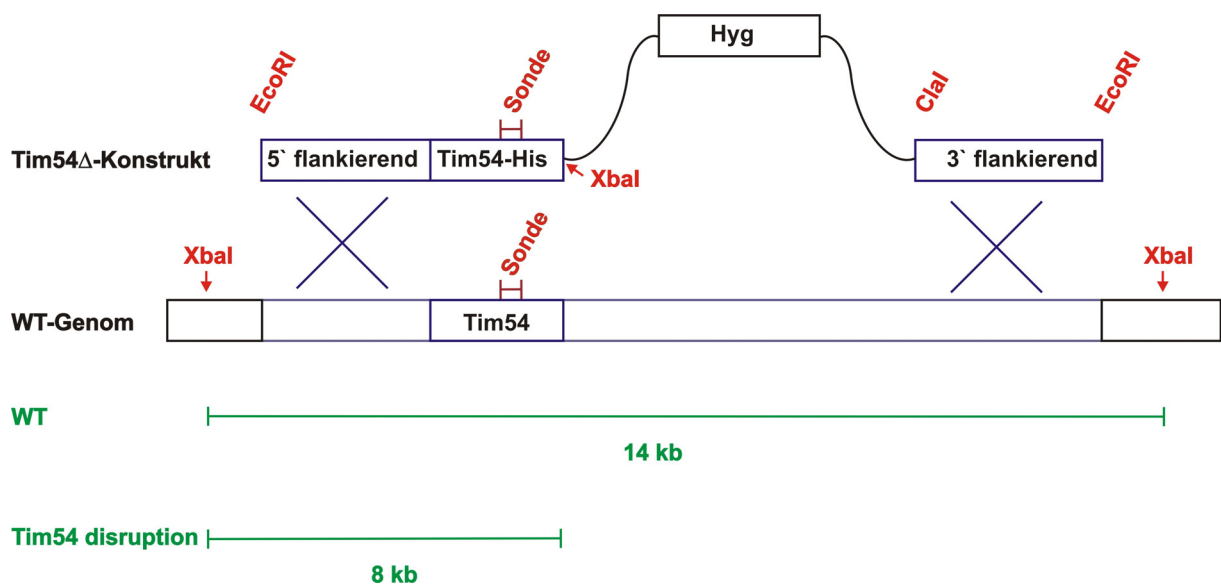
Nach einer Transformation enthalten Hyphen von *N. crassa* wegen ihrer Mehrkernigkeit neben transformierte auch nicht transformierte Kerne. Durch Wachstum dieser heterokaryotischer Stämme auf einem iodoacetathaltigen Medium wurden die Hyphen zur Ausbildung einkerniger Mikrokonidien angeregt, aus denen dann homokaryontische Stämme angezogen werden konnten. Die Ausbildung der Mikrokonidien erfolgte für 7-10 Tage bei 25°C auf Mikrokonidien-Medium (siehe 3.3.1.3) bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h. Das Ernten erfolgte durch Abschwemmen mit sterilem Wasser. Die Makrokonidien wurden mittels Filtration durch ein steriles Duraporefilter (Millipore, Porengröße: 5 µm) abgetrennt und anschließend die Konzentration der Mikrokonidien im Durchlauf durch Auszählen unter einem Lichtmikroskop bestimmt. Zur Gewinnung homokaryotischer Stämme wurden etwa 2000 Mikrokonidien 2-3 Tage bei 30°C auf einer Sorbose<sup>Hyg</sup>-Platte (siehe 3.3.1.3) inkubiert.

### 3.5.2.8 Generierte *Neurospora crassa* Stämme

#### 3.5.2.8.1 Generieren eines Stammes, der Tim22 mit N-terminaler Oktahistidinylanhang exprimiert

Das Plasmid pKS-bar-cpc1 mit inseriertem His-Tim22 wurde in den *Neurospora crassa* Wildtypstamm *St. Lawrence 74A K93-12A* transformiert. Die Transformanten wurden durch mehrmalige Passage in flüssigem Minimalmedium mit 3 % BASTA selektiert und auf die Expression von His-Tim22 getestet.

#### 3.5.2.8.2 Generieren eines Stammes, der Tim54 mit C-terminalem Oktahistidinylanhang exprimiert



**Abb. 6: Austausch des endogenen Tim54 durch Tim54-His**

Das mit EcoRI linearisierte Plasmid pCB1179, in welches *tim54* mit C-terminaler Oktahistidinylsequenz und 5'-flankierenden Sequenzen sowie 3'-flankierende Sequenzen des genomischen *tim54* Locus kloniert worden war, wurde in einen *Nc* WT-Stamm transformiert. Durch homologe Rekombination kann das endogene *tim54* Gen durch die Version mit C-terminalem Histidinylanhang ersetzt werden. Der Austausch kann durch Southernblot-Analyse nach XbaI-Verdau genomischer DNA der Transformanten überprüft werden.

Das Plasmid pCB1179 mit inseriertem Tim54-His wurde mit EcoRI linearisiert und in den *Neurospora crassa* Wildtypstamm *St. Lawrence 74A K93-12A* transformiert. Die Transformanten wurden durch Kultur in flüssigem Minimalmedium mit 200 µg/ml Hygromycin selektiert und mittels Southernblot-Analyse auf den Austausch des endogenen

*tim54*-Gens durch die Variante mit Histidinylanhang untersucht. Die verwendete Sonde war mit den Primern Tim54-3 und Tim54-4 generiert worden und bindet im *tim54* Gen. Die genomische DNA war für die Southernblot-Analyse mit *XbaI* geschnitten worden. Im Falle einer homologen Rekombination erwartete man das Fehlen eines 14 kb Fragmentes jedoch das Generieren eines 8 kb Fragmentes. Positive Klone wurden durch Mikrokonidierung in einen homokaryotischen Stamm überführt, der keine Kerne mehr enthielt, die das endogene Tim54 kodieren.

## **3.6 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mittels des „BioRad-Proteinassays“ (Bradford, 1976) ermittelt. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen der Proteinlösung mit 1 ml einer 1:5 Verdünnung des Farbstoffkonzentrats (BioRad) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden zur Erstellung einer Eichgerade Proben bekannter Proteinkonzentration gemessen (0-24 µg). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dann durch Bestimmung der OD<sub>600</sub> der zu messenden Proben und der Proben der Eichgerade.

### **3.6.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure**

Um Proteine aufzukonzentrieren oder störende Detergentien und Salze zu entfernen, wurden die Proteine durch Zugabe von Trichloressigsäure zu einer Endkonzentration von 12,5% gefällt. Nach Zugabe der TCA wurden die Proben 30 Minuten auf Eis inkubiert und die Präzipitate 20 Minuten bei 2°C und 30000xg zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden mit -20°C kaltem Aceton gewaschen und wie zuvor pelletiert. Das Proteinpellet wurde getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

SDS-Probenpuffer:            2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin;  
                                     5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

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

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) elektrophoretisch entsprechend ihrer molaren Masse aufgetrennt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Sammelgel:	5% Acrylamid; 0,1% Bisacrylamid; 0,1% SDS; 60 mM Tris-HCl, pH 6; 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
Trenngel:	8%-17,5% Acrylamid; 0,07%-0,3% (w/v) Bisacrylamid; 380 mM Tris-HCL, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (v/v) APS; 0,035% (v/v) TEMED
Bodengel:	2% Agar in SDS-Laufpuffer
Laufpuffer:	10 g/l SDS; 144 g/l Glycin; 30 g/l Tris

Die Gele hatten folgende Größe: Sammelgel (10 x 150 x 8mm), Trenngel (90 x 150 x 8mm) und Bodengel (5 x 150 x 8). Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Kammer bei konstanter Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder für die Immundetektion auf eine Nitrocellulosemembran übertragen oder durch Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 bzw. Silber nachgewiesen.

### 3.6.4 Anfärben von Proteinen im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250

Nach der Elektrophorese wurde das Sammel- und Bodengel entfernt und das Trenngel für 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärber geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Das gefärbte Gel wurde über Nacht zwischen zwei Geltrockenfolien getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250
Entfärber:	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

### 3.6.5 Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel nach Blum (Blum *et al.*, 1987)

Wie beim Färben mit Coomassie-Brilliant-Blue wurde bei dem zu färbenden Gel nach der elektrophoretischen Proteinauftrennung das Boden- und Sammelgel entfernt. Dann wurde das Gel 30-60 Minuten oder gegebenenfalls über Nacht in Fixierlösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 50 µl 37%iges Formaldehyd pro 100ml) geschwenkt. Danach folgten zwei Waschschrte in 50% Ethanol für jeweils 10 Minuten. Als nächstes wurde das Gel 1 Minute mit 0,02% Natriumthiosulfatpentahydrat behandelt und daraufhin dreimal kurz (20 Sekunden) mit Wasser gewaschen. Es folgte eine 15minütige Inkubation in 0,2% Silbernitrat, das mit 75 µl 37% Formaldehyd pro 100 ml versetzt worden war. Nach Abgießen der Silberlösung und zwei weiteren kurzen Waschschrten in Wasser folgte das Entwickeln mit 6% (w/v) Natriumcarbonat versetzt mit 2 ml der 0,02% Natriumthiosulfatlösung (pro 100 ml) und 50 µl 37% Formaldehyd (pro 100 ml). Sobald die Proteinbanden gut sichtbar waren, wurde das Gel für 20 Sekunden in Wasser gewaschen und dann 15 Minuten in 50 mM EDTA inkubiert. Vor dem Trocken des Gels zwischen Geltrockenfolien wurde es erneut mit Wasser gespült.

### 3.6.6 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Kyhse-Andersen, 1984; Towbin *et al.*, 1979). Dieser Transfer wurde mittels des sogenannten *semi-dry*-Verfahrens durchgeführt. Zwischen zwei Graphitelektroden wurden zunächst 2-3 in Blotpuffer getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere, dann eine Nitrocellulosemembran, das Gel und dann wieder 2-3 getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere angeordnet. Auch die Nitrocellulosemembran und das Gel wurden in Blotpuffer 5-10 Minuten voräquiliert. Die Membran sollte relativ zum Gel anodenseitig liegen. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch für 75 Minuten bei 1 mA/cm<sup>2</sup>. Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden mittels Ponceau S angefärbt.

Blotpuffer:	0,02% (w/v) SDS; 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
Ponceau S:	0,2 % (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA



### 3.6.7 Quantifizierung durch Autoradiographie und Phosphoimaging

Nitrozellulosemembranen mit radioaktiv markierten Proteinen wurden auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie). Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham) eingelesen und ihre Intensität bestimmt (Densitometrie). Alternativ wurden Nitrozellulosemembranen nach dem Transfer von Proteinen direkt auf Phosphoimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Banden durch einen Phosphoimager der Firma Fuji bestimmt.

### 3.6.8 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro*

Die Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine erfolgte wie bei Pelham und Jackson (1976) beschrieben (Pelham *et al.*, 1976). Das gewünschte Gen wurde in ein Plasmid der pGEM-Reihe hinter den SP6-Promotor kloniert, und mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Das Transkript wurde dann in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin translatiert.

#### 3.6.8.1 Transkription

Ein 20 µl Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 10 mM GTP, 1 µl 10 mM CTP, 1 µl 10 mM UTP, 10 U SP6 RNA-Polymerase, 25 U RNasin, 250 µM m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G und 2-5 µg Plasmid-DNA. Der Reaktionsansatz wurde mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 5 µl 10 M LiCl und 150 µl 96% (v/v) Ethanol zugefügt und 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde die RNA pelletiert (33000xg, 20 Minuten, 4°C). Danach wurde das RNA-Pellet mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 30°C getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 50 µl H<sub>2</sub>O mit 25U RNasin aufgenommen.

5x Transkriptionspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl,  
10 mM Spermidin

### 3.6.8.2 Translation in Retikulozytenlysat

Die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* erfolgte nach der Methode von Söllner *et al.* (1991) (Söllner, 1991; Söllner *et al.*, 1991). Dazu wurden 100 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 1 µl RNasin (40 U/µl), 3,5 µl Aminosäurengemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1mM), 12 µl <sup>35</sup>S-Methionin (10mCi/ml) und 25 µl mRNA gemischt. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 12 µl 58 mM Methionin und 24 µl 1,5 M Sucrose zugegeben und der Translationsansatz abzentrifugiert (100000xg, 30 Minuten, 4°C), um an Ribosomen gebundene, unvollständig translatierte Polypeptidketten zu entfernen.

### 3.6.9 Gelfiltrationschromatographie

Zur Abschätzung des nativen Molekulargewichts von Proteinkomplexen wurden Gelfiltrationschromatographieläufe durchgeführt. Isolierte Mitochondrien (0,5 – 2 mg) wurden in einem geeigneten Lysepuffer eine Stunde unter Schütteln bei 4°C solubilisiert (siehe Figurenlegenden). Nicht lysiertes und aggregiertes Material wurde durch Zentrifugation (90000xg, 30 Minuten, 4°C) abgetrennt, und der Überstand auf eine mit Laufpuffer voräquilibrierte Gelfiltrationssäule geladen (Superose 6, Amersham). Die Flussrate für den Gelfiltrationslauf betrug 0,25 ml/min. Die eluierten Proteine wurden in 500 µl Fraktionen gesammelt und entweder ein Teil der Fraktion direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder die gesamte Fraktion nach Konzentration der Proteine durch TCA-Fällung für die elektrophoretische Trennung verwendet. Zur Abschätzung der molekularen Masse von Proteinkomplexen wurde das Elutionsvolumen folgender Proteine bestimmt: Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Cytochrome *c* (14 kDa).

### 3.6.10 Abschätzen des nativen Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch blaue Nativgele (Schägger *et al.*, 1994; Schägger *et al.*, 1991)

Auch bei dieser Methode wurden Mitochondrien zunächst in einem geeigneten Puffer mit dem geeigneten Detergens solubilisiert. Durch den Farbstoff Serva Blau G-250 (Serva) werden in die Proteinkomplexe negative Nettoladungen eingeführt, die die Auftrennung im elektrischen Feld erlaubt. Sammel-, Trenn- und Bodengel hatten jeweils eine Größe von 10 x 150 x 8 mm bzw. 90 x 150 x 8 mm bzw. 5 x 150 x 8 mm und folgende Zusammensetzung:

Bodengel:	20% Acrylamid; 0,013% Bisacrylamid; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0; 0,05% APS; 0,025% TEMED
Trenngel:	linearer Gradient von 6-13% Acrylamid; 0,36-0,8% Bisacrylamid; 0-16% Glycerin; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0; 0,04% APS; 0,04% TEMED
Sammelgel:	3,8% Acrylamid; 0,012% Bisacrylamid; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 50 mM Bistris/HCl, pH 7,0; 0,08% APS; 0,08% TEMED

Nach der Solubilisation wurden nicht lysierte Mitochondrien und Proteinaggregate durch Zentrifugation (90000xg, 30 Minuten, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 10x Probenpuffer versetzt (10x Probenpuffer: 5% Serva Blue G-250, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 100 mM Bistris, pH 7,1) und auf das Nativgel aufgetragen. Der Kathodenpuffer A bestand aus 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, pH 7 und 0,02% Serva Blue G-250. Der Kathodenpuffer B hatte dieselbe Zusammensetzung allerdings ohne Farbstoff. Als Anodenpuffer diente 50 mM Bistris-HCL, pH 7. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Man ließ die Proben bei 100 V einlaufen und erhöhte dann die Spannung auf 500 V. Die Stromstärke war auf 15 mA limitiert. Nach etwa der Hälfte der Laufzeit wurde der Kathodenpuffer A (mit Farbstoff) durch den Kathodenpuffer B (ohne Farbstoff) ausgetauscht. Als Markerproteine dienten Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydragenase (150 kDa) und BSA (66 kDa). Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert.

Gegebenenfalls wurden Proteine nach Auftrennung in einem Nativgel die Proteine in einer zweiten Dimension getrennt. Dazu wurde die Spur des Nativgels ausgeschnitten, in SDS-Probenpuffer für 5 Minuten äquilibriert, mit Wasser gewaschen und in das Sammelgel eines SDS-Gels in horizontaler Orientierung eingegossen. Die Auftrennung erfolgte wie für die SDS-PAGE beschrieben.

SDS-Probenpuffer:           2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin;  
                                  5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

### 3.6.11 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen aus *E. coli* Zellen

Für die Immunisierung von Kaninchen wurde die kodierende Sequenz von *tim22* aus *N. crassa* vom Startcodon bis zum Beginn der zweiten Transmembrandomäne als MBP-Fusionsprotein synthetisiert. Dabei wurde die kodierende Sequenz im Leseraster in ein Plasmid kloniert, welches für das Maltose-Binde-Protein kodiert (MBP) und in *E. coli*-Zellen des Stammes transformiert. Hierzu wurde das Plasmid pMal-cRI verwendet. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des Lac-Promotors. Eine Übernachtskultur dieser *E. coli*-Zellen in 50 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 in 250 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 10 mM IPTG für 1-3 h induziert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4400xg, 5 Minuten, 2°C). Das Zellpellet wurde in 15 ml Amylose-Säulenpuffer resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) wurden die *E. coli* Zellen lysiert. Um die Bakterienzellen effektiv aufzuschließen, wurden sie nach 30 minütiger Inkubation mit Lysozym auf Eis einer Ultraschallbehandlung unterworfen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Membranbestandteile wurden 10 Minuten bei 2°C und 27000xg pelletiert, der Überstand wurde auf 4 ml äquilibriertes Amyloseäulenmaterial (New England Biolabs) geladen und bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min gebunden. Nach dem Laden wurde die Säule bei gleicher Flussrate mit 5 Säulenvolumen Amylose-Säulenpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Maltose in Amylose-Säulenpuffer. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und auf den Gehalt des gewünschten Proteins getestet.

Amylose-Säulenpuffer:       20mM HEPES, pH 7,4; 5 M NaCl; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.6.12 Reinigung von Proteinen mit N-terminalem Histidinylanhang aus *E. coli* Zellen

Der Teil der kodierenden Sequenz von *tim54* in *N. crassa*, welches für den Loop zwischen den beiden potentiellen Transmembrandomänen kodiert und der vollständige offene Leserahmen von *TIM16* aus *S. cerevisiae* wurden in das Plasmid pQE30 kloniert, um Antigen herzustellen. Dadurch wurden Konstrukte kodiert, die N-terminal einen Hexahistidinyl-Anhang besitzen. Das Konstrukt für die Gewinnung eines Antigens von *NcTim54* wurde in den *E. coli* Stamm MH1 transformiert, das für *ScTim16* in XL1-Blue *E. coli* Zellen. Die Induktion der Expression beider Stämme erfolgte wie für das MBP-Tim22 Fusionsprotein beschrieben. *ScTim16* wurde nach der Induktion unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, das Tim54-Antigen konnte unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Die Reinigung unter nativen Bedingungen erfolgte bei 4°C, unter denaturierenden Bedingungen jedoch bei Raumtemperatur. Die verwendeten Puffer unterschieden sich bei beiden Methoden, die Vorgehensweise war weitgehend identisch. Das Zellpellet wurde zunächst in 15 ml Lysepuffer resuspendiert. Unter nativen Bedingungen wurden die *E. coli* Zellen durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) lysiert, unter denaturierenden Bedingungen war dieser Schritt nicht notwendig. Um die Bakterienzellen effektiv aufzuschließen, wurden sie nach 30 minütiger Inkubation auf Eis einer Ultraschallbehandlung unterworfen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Membranbestandteile wurden 10 Minuten bei 2°C und 27000xg pelletiert, der Überstand wurde auf 4 ml äquilibrierte Ni-NTA (Qiagen) geladen und bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min gebunden. Nach dem Laden wurde die Säule bei gleicher Flussrate mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte dann mit 10 ml Elutionspuffer. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und auf den Gehalt des gewünschten Proteins getestet.

	Nativ	Denaturierend
Lysepuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 6 M Guanidiniumhydrochlorid; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Waschpuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol	10 mM Tris/HCl, pH 6,3; 6 M Guanidiniumhydrochlorid; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Elutionspuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol	10 mM Tris/HCl, pH 4,5; 6 M Guanidiniumhydrochlorid; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 3.6.13 Reinigung von Tim22 aus *Neurospora crassa*

0,5 g bis 5 g Mitochondrien des Stammes His-Tim22 wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in Solubilisationspuffer aufgenommen. Durch Ultraschallbehandlung wurden Membranvesikel generiert, die durch Ultrazentrifugation (4°C, Ti70, 250000xg, 40 min) von den löslichen Proteinen abgetrennt wurden. Das Membranpellet wurde im gleichen Volumen des selben Puffers zuzüglich 1% DDM oder 1% Digitonin aufgenommen und für 1 h bei 4°C solubilisiert. Nach Abtrennen nicht solubilisierter Membranen (4°C, Ti70, 250000xg, 30 min) wurde der Überstand für 1 h (oder über Nacht) mit 5 ml Ni-NTA bei 4°C inkubiert. Die Ni-NTA-Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Solubilisationspuffer und dann 5 Säulenvolumen Solubilisationspuffer ohne Zusatz von Salz gewaschen. Die Elution erfolgte ohne Salz und 300 mM Imidazol. 1 ml der Ni-NTA-Elution wurde auf eine 1 ml ResourceQ-Säule geladen und mit 5 Säulenvolumen Natriumphosphatpuffer ohne Salz gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten von Natriumphosphatpuffer ohne Salz bis 1 M NaCl über 10 Säulenvolumen. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung von 5% der geladenen Ni-NTA-Fraktion. Jeweils 40 µl der Waschfraktionen der ResourceQ-Säule und der Elutionen bei etwa 100 mM NaCl. Andere Proteine eluierten bei höheren Salzkonzentrationen.

Solubilisationspuffer:            50 mM Natriumphosphat, pH 8; 10 – 300 mM NaCl;  
   10% (w/v) Glycerol; 20 mM Imidazol; 1 mM PMSF

### 3.6.14 Quervernetzung von Proteinen

Quervernetzende Agentien ermöglichen es die räumliche Nähe von Proteinen zueinander zu zeigen. Dazu wurden 150 µg Mitochondrien in einem Gesamtvolumen von 300 µl Importpuffer 1 ohne BSA (siehe 3.7.6) mit quervernetzendem Agens versetzt. Dies wurde entweder mit Zusatz von 2,5 mM ATP und 5 mM NADH durchgeführt oder nach ATP-Depletion durch Zugabe von 20 mU/µl Apyrase und 20 µM Oligomycin. Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe der quervernetzenden Agentien DSG (150 µM), DSS (75 µM) oder DFDNB (200 µM) für 30 Minuten auf Eis. Die Quervernetzung wurde beendet durch Zugabe von 100 mM Glycin, pH 8,8 und Inkubation für 10 Minuten. Danach wurden die Mitochondrien reisoliert und durch SDS-Gelelektrophorese untersucht.

Auch der gereinigte TIM22-Komplex aus *Neurospora crassa* wurde durch Quervernetzung untersucht. Dazu wurde 100 µg gereinigter Komplex mit 0,03 % Glycerinaldehyd versetzt. Die Vorgehensweise war ansonsten identisch zu Quervernetzungsversuchen in Mitochondrien. Nach der Quervernetzung wurde der Komplex durch TCA-Präzipitation gefällt und durch SDS-Gelelektrophorese und Immundekoration untersucht.

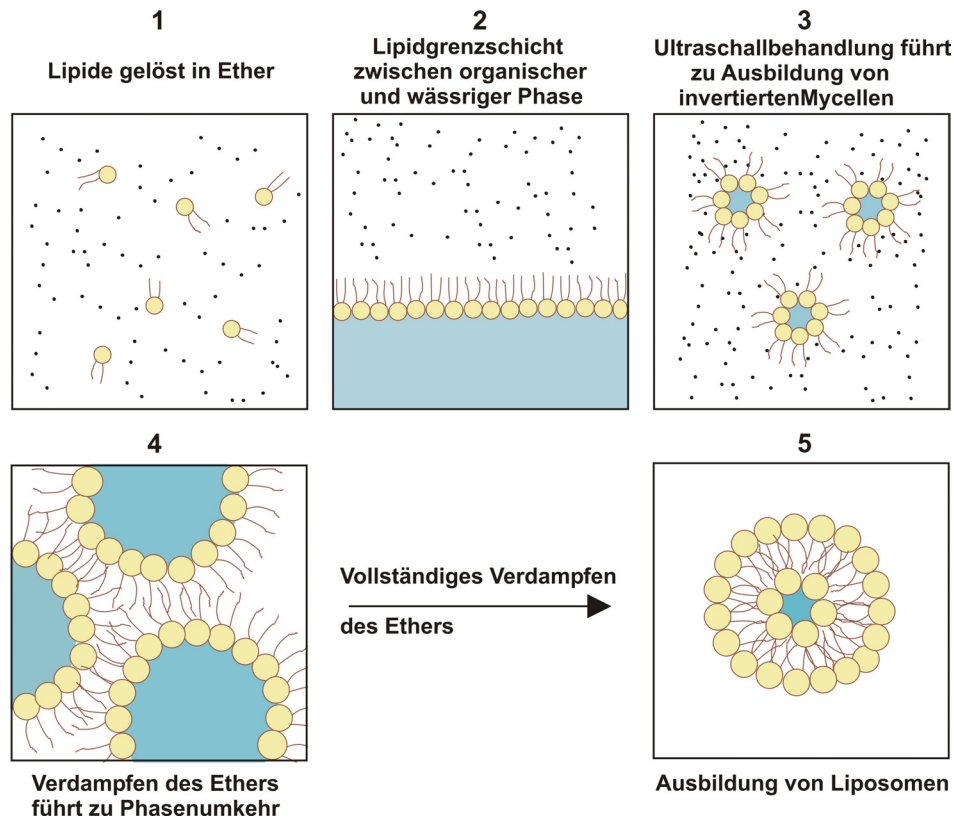
Für die Quervernetzung eines radioaktiv markierten Importintermediates, das beide mitochondriale Membranen spannt, wurde das Präprotein  $pb_2\Delta 19(167)DHFR_{K5}$  zunächst mit 2 mM Methotrexat und 5 mM NADPH vorinkubiert und dann in energetisierte Mitochondrien in Anwesenheit von 2 mM MTX and 5 mM NADPH importiert. Der Import wurde auf Eis gestoppt und das quervernetzende Agens SMPT (200 mM) zugesetzt. Nach 30 Minuten wurde die Quervernetzung wie beschrieben mit Glycin gestoppt und die Mitochondrien reisoliert. Die Auswertung erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie.

### **3.6.15 Rekonstitution von *NcTim22* in Lipidvesikel (Rigaud *et al.*, 2003)**

#### 3.6.15.1 Formieren von Lipidvesikeln durch Phasenumkehr

Die Lipidvesikel, in die der gereinigte TIM22-Komplex rekonstituiert werden sollte, wurde durch eine *reversed phase*-Technik vorgeformt (siehe Abb. 7). Dazu wurden die in Chloroform gelösten Lipide gemischt und das Chloroform unter Vakuum verdampft. Es wurden insgesamt 50 mg Lipid verwendet, und zwar Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure im Verhältnis 9:1. Die Lipide wurden in 3,5 ml Diethylether gelöst und 1 ml des Puffers (20 mM HEPES, pH 7,4; 100 mM KCl) zugegeben, der in die Vesikel eingeschlossen werden sollte. Dies ergab etwa ein Verhältnis von organischem Lösungsmittel zu wässrigem Puffer von 3:1. Die Lipide orientierten sich dabei als Grenzschicht zwischen der organischen und wässrigen Phase an, wobei die hydrophoben Fettsäuren in die organische Phase, die hydrophilen Kopfgruppen jedoch in die wässrige Phase weisen. Durch Ultraschallbehandlung für 2 Minuten bei 4°C wurden inverse Mycellen generiert, die in ihrem Inneren den wässrigen Puffer einschloßen und deren hydrophoben Fettsäuren in die organische Phase weisen. Durch ein kontrolliertes Vakuum von 400 mm Hg wurde das organische Lösungsmittel verdampft. Die Lösung geht dabei zunächst in einen gelartigen Zustand über, wird dann aber wieder flüssig. Während dieses Vorgangs bilden sich durch Phasenumkehr die Lipidvesikel aus (siehe Abb. 7).

Die gebildeten Lipidvesikel wurden in 1-2 ml desselben Puffers verdünnt und durch Verwendung eines „Extruders“ mit 100 µm Filter in Lipidvesikel homogener Größe verwandelt.



**Abb. 7: Generieren von Liposomen durch Phasenumkehr.**

Die organische Phase ist gepunktet dargestellt, die wässrige Phase in blau. (1) Die Lipide gelöst in organischem Lösungsmittel richten sich (2) nach Mischen mit wässrigem Puffer an der Grenzschicht aus. (3) Durch Ultraschallbehandlung werden inverse Mycellen generiert, die den wässrigen Puffer einschließen. (4) Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels kommt es zu Phasenumkehr. (5) Nach vollständigem Verdampfen des organischen Lösungsmittels entstanden Liposomen, die den wässrigen Puffer eingeschlossen haben.

### 3.6.15.2 Rekonstitution von Tim22 in vorgeformte Lipidvesikel mit *BioBeads*

Die vorgeformten Liposomen wurden mit Digitonin bzw. DDM in verschiedenen Konzentrationen solubilisiert bzw. desintegriert. Dazu wurden 250 µg Lipidvesikel in Rekonstitutionspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4; 100 mM KCl) zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen und unter Rühren mit den verschiedenen Konzentrationen Detergens versetzt (Digitonin: 0 – 0,5 %, DDM: 0 – 0,1 %). Die Lipidvesikel wurden für 15 - 30 Minuten unter Rühren mit dem Detergens inkubiert und anschließend wurde Protein in einem Lipid/Protein-Verhältnis von 1:50 zugesetzt und weitere 5 - 10 Minuten gerührt.



Dann wurde aus dem Gemisch das Detergens in drei Schritten mit *BioBeads* entzogen, indem jeweils im Stundenabstand 5 mg *BioBeads* zugesetzt wurden. Das Zerstören der Detergensmycellen führt zum Einbau der Proteine in die Lipidvesikel.

### 3.6.15.3 Kontrolle der erfolgreichen Rekonstitution

#### 3.6.15.3.1 Flotieren von Lipidvesikeln im Sucrosegradienten

Die Lipidvesikel wurden nach der Rekonstitution in insgesamt 1 ml Rekonstitutionspuffer mit 30% Sucrose (w/v) aufgenommen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Dies wurde mit 10 ml desselben Puffers mit 15% Sucrose vorsichtig überschichtet. Als letztes folgte die Überschichtung mit 250 µl Puffer ohne Sucrose. Die Gradienten wurden für 2 Stunden bei 110000xg im Ti50-Rotor zentrifugiert. Die Lipidvesikel flotieren danach aufgrund ihrer Dichte an der Grenzschicht zwischen 15% - und 0% Sucrose. Durch Westernblot-Analyse und Verdau mit Proteinase K (1 mg/ml) konnte überprüft werden, ob Tim22-Protein mit den Vesikeln flотиert, und ob es in der richtigen Orientierung inseriert (vgl. 3.7.5.2).

#### 3.6.15.3.2 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Die visuelle Kontrolle für die Insertion in Lipidvesikel wurde durch Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie der Lipidvesikel durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden durch Dr. Mohamed Chami vom Institut Curie Section Recherche, Paris Cedex 05, France durchgeführt.

## 3.7 Zellbiologische Methoden

### 3.7.1 Aufschluss von Hefezellen durch alkalische Lyse (»Rödel-Aufschluß«) (Kushnirov, 2000)

Es wurden 2,5 OD-Einheiten einer logarithmisch wachsenden Kultur ( $OD_{600} \sim 1$ ) durch Zentrifugation (15000xg; 30 sec; RT) geerntet und in 100 µl Wasser aufgenommen. Durch Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert und Proteine denaturiert. Die Proteine wurden pelletiert, in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 3 Minuten aufgekocht. Nach erneuter Zentrifugation wurden

6 µl des Überstandes für die gelelektrophoretische Untersuchung des Proteinextrakts verwendet.

SDS-Probenpuffer: 2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin;  
5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

### 3.7.2 Subfraktionierung von Hefezellen

Zur Lokalisierung von Tim16 wurden Zellen von *S. cerevisiae* in eine mitochondriale und postmitochondriale Fraktion geteilt. Dazu wurden zunächst Hefezellen in Sphäroplasten umgewandelt (Caplan *et al.*, 1991) und mittels eines Douncer-Homogenisators aufgebrochen. Durch Zentrifugation (10000xg; 10 min; 4°C) wurden Membranbruchstücke und Mitochondrien vom postmitochondrialen Überstand abgetrennt. Zur vollständigen Abtrennung wurde die Mitochondrienfraktion erneut in Homogenisierungspuffer resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und durch Zentrifugation ein weiteres mal gereinigt. Die Proteinkonzentration dieses postmitochondrialen Überstandes betrug ~2-5 mg/ml. Um Membranbruchstücke, Zytosol und andere Mikrosomen vollständig von den Mitochondrien abzutrennen wurde die mitochondriale Fraktion durch eine Zentrifugation im Saccharosegradienten; 240000xg; 15 min; 4°C) gereinigt. Mitochondrien akkumulieren zwischen der 40%igen und 50%igen Saccharosephase. Sie wurden gesammelt, durch Zentrifugation konzentriert (12000xg; 10 min; 4°C), mit SEM-Puffer gewaschen und anschließend im gleichen Puffer resuspendiert (Konzentration ~10 mg/ml). Mikrosomen sind an der Grenzphase zwischen 50% und 60% Saccharose angereichert.

Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA

Saccharosegradient: 20%; 30%; 40%; 50%; 60% (w/v) Saccharose in 10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 100 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF

SEM-Puffer: 10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose;  
1 mM EDTA

### 3.7.3 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* (Herrmann *et al.*, 1994; Zinser *et al.*, 1995)

Die Hefezellen wurden auf Laktatmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 kultiviert. Wurde ein Stamm verwendet, der ein Protein unter Kontrolle des *Gal10*-Promotors exprimiert, wurde er zur Überexpression des Proteins in Laktatmedium mit 1% Galaktose angezogen. Zur Depletion des Proteins wurde der Stamm in Laktatmedium ohne Galaktosezusatz bzw. mit 0,1% Glucose überführt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (3000xg; 5 min; RT). Nach Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde das Zellpellet gewogen und in Puffer 1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, zentrifugiert und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen. Zur Herstellung von Sphäroplasten wurden die Zellen in Puffer 2 (6,67 ml/g Zellen) resuspendiert und 30-45 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die Effizienz der Zymolyasebehandlung zu überprüfen, wurden 50 µl Zellsuspension mit 2 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Die Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (2500xg; 5 min; 4°C) gesammelt, in Homogenisierungspuffer (6,67 ml/g Zellen) resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet. Anschließend wurde die Suspension zweimal zentrifugiert (3000xg; 5 min; 4°C), um die Mitochondrien von Zellresten zu trennen. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12000xg; 12 min; 2°C) gesammelt und in 10 ml SEM-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (3000xg; 5 min; 2°C), um noch vorhandene Zellbestandteile abzutrennen. Nach erneuter Zentrifugation des Überstandes (12000xg; 12 min; 2°C) wurden die Mitochondrien in 0,5-1 ml SEM-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondriensuspension wurde in 25-100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1:	100 mM Tris, 10 mM DTT (2 ml/g Zellen)
Puffer 2:	20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 1,2 M Sorbitol mit Zymolyase (5 mg/g Zellen)
Homogenisierungspuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA
SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA

### 3.7.4 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* (Sebald *et al.*, 1979)

Zur Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* im kleinen Maßstab wurden Hyphen einer Über-Nacht-Kultur (50 ml bis 8 l) durch Absaugen in einer Nutsche isoliert, gewogen und in einen Mörser überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis mit gekühlten Puffern und Geräten. Die Zellen wurden mit Quarzsand und SEMP-Puffer (je 1 ml pro 1 g Hyphen) versetzt und durch Reiben mit einem Pistill aufgebrochen. Anschließend wurde zweimal die gleiche Menge SEMP-Puffer zugegeben und jeweils 1 min gemischt. Durch zwei Zentrifugationen wurde zunächst der Sand abgetrennt (je 2000xg; 10 min; 4°C). Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation isoliert (30000xg; 12 min; 4°C), in SEM-Puffer aufgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Die Isolation von Mitochondrien im größeren Maßstab (Übernachtkulturen von 100–150 l) wurde analog durchgeführt. Die geernteten Hyphen wurden jedoch nicht durch Reiben in einem Mörser sondern mit Hilfe einer Zelmühle aufgebrochen.

SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA
SEMP-Puffer:	SEM; 5 mM PMSF

### 3.7.5 Subfraktionierung von Mitochondrien

#### 3.7.5.1 Gewinnung von Mitoplasten von *S. cerevisiae* durch hypotones Schwellen

Aus Mitochondrien von Hefezellen können Mitoplasten generiert werden. Unter hypotonen Bedingungen wird die Außenmembran der Mitochondrien selektiv geöffnet, während die Innenmembran intakt bleibt. Werden Mitochondrien in Anwesenheit von Proteinase K (PK) unter hypotonen Bedingungen geschwollen, so werden alle im Intermembranraum lokalisierten Proteine oder Proteindomänen proteolytisch abgebaut, während in der Matrix lokalisierte Proteine oder Proteindomänen vor dem proteolytischen Abbau geschützt sind. Mitochondrien (50 µg) wurden dazu in 1 ml Schwellpuffer mit 30 µg/ml PK (40 U/ml) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Protease durch Zugabe von 1,5 mM PMSF inhibiert. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation isoliert (18000xg; 10 min; 4°C), gewaschen und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Schwellpuffer:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 50 mM KAc
SDS-Probenpuffer:	2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

### 3.7.5.2 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen durch Digitoninfraktionierung

Da die Außenmembranen der Mitochondrien von *N. crassa* unter hypotonen Bedingungen intakt bleiben, wurde zum Öffnen der Außenmembran die Methode der Digitoninfraktionierung angewendet. Durch Titration der Digitoninkonzentration konnten schrittweise zunächst die Außenmembranen, bei höheren Konzentrationen oder durch Zugabe von 0,17% (v/v) Triton X-100 auch die Innenmembranen der Organelle lysiert werden. Je 6,5 mg/ml Mitochondrien wurden in SEMK-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen Digitonin versetzt (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5%), resuspendiert und 5 min in Gegenwart von Proteinase K (100  $\mu$ g/ml) bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit SEMK-Puffer verdünnt (Verhältnis 1:5) und 30 min auf Eis belassen. Durch eine weitere Verdünnung (1:8) und Zugabe von 1 mM PMSF wurde die Proteasereaktion gestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation isoliert (5000xg; 10 min; 4°C) und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA
SEMK-Puffer:	SEM; 80 mM KCl

### 3.7.5.3 Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (Carbonatextraktion) (Fujiki *et al.*, 1982a)

Durch Carbonatextraktion kann zwischen integralen Membranproteinen und löslichen Proteinen oder peripher assoziierten Membranproteinen unterschieden werden, da erstere unter den alkalischen Bedingungen nicht gelöst werden. Mitochondrien (100  $\mu$ g) wurden in 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 resuspendiert, 15 sec heftig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Integrale Membranproteine wurden anschließend durch Zentrifugation (10000xg; 30 min; 4°C) sedimentiert und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die löslichen Proteine wurden mit 12,5% (w/v) TCA gefällt und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

SDS-Probenpuffer: 2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin;  
5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

#### 3.7.5.4 Membranpräparation von Mitochondrien

Durch die Isolierung von Membranen bei verschiedenen Salzgehalten kann geprüft werden, ob ein Protein mit mitochondrialen Membranen assoziiert ist. Die Mitochondrien (200  $\mu$ g) wurden dazu in 500  $\mu$ l Volumen in 20mM HEPES, pH 7,4 mit verschiedenen Konzentrationen NaCl (25-500 mM) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Danach wurden zunächst ganze Mitochondrien durch Zentrifugation abgetrennt (12 min, 12000xg, 4°C). Aus dem Überstand wurden Membranvesikel durch Ultrazentrifugation (1 h, 109000xg, TLA45, 2°C) pelletiert, lösliche Proteine verblieben im Überstand. Die Membranfraktionen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-Gelelektroporese aufgetrennt. Lösliche Proteine wurden zunächst durch TCA-Fällung präzipitiert.

SDS-Probenpuffer: 2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin;  
5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

#### 3.7.6 Import *in vitro* synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

Der *in vitro* Import von Vorstufenproteinen wurde analog zu beschriebenen Methoden durchgeführt (Mayer *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1994). Für einen Importansatz wurden je 25  $\mu$ g Mitochondrien (0,25 mg/ml) von *S. cerevisiae* in Importpuffer I oder von *N. crassa* in Importpuffer II resuspendiert und mit 2 mM NADH und 2 mM ATP versetzt. Zusätzlich wurden Kreatinphosphat (15 mg/ml) und Kreatinkinase (150  $\mu$ g/ml) zur Regeneration von ATP zugegeben. Dieser Ansatz wurde 3-5 min bei 25°C gemischt. Nach Zugabe der in Retikulozytenlysat synthetisierten Vorstufenproteine (1-3%) bzw. des rekombinanten Proteins (10 ng/ $\mu$ l Endkonzentration) wurden die Proben zwischen 30 sec und 30 min bei 25°C inkubiert (bei Import von CoxVa bzw. CoxVa $\Delta$ (26-89) bei 12°C) und der Import anschließend durch Abkühlen der Proben auf 4°C und Zerstörung des Membranpotentials durch Zugabe des Importinhibitors (50  $\mu$ M Valinomycin) gestoppt. Nicht importierte Proteine wurden mittels Proteinase K (50  $\mu$ g/ml) abgebaut (15 min; 4°C). Zur Beendigung des Proteaseverdau wurde PMSF (2 mM) zugesetzt, die Mitochondrien abzentrifugiert (4500xg,

10 min; 4°C) und mit SHKCl- Puffer gewaschen. Um Reste des Importansatzes zu entfernen, wurden die Mitochondrien nochmals mit SEMK-Puffer gewaschen und reisoliert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. Westernblot analysiert.

Importpuffer I:	50 mM HEPES/KOH, pH 7,2; 80 mM KCl; 10 mM MgAc <sub>2</sub> ; 0,5 M Sorbitol; 3% (w/v) BSA (fettsäurefrei)
Importpuffer II:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,2; 80 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 250 mM Sucrose; 3% (w/v) BSA (fettsäurefrei)
SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA
SEMK-Puffer:	SEM; 80 mM KCl
SHKCl-Puffer:	50 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 80 mM KCl; 0,6 M Sorbitol

### 3.8 Immunologische Methoden

#### 3.8.1 Antigengewinnung von *ScTim16*, *NcTim22* und *NcTim54*

Um das Antigen zur Immunisierung eines Kaninchens zu erzeugen, wurde der offene Leserahmen *ScTIM16* in ein den pQE30 Vektor kloniert (Qiagen). So konnte dessen Expression in *E. coli* XL1-Blue Zellen induziert und das Antigen über Ni-NTA gereinigt werden. Für *NcTim54* verwendete man lediglich den Teil des Proteins, der einen Loop zwischen den beiden potentiellen Transmembrandomänen bilden würde. Von *NcTim22* klonierte man den Bereich zwischen dem Startcodon und der zweiten Transmembrandomäne zur Expression in Bakterien in das Plasmid pMalcRI. Auch dieses Konstrukt wurde in MH1-*E. coli*-Zellen transformiert. Die Reinigung des Antigens erfolgte über eine Amylosesäule.

#### 3.8.2 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen (Sollner *et al.*, 1990)

200 µg der beschriebenen Antigene wurden mit dem gleichen Volumen »Titermax« der Firma CyrRX, Norcross, USA, heftig gemischt und die entstandene homogene Emulsion subkutan in Kaninchen injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen, wobei Titermax durch »Freundsches Adjuvans Incomplete« (Behringwerke, Marburg) ersetzt wurde. Vor der ersten Injektion (Präimmunserum), sowie 10 bis 12 Tage nach den Injektionen wurde den Kaninchen 10-20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, das nach ca. 60 min bei

Raumtemperatur vollständig geronnen war. Durch zwei Zentrifugationen (3000xg; 5 min; 2°C und 12000xg; 15 min; 2°C) wurde das Serum von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und das Komplementsystem durch 30 minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert. Die Antiseren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.8.3 Kopplung von Antigenen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Um eine spezifische Antigensäule zur Affinitätsreinigung von Immunsereen zu erhalten, wurden die Antigene über freie Sulfhydrylgruppen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham) gebunden (Harlow *et al.*, 1988). Dazu musste das Antigen zunächst in einen geeigneten Puffer transferiert werden. Die gereinigten Antigene für die Gewinnung der Antikörper gegen *NcTim22* oder *NcTim54* waren unter nativen Bedingungen gereinigt worden. Diese Antigene wurden durch die Verwendung einer PD10-Gelfiltrationssäule in Kopplungspuffer umgepuffert. Im Falle von *ScTim16* musste das Antigen unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung von Guanidiniumhydrochlorid gereinigt werden. Auch dieses Antigen wurde durch Umpuffern mit einer PD10-Säule in Kopplungspuffer mit Zusatz von 6 M Guanidiniumhydrochlorid transferiert.

Etwa 0,4 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B werden in 1 mM HCl, pH 2,8 geschwollen und mit ~200 ml 1 mM HCl auf einem Glasfilter gewaschen. 1ml des Säulenmaterials wurde in eine Säule überführt, die Salzsäure ablaufen gelassen und ~4 mg Antigen in 1,5 ml des entsprechenden Kopplungspuffers zugegeben. Das Antigen ließ man eine Stunde binden, dann wurde die Säule mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Freie reaktive Gruppen wurden durch Inkubation mit 1 M Ethanolamin, pH 8 für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde die Säule dreimal alternierend mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Die Säule kann mit 0,05% Natriumazid versetzt bei 4°C verwahrt und mehrfach zur Antikörperreinigung verwendet werden.

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3; 0,5 M NaCl;  
(6 M Guanidiniumhydrochlorid)

Waschpuffer 1: 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0; 0,5M NaCl

Waschpuffer 2: 0,1 M Tris/HCl, pH8; 0,5M NaCl



### 3.8.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Säule, an die das entsprechende Antigen gebunden worden war, wurde mit 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 äquilibriert. Mittlerweile wurden 6 ml des entsprechenden Antiserums mit 24 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt und mit folgenden Proteaseinhibitoren versetzt: 1mM PMSF, 1mM EDTA, 0,5 mM o-Phe; 1 µg/ml Leupeptin. Diese antikörperhaltige Lösung ließ man dreimal über die Säule passieren, um die Antikörper an das gekoppelte Antigen zu binden. Danach wurde die Säule zunächst mit 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH7,5, dann mit 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH7,5 mit 0,5 M NaCl gewaschen.

Die Elution der Antikörper von der Säule erfolgte in drei Schritten mit Lösungen verschiedener pH-Werte. Gesammelt wurden jeweils 1 ml Fraktionen der Elutionen. Die erste Elution erfolgte mit 10 ml 100 mM Natriumcitrat, pH 4,0, die zweite mit 10 ml 100 mM Glycin, pH 2,5. Zur Neutralisation der gesammelten Fraktionen wurden jeweils 200 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,8 zugegeben. Danach wurde die Säule mit 10 ml 10 mM Tris, pH 8,8 auf einen alkalischen pH-Wert äquilibriert. Die letzte Elution erfolgte mit 10 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 11,5. Die Neutralisation dieser gesammelten Fraktionen erfolgte mit 1 M Glycin, pH 2,2.

### 3.8.5 Koimmunfällung von Proteinen

Zur Koimmunfällung wurden die entsprechenden Antikörper an Protein-A-Sepharose gebunden. Das Säulenmaterial wurde zunächst dreimal mit TBS gewaschen. Dann wurden je nach Konzentration der Antikörper zwischen 50 und 200 µl der gereinigten Fraktionen zu 50 µl Säulenmaterial in einem Gesamtvolumen von 1 ml TBS zugesetzt. Die Bindung der Antikörper erfolgte durch Rollen bei 4°C für 1-3 h. Nach der Bindung der Antikörper wurde das Säulenmaterial dreimal mit 1 ml Solubilisationspuffer gewaschen und äquilibriert. Die Mitochondrien wurden für die Koimmunfällung von interagierenden Proteinen unter milden Bedingungen solubilisiert. Die Mitochondrien (1 mg/ml) wurden für eine Stunde solubilisiert und nicht gelöstes Material durch Ultrazentrifugation (20 min, 2° C, 109000xg, TLA45) pelletiert. Der Überstand aus 100 µg solubilierten Mitochondrien wurde für eine Immunfällung für 1-3 h mit Protein-A-Sepharose mit den entsprechenden gebundenen Antikörpern bei 4°C inkubiert. Danach wurde ungebundenes Material durch Zentrifugation abgetrennt und die Protein-A-Sepharose dreimal mit Solubilisationspuffer gewaschen. Die

Elution kogefällter Proteine erfolgte durch Aufkochen des Säulenmaterials mit SDS-Probenpuffer.

TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
Solubilisationspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 80 mM KCl, 10% Glycerol, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1% (w/v) Digitonin
SDS-Probenpuffer:	2% (w/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

### **3.8.6 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen**

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf fixierten Proteinen wurde 1 h in 5% (w/v) Magermilchpulver oder 3% BSA in TBS oder 1x NET-Gelatine inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine auf der Membran abzusättigen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antiseren, die je nach Titer 1:200 bis 1:10000 im entsprechenden Blocking-Reagenz eingesetzt wurden. Danach wurde die Membran dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift 0,01% Triton X-100 dem TBS zugesetzt war. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-Immunglobulinen mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase, 1:10000 im entsprechenden Blockingreagenz verdünnt. Danach wurde die Membran analog zu den Waschschriften nach der Inkubation im ersten Antikörper gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch aus Reagenz 1 (100 mM Tris-HCl, pH8,5; 0,044% (v/v) Luminol; 0,066 (v/v) p-Cumarinsäure) und Reagenz 2 (18 $\mu$ l 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100ml Tris-HCl, pH 8,5) behandelt. Durch die ablaufende Chemilumineszenzreaktion konnten Banden mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert werden.

TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
10xNET-Gelatine:	1.5 M NaCl 0.05 M EDTA 0.5 M Tris, pH 7.5 0.5% Tx-100 25 g Gelatine ad 1000 ml

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Identifikation von Komponenten der Proteinimportmaschinerien der inneren mitochondrialen Membran in *Neurospora crassa***

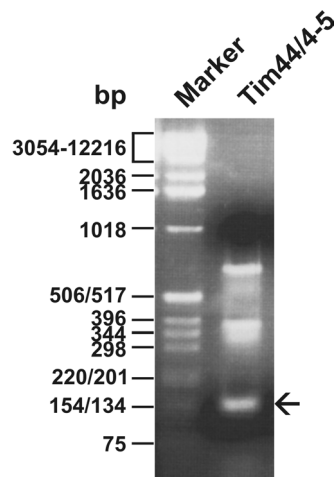
Zu Beginn der Arbeit war ein Großteil der Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerien in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt. Man kannte dort bereits viele Komponenten der Translokase der äußeren Membran sowie die Komponenten Tim17, Tim23 und Tim44 der TIM23-Translokase und die Komponenten Tim22 und Tim54 der TIM22-Translokase. Auch die kleinen Tim-Proteine Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13 waren bereits identifiziert. Für viele biochemische und strukturelle Untersuchungen ist es unerlässlich, große Proteinmengen eines bestimmten Proteins oder Proteinkomplexes in reiner Form zur Verfügung zu haben. Dies ist mit Hefe als Modellorganismus nur mit sehr hohem Aufwand möglich. Deshalb sollte *Neurospora crassa* als Modellorganismus etabliert werden. Dieser Pilz kann sehr leicht in großen Kulturen angezogen werden. Die Zellmasse, sowie die Menge an Mitochondrien, die aus diesem Organismus gewonnen werden kann, ist im Vergleich zur Bäckerhefe erheblich höher. *Neurospora crassa* bietet die Möglichkeit, die Komponenten der mitochondrialen Translokationsmaschinerien in ausreichenden Mengen im Komplex zu reinigen und zu untersuchen. Dies wurde bereits für den TOM-Komplex erfolgreich durchgeführt. Der TOM-Komplex aus *Neurospora crassa* wurde nach Solubilisation der mitochondrialen Membranen mit dem milden Detergens Digitonin über einen Histidinylanhang an Tom22 mittels Ni-NTA-Reinigung und anschließender Ionenaustauschchromatographie in großen Mengen sehr sauber aufgereinigt. Dies ermöglichte es den TOM-Komplex elektronenmikroskopisch zu untersuchen, ihn in Lipidvesikel zu rekonstituieren und den Import über den TOM-Komplex in diesem rekonstituierten System zu erforschen (Ahting *et al.*, 2001; Ahting *et al.*, 1999; Künkele *et al.*, 1998a; Künkele *et al.*, 1998b; Vasiljev *et al.*, 2004). Um entsprechende Experimente für die Innenmembrankomplexe durchzuführen, sollten diese aus *N. crassa* gereinigt werden. Zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns waren nur wenige Komponenten der TIM-Komplexe in *Neurospora crassa* bekannt. Um die Komplexe aus *Neurospora crassa* reinigen zu können, mussten deshalb zunächst deren Komponenten identifiziert werden.

#### 4.1.1 Identifikation von Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie mit degenerierten Primern

Um neue Komponenten der TIM-Komplexe und des mitochondrialen Importmotors zu identifizieren, wurden die Proteinsequenzen bereits bekannter Komponenten verschiedener Organismen miteinander verglichen. Dabei erwies sich ein solcher Vergleich besonders innerhalb des Reiches der Pilze als hilfreich. Unter Berücksichtigung der Degeneriertheit des genetischen Codes und der Codon-Nutzung bei *Neurospora crassa*, wurden Primer für Bereiche, die innerhalb der Pilze eine möglichst hohe Homologie aufwiesen, generiert. Mit diesen Primern wurden PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei genomische DNA oder cDNA-Banken von *Neurospora crassa* als Matrize verwendet wurden (siehe 3.4.3.3.2). Erhielt man ein PCR-Produkt der erwarteten Größe, so wurde es aus dem Agarosegel isoliert, in den pCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Auf diese Weise war die Komponente Tim17 aus *Neurospora crassa* im Labor von Frank Nargang identifiziert worden (nicht publiziert). Die Suche nach Tim23 in *Neurospora crassa* wurde durch Frau Dejana Mokranjac durchgeführt, die nach den kleinen Tim-Proteinen Tim9 und Tim10 durch Frau Andreja Vasiliev. Die Proteine Tim8 und Tim13 waren bereits im Rahmen des Sequenzierungsprojektes des Genoms von *Neurospora crassa* identifiziert worden (<http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>).

##### 4.1.1.1 Identifizierung von Tim44 aus *Neurospora crassa*

Die degenerierten Primer zur Identifizierung des *tim44* Gens wurden durch Vergleich der bekannten Sequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* und *Schizosaccharomyces pombe* generiert. Die Bereiche, gegen die die Primer gerichtet waren, sind in der Abb. 9 mit Pfeilen markiert. Eine PCR mit den rot markierten Primern (Tim44-4 und Tim44-5) und cDNA von *Neurospora crassa* als Matrize führte zu einem PCR-Produkt der erwarteten Größe von etwa 140 bp (siehe Abb. 7). Es handelte sich dabei um das entsprechende Fragment aus *tim44* von *Neurospora crassa*, was durch Sequenzieren des PCR-Produkts nach Klonierung in das Plasmid pCRII-TOPO gezeigt werden konnte.



**Abb. 7: PCR mit den degenerierten Primern Tim44-4 und Tim44-5**

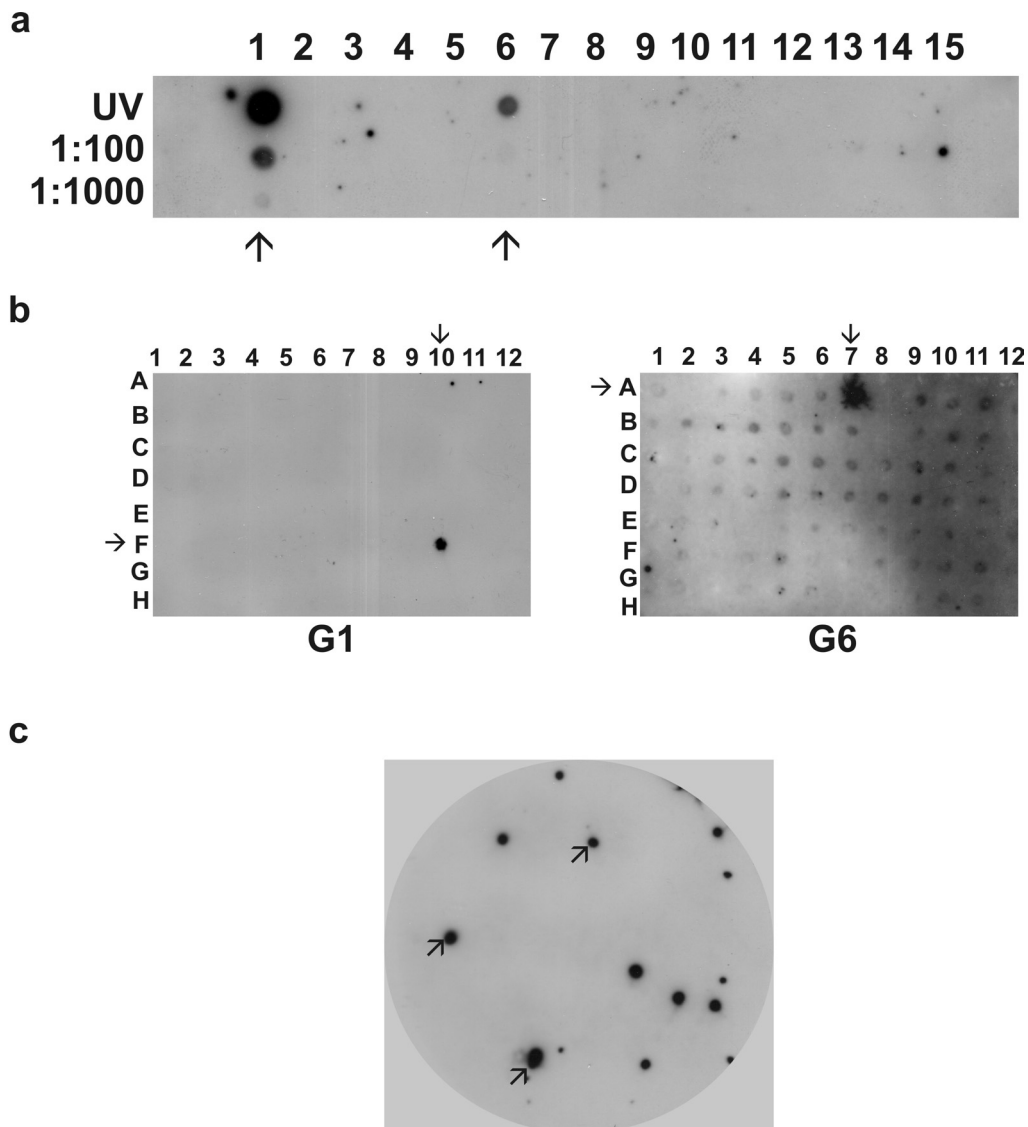
Unter Verwendung degenerierter Primer wurden PCR-Reaktionen mit *Neurospora crassa* cDNA-Banken oder genomischer DNA von *Neurospora crassa* als Matrize durchgeführt. Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Amplifikation eines Fragments von *tim44* aus *Neurospora crassa* aus einer  $\lambda$ Zap2 cDNA-Bank. Das Amplifikat hat eine Größe von etwa 140 bp und konnte durch Sequenzierung als Fragment von *tim44* aus *N. crassa* identifiziert werden. Dieselben Primer wurden verwendet, um eine Sonde gegen das *tim44*-Gen zu synthetisieren.

Dieselben Primer wurden verwendet, um eine Digoxigenin markierte Sonde gegen diesen Bereich des *Neurospora crassa tim44* Gens herzustellen. Diese Sonde wurde dazu verwendet, Cosmidbanken von *Neurospora crassa* zu durchmustern, um die genomische Sequenz des *tim44*-Lokus zu identifizieren (siehe 3.4.8.1 und 3.4.8.2). Auf diese Weise fand man zwei Cosmidklone, die das *tim44* Gen enthielten (siehe Abb. 8a, b).

Jetzt konnte man durch die Synthese von Primern, die im Randbereich der bereits bekannten Sequenz von *tim44* angesiedelt waren, und mit den Cosmidklonen als Matrize weitere Sequenzierungen durchführen. Damit erhielt man die benachbarten, noch unbekannt Bereiche des Gens und deren flankierenden Sequenzen.

Aber auch die cDNA-Sequenz von *tim44* aus *Neurospora crassa* sollte identifiziert werden (siehe 3.4.8.4). Dazu wurden *E. coli*-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der  $\lambda$ Zap2-cDNA-Bank, die die gesamte cDNA aus *Neurospora crassa* repräsentierte, infiziert und ausplattiert. Nach Wachstum über Nacht erhielt man einen Bakterienrasen auf dem sich klare Plaques gebildet hatten, die auf die Infektion mit einem Phagen zurückzuführen waren. Mittels einer Nylonmembran wurde ein Abbild der Platte hergestellt (*Phage lift*). Durch Hybridisieren mit der beschriebenen Sonde konnten die Phagenplaques identifiziert werden, die auf Phagen zurückzuführen waren, die die cDNA von *tim44* enthielten. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses *Screening*verfahrens wurde sichergestellt, dass die isolierten Phagen auf nur einen Klon zurückzuführen waren (siehe Abb. 8c). Mithilfe des Helferphagen

M13KO7 (Stratagene) wurden die  $\lambda$ Zap2-Klone als Phagemid wiederhergestellt, isoliert und sequenziert. Auf diese Weise konnte die cDNA von *tim44* aus *N. crassa* identifiziert werden.



**Abb. 8: Durchmustern der *Neurospora crassa* Cosmidbank und  $\lambda$ Zap2-cDNA-Bank**

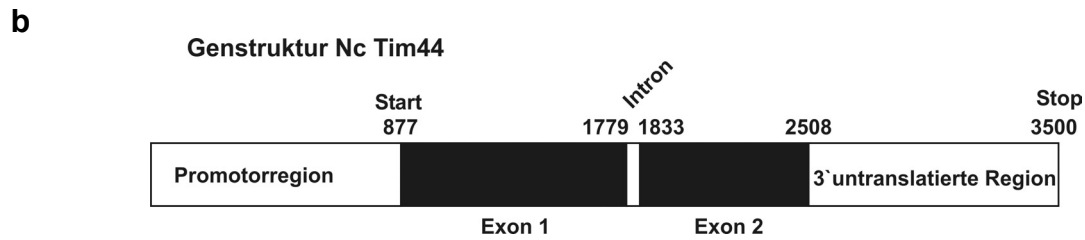
(a) Mittels einer Sonde, gerichtet gegen *tim44* von *N. crassa*, wurden zunächst Cosmid-DNA-Pools der pMOcosX Cosmid-Bank durchmustert, die in drei verschiedenen Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetropft worden waren. Ein Pool entspricht den 96 Cosmidklonen einer 96-well-Platte. Auf diese Weise konnten die 96-well-Platten identifiziert werden, die einen Klon enthielten, der die genomische Sequenz von *tim44* kodierte. In diesem Fall handelte es sich um die Platten G1 und G6. (b) Alle Cosmidklone dieser Platten wurden auf eine LB<sup>Amp</sup>-Platte gestempelt und deren DNA auf eine weitere Nylonmembran aufgebracht (Koloniehybridisierung) und wieder mit der Sonde nach Cosmiden gesucht, die die genomische *tim44*-Sequenz enthielten. Auf der Platte G1 handelte es sich um den Klon F10, bei der Platte G6 um den Klon A7. (c) Durchmustern der  $\lambda$ Zap2-cDNA-Bank, nach Klone die die *tim44*-cDNA aus *N. crassa* kodierte. Mit Pfeilen markiert sind Beispiele für Phagenplaques, die positiv mit einer Sonde gegen *tim44* getestet worden waren.

Die identifizierte kodierende Sequenz verschlüsselt ein 526 Aminosäurereste langes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 59 kDa und einem pI von 8,9. Es besitzt keine

Transmembrandomäne. Die Homologie zu Tim44 aus Hefe beträgt etwa 29,8 %. Das Tim44 Protein aus *Neurospora crassa* zeichnet sich durch einen längeren Aminotermius aus (siehe Abb. 9).

**a**

NcTIM44p	.....MNAYRHVLRITSPGAPLRATAVPHTTHVRSPTA.....SRLRL	36
AnTim44p	MIAATRLPATARVAALRSQVLALRATGGNSAALQRSLIQSPLYATSRSIDCAKSPVSRLL	60
CaTIM44p	.....	0
ScT44p	.....	0
SpT44p	.....	0
NcTIM44p	SSRASRVNTTESRISPATPISAQEIPLLRSFPFPNAIQARSHASFRALQQ.QEQPKQQT	95
AnTim44p	SPYASLHLT.....RSFHVGTPLRQQKQEQTEKKS	90
CaTIM44p	.....	0
ScT44p	.....	0
SpT44p	.....	0
NcTIM44p	PETEPKAQEEPTGKKESKSEEAKEEKEGKSEGEPEKKEKEDAPPPPHGDKTPEWQVFMETM	155
AnTim44p	EETKQEKNEESKDED.....KSEQ..KKEDKEDAPPPPHGDKSPWQVFRDITL	136
CaTIM44p	.....MLRSGIILKAQPATAIIRPLSRCFHYTNINFNDDKPPSSDSPLKLVFFDTF	48
ScT44p	..MHRSTFIRTSGTSSRRTLARYRSQYTGLLVARVLFSTSTTRAQGGNPRSPLOIFRDTF	58
SpT44p	.....MFLSRKITKNARTIVQCQRFFQTSIFSQNAAPQSPKIKVFMDF	43
NcTIM44p	QTEFFKQSCQEWNESTKALAAASANQIAESEAIRRARQAYEAT.SGTV..SSTAGKVVKTAT	212
AnTim44p	QQEFKASKEWNESTKALASSAHQFAENENVKRARAAYEAA.QGAA..SSRTASALKGTGR	193
CaTIM44p	KTEVKKSNELKENIKALQDESGRMAESEAFAKRAKAYAKAQLGSTAA....GKVLKKGAE	104
ScT44p	KKWEKSOELQENIKTLQDASGKLGSEAYKKAREAYLKAQRGSTIV...GKTLKKTGE	114
SpT44p	RAELKKSQELQDSVKALQDSSGSLSESDTFKKARDAYEKARSGTTAASSFTGKTVGKAGA	103
NcTIM44p	AVGKGAQWITWETPVMKGVRRG....ANITGEVLDKATKPIRETEAYKN...VKDVIDDG	264
AnTim44p	VIGKSASWITWTPVVKGLRKG....VNATTSGIEKATRPVRETEVYKTAVGGVKQAIIDDG	249
CaTIM44p	TVGDAAAYKAWESPVGKGVRTGVKVTADVADKAFF....PVRKTKQVYKDMSEVIDDGS...	157
ScT44p	TMEHATKAWESSELGKNTKRAAAATAKKLDESFE....PVRQTKIYKEVSEVIDDGE...	167
SpT44p	KIGSYAQKAWESAPVQLSKKVISSSTANTVATGVDTATKPVRETAIFYKTIKQTMDSGST..	161
NcTIM44p	SSSRYGGWAEKEERKR...REKWLKESAGKGPQILEEDPN....AGTNVTLHKDAAWK	316
AnTim44p	SSSRYGGWTEKEERRMRQLREQEELKSGRRKAEPMVEDPNVVISAGTNITLHKDSAWK	309
CaTIM44p	.STAYGGFLTKQOREALR...MKELEKRRKQGFQGPVRENDEAGGALVATEHKPTGPTMG	213
ScT44p	.SSRYGGFITKEQRLKR...ERDLASGRHRRAVKSNE...AGTAVVATNIESKESFQK	220
SpT44p	.SSRYGFYADKEQRKRLREEFERRNRMFASSARIQPNEDVQSVVVHSNPSWKN.....	213
NcTIM44p	EAWRDFRDSNKFVQNVFGLKTYVEESENPLISTAR....SITDKIGSFFAENETAQVIKK	372
AnTim44p	ESWREFKDSNPFMMQKLFSLKETYNESSENPLISTAR....SISDRIAGFFAENETAQVVKK	365
CaTIM44p	EKWENFKLKSPIGRGVVYLQERWEESENGLIALIRTIVEKVTGFFS....EIEQAKVVKQ	269
ScT44p	KVEDFKKTVVGRSISQSLKNKLWDESENPLIVVMRKITNKVGGFFA....EIESSRYVYSQ	276
SpT44p	KVEQIKNESRLVRRKIQELKKSQY.ESEHPVSSIRDMADSSISGVWSRMFSEIEASQVMRR	272
NcTIM44p	LRELDPGFNMENFLMELREYILPEVLEAYVKCDVETLKLWLSLQOYSGYEALTKOYLQAG	432
AnTim44p	FREMDENFQMAFLREMREYILPEVLDAYVKCDIETLKLWLSLQOFHVEALTKOITTAG	425
CaTIM44p	LKLMDBSFRLTDFQRTLTNYIVPEVVDAYTKNDKVLKELWLSLAPYNVWEANNKQFIIQQG	329
ScT44p	EKLMDBTFNSNLSFTRHLREYIVPELLEAYVKCDVVKVKKWFSLAPFNVYAAQQKIFKEQD	336
SpT44p	EKEIDBSFNTEHFLQYLRREYIVPEVTEAYVKCDKEVVKLWLSLAPFSVYETTTKEYAKHG	332
NcTIM44p	LKSDGRILDIRGVDVLKARMLPEGDIIPVFVITORTQEVHVYKNAKTGKLAAGMEDKVQIV	492
AnTim44p	LKSDGRILDIRGVDVMSARMLDEGDIIPVFVVMORTQEVHVYRNKVTNELAAGMEDKVQIV	485
CaTIM44p	LFSDSRVLDIRGVEIVTCKSLQPNQVPIVVSQRQEIHLRYKAKTGEIAAGTEDHIQLS	389
ScT44p	VYADGRILDIRGVEIVSAKILLAPQDIPVLVVGQRQEIINLYRKKKTGEIAAGDEANILMS	396
SpT44p	VVSVGKILDIRGVDIMSQRLLQPNQIPVFIVTFRQEVHMFKDASSGELVAGKDDRIQQC	392
NcTIM44p	TYAIGITRIPEDVNNPETRGWRLLIEMQKSGRDYI.	526
AnTim44p	NYVMGLTRIPEDVNNPETKGRLLIELQKAARDYI.	519
CaTIM44p	TYAMVLTII.PEEFDNKVTDGWKIVFARGGSRPFH	423
ScT44p	SYAMVTRDPEQIDDETEGWKILEFVRGGSRQFT	431
SpT44p	TYASVTRVELELDNPETRGWRIVDFARARAVDYF	427



**Abb. 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Tim44 Homologen verschiedener Pilze.**

(a) Die Identität von Tim44 innerhalb der gezeigten Pilze beträgt 46,37%. Mit Pfeilen markiert sind die Bereiche, gegen die degenerierte Primer generiert worden waren und die Orientierung der Primer. Rote Pfeile kennzeichnen die degenerierten Primer, mit welchen erfolgreich ein Fragment von *tim44* aus *Neurospora crassa* amplifiziert werden konnte, was zu dessen Identifizierung führte. Nc: *Neurospora crassa*, An: *Aspergillus nidulans*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*. (b) Genstruktur von *tim44* aus *Neurospora crassa*.

#### 4.1.1.2 Identifizierung von Tim54 in *Neurospora crassa*

Das *tim54*-Gen von *Neurospora crassa* konnte durch PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern identifiziert werden. Die verwendeten Primer sind im Sequenzvergleich der Tim54 Proteine verschiedener Pilze markiert (siehe Abb. 10). Rot gekennzeichnet sind die Primer, mit welchen erfolgreich das erste Fragment des *tim54*-Gens aus *Neurospora crassa* aus einer  $\lambda$ Zap2-cDNA-Bank amplifiziert wurde. Es erfolgte zunächst die Klonierung des PCR-Produkts in das pCRII-TOPO-Plasmid und dessen Sequenzierung. Gegen das identifizierte Fragment wurde eine digoxigeninmarkierte Sonde generiert. Diese wurde benutzt, um einen Cosmidklon zu isolieren, der die genomische Sequenz von Tim54 enthielt. Ausgehend von dem identifizierten Fragment wurde das gesamte Gen und seine flankierenden Sequenzen, Promotor- und 3'untranslatierter Bereich, sequenziert. Auf die Identifizierung eines Phagemids, das die entsprechende cDNA kodierte, wurde in diesem Fall verzichtet. Um die entsprechende cDNA zu finden, ging man vielmehr wie folgt vor. Durch Übersetzen der genomischen DNA in allen drei Leserahmen und Vergleich der erhaltenen Proteinsequenzen mit den Proteinsequenzen von Tim54 anderer Pilze konnte der Bereich des Starts des offenen Leserahmens stark eingegrenzt werden. Gegen Bereiche mit potentiell Startcodon wurden Primer generiert, die zusammen mit einem revers orientierten Primer verwendet wurden, der gegen einen bekannten Bereich der cDNA gerichtet war. Nur die PCR-Reaktionen lieferten ein Amplifikat, bei welchen sowohl der Startprimer als auch der interne Primer ihre Matrize binden konnten. Somit enthielt wahrscheinlich das größte Amplifikat das Startcodon. Das erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert.

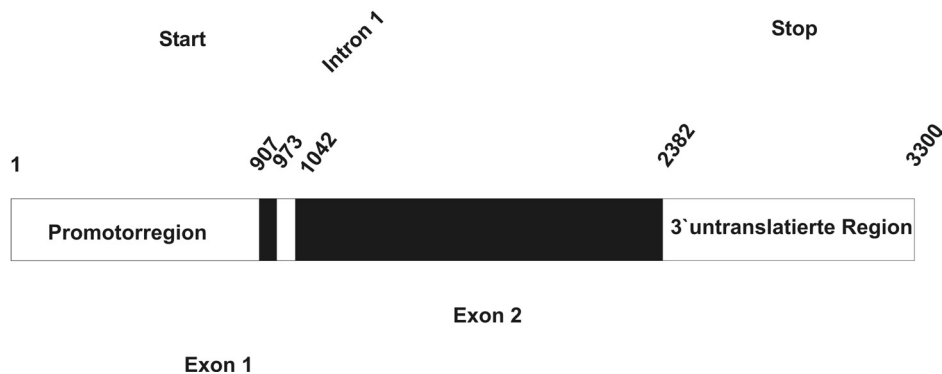


**a**

NcTIM54p	MADVPVPASTAPPAAPAATTATPPPPPPPPKALRPQNALRMLGLNLPNKLP	60
ScTIM54	.....MSSESGKPIAKPIRKPGYTNPALKALGIPALR..LP	39
CaTIM54p	.....MPDANEVVKPKKGSNPALRMMGIPRIS..LP	34
SpTim54	.....MLKTIKSYMPCRMS	15
NcTIM54p	IFWTVSASITTAATTYDRREKRNRNIAKWRHAEVHLAAEPI	120
ScTIM54	IFWTVSASITTAATTYDRREKRNRNIAKWRHAEVHLAAEPI	96
CaTIM54p	IFWTVSASITTAATTYDRREKRNRNIAKWRHAEVHLAAEPI	91
SpTim54	IFWTVSASITTAATTYDRREKRNRNIAKWRHAEVHLAAEPI	72
NcTIM54p	DGLRVAQDHYTEYVVKPVLAASGLDWEFVQGRREGDVR	180
ScTIM54	DYLESSLKVVRRYVVKPVLYYAGLDYELVQEDRQGI	155
CaTIM54p	DFLDESCLKLFRKFIKPVLNAGVDFEIFSESQGD	151
SpTim54	DGIYVAREEFEEYIRPIFNAAAIEFETVESKGE	132
NcTIM54p	REPTKDELIEIYRQQRGIKDYEGVRGDVVI	210
ScTIM54	VKEPNQTVAKPSGSSTSKISSLLPFNKIIQDPAEEDS	215
CaTIM54p	ESNGNQDNDEEELKSRSDLYKAKDVLGLYKVF	190
SpTim54	LLSVLKPSVDPPAIVLL	149
NcTIM54p	.....GRHTWKEYLRGLHEGWLGP	242
ScTIM54	YTMPKPKHIISEDALTKDPILSGGVICLGRGAYKEY	275
CaTIM54p	.....SEDAIDDSSA..GGIICVGRGAYKEY	238
SpTim54	.....GRHALKEELYGVRYGFSDDIM	181
NcTIM54p	PAPAAAEGSTSTEDKPAEEKKEE.....EAPKPKRPP	285
ScTIM54	MTGVVEANQIESKVSSESGATELVDAEKETALEEAK	335
CaTIM54p	LRFLVDDFGERTATIVNKS.....	258
SpTim54	NNKEEKKEEKEGKDDKDDKEDSNDTKNDKKISKNE	241
NcTIM54p	SSETLHPLTPQELTPAVPIREPHILGFLNTPTRMVR	345
ScTIM54	SDQYPLDLQIASSELQTPNGEFIRNPNTNIPLLIN	395
CaTIM54p	.....	258
SpTim54	PLPNL.....LGFSENTPKRLSRFFKRRELADEL	282
NcTIM54p	EFQQQTNPDAPS....TDSVQYEQAKELEWEEQ	401
ScTIM54	RFYVEDVCSVNCVQRTRIRPFDIAKDIDLAKDEEK	455
CaTIM54p	.....RPFVY..KDVLMK..EEEMDPKKWVEK	296
SpTim54	TKFPKQDGTLLLAEEETDWPQOFFTRSLENRIWT	342
NcTIM54p	VMDPRLAHRMRRFALTPEDEDRVSKIKVPEEEVEG	461
ScTIM54	DPRIKTHMFVYEKPPKEEPESDI.....	478
CaTIM54p	DERVTSRMKCLNKLFLNGPLFLFVYFELS	330
SpTim54	QDKYE.....	347
NcTIM54p	LEDKDVE	468
ScTIM54	.....	478
CaTIM54p	.....	330
SpTim54	.....	347

b

## Genstruktur Nc Tim54



**Abb. 10: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Tim54 Homologen verschiedener Pilze.**

(a) Die Identität innerhalb der gezeigten Pilze beträgt etwa 26,01 %. Mit Pfeilen markiert sind die Bereiche, gegen die degenerierte Primer generiert worden waren. Rote Pfeile kennzeichnen die degenerierten Primer, mit welchen erfolgreich ein Fragment von *Neurospora crassa tim54* amplifiziert werden konnte. Nc: *Neurospora crassa*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe* (b) Genstruktur von *tim54* in *Neurospora crassa*.

Nachdem ein Antikörper gegen Tim54 zur Verfügung stand, konnte überprüft werden, ob es sich wirklich um das richtige Startcodon handelte. Nach Klonierung des potentiellen offenen Leserahmens in pGEM4 wurde mittels Transkription und Translation radioaktiv markiertes Tim54-Protein hergestellt. Das radioaktiv markierte Protein zeigte im SDS-PAGE dasselbe Laufverhalten wie das Protein, das durch den Antikörper gerichtet gegen *NcTim54* nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 13). Das kodierte Protein hat ein Molekulargewicht von 53 kDa und einen isoelektrischen Punkt von ca. 6,5. Die Identität der Sequenzen der Tim54 Proteine in *S. cerevisiae* und *N. crassa* beträgt lediglich 14,3%. Dabei zeigt der C-terminale Bereich der Tim54-Proteine in beiden Organismen nur wenig Homologie, im N-terminalen Bereich findet man jedoch signifikante Homologien innerhalb der Proteinsequenz. Dies gilt auch, wenn Tim54 Proteine weiterer Pilze für den Vergleich hinzugezogen werden. Für *ScTim54* waren zwei Transmembrandomänen vorhergesagt, die Vorhersage für *NcTim54* zeigte allerdings nur eine offensichtliche Transmembrandomäne nahe des Aminoterminus (Kerscher *et al.*, 1997). Der homologe Bereich zu der potentiellen zweiten Transmembrandomäne in *Saccharomyces cerevisiae* enthält bei *Neurospora crassa* eine geladene Aminosäure. Somit besitzt Tim54 in *Neurospora crassa* wahrscheinlich nur eine Transmembrandomäne, was in weiteren Versuchen bestätigt wurde.

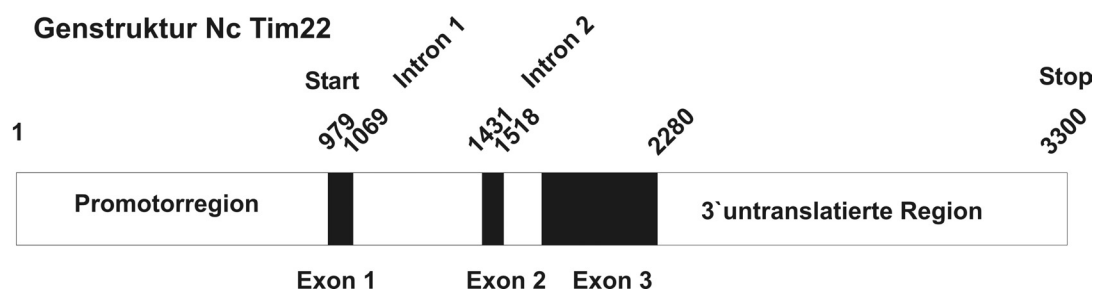
#### 4.1.1.3 Identifizierung von Tim22 aus *Neurospora crassa*

Für Tim22 wurde zunächst versucht, das kodierende Gen durch PCR mit degenerierten Primern zu identifizieren. Die PCR-Reaktionen wurden zum einen mit genomischer DNA aus *Neurospora crassa* als auch mit cDNA-Banken durchgeführt. Leider führte dieser Ansatz nicht zur Identifikation eines Fragments des *tim22*-Gens. Da die Sequenzierung des Genoms von *Neurospora crassa* zu dieser Zeit zwar noch nicht abgeschlossen war, jedoch bereits Teile des Genoms bekannt waren und regelmäßig aktualisiert wurden, war man im Falle von *tim22* in der Lage, eine zu *tim22* in *S. cerevisiae* homologe Sequenz in der Datenbank zu finden (<http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>). Allein der Vergleich der veröffentlichten genomischen Sequenz mit bekannten Sequenzen von *tim22* in verschiedenen Pilzen, führte zur Identifikation eines Großteils der kodierenden Sequenz für *tim22* in *N. crassa* (siehe Abb. 11). Die Exons 2 und 3 sowie das Intron 2 konnten so bestimmt werden. Die kodierende Sequenz für das Exon 1 und die Position des ersten Introns jedoch mussten noch identifiziert werden. Zum Auffinden von Cosmidklonen, die das *tim22*-Gen enthielten, wurde eine Sonde mit Primern generiert, die im Intron 1 und dem Ende des Gens gewählt worden waren. Um das korrekte Startmethionin für Tim22 in *Neurospora crassa* zu finden, wurden wiederum Primer gegen Bereiche generiert, die ein potentielles Startcodon enthielten. Auf diese Weise konnte in analoger Weise zu *tim54* der Start der kodierenden Sequenz bestimmt werden. Durch den Vergleich der cDNA-Sequenz und der genomischen Sequenz ließ sich die Sequenzen der Introns genau bestimmen. Später bestätigte der Vergleich der Größe des radioaktiv markierten Proteins mit dem Protein, welches durch den Antikörper detektiert wurde, die korrekte Identifizierung des Startcodons (siehe Abb. 13). Der verwendete Antikörper war gegen den Bereich des potentiellen Startmethionins bis zur zweiten Transmembrandomäne des Proteins generiert worden. Das identifizierte Protein besitzt eine molekulare Masse von etwa 19,5 kDa und einen pI von 7. Die Identität zwischen den Tim22-Proteinen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* beträgt etwa 38%.

a

NcTIM22p	MNFFGMPGGAAPSGGAAPGGYDPNDPNIKMMQKA.....MESCFAKTVMSSGAGFALG	53
ScTIM22p	MVYTGFGLEQISPAQKKPYNELTPEEQGERGAEMIMNF...MTSCP GKSVVSGVTGFALG	57
SpTIM22p	MSLSGLLPNLLGGNSPNADGNLTPEEKAAALQQA.....IIGYMNRISESCVFKSSMA	53
CaTIM22p	MSLWGVYTGPOPPKKPLQEMTQ...EEQAEEGARQMIGF...MNSCPGKTVMAGVSGFALG	55
NcTIM22p	CVFCMFMASMAYDTPYHSSTTPGTGPGANPAAAGIPGYKPV...LSSMPLKEQLKHGFKD	111
ScTIM22p	GVLGLFMASMAYDTP LHTPTPANTAATATAGNIGVGGISRTVQQISDLPFRQOMKLOFTD	117
SpTIM22p	GVLGFGGLGGIFGMFISSLDLQHID.....PKIYE.....KPFREQIRIQARD	95
CaTIM22p	GFFGLFMASMAYDTPIGTDAVKHISE.....LPEFKQOMKLOFTD	94
NcTIM22p	MGQRSYSTAKNFAKVGALFSGIECGIEGLRAKNDLGNVAAGCLTGAILAKNGGPOAAAV	171
ScTIM22p	MGKKSYSYSAKNGFYIGMIYAGVECVIESLRAKNDIYNGVTAGFFTGAGLAYKAGPOAALM	177
SpTIM22p	MGRSFSSTAKNFGLLGLIYSGSECCIEAFRAKTDIYNATAAGVFTGGALAVRSGPKAIVL	155
CaTIM22p	MAKRSYSYSAKNGFYIGMVYSGVECTIESLRAKHDIYNGVSAGCITGAGLAIKAGPOAALV	154
NcTIM22p	GCAGFAAFSAAIDAWMRMPSEED.....	194
ScTIM22p	GGAGFAAFSAAIDLYMKSEDGRPPQNDPKE.	207
SpTIM22p	GGAGFLFSYGIHKYMHWGE.....	175
CaTIM22p	GCAGFAAFSLAIDMYLNSDAAPPPKNDYDI.	184

b



**Abb. 11: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Tim22 Homologen verschiedener Pilze.**

(a) Die Identität innerhalb der dargestellten Pilze beträgt 44,28. Nc: *Neurospora crassa*, An: *Aspergillus nidulans*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*. Die Primer für die Synthese einer Sonde zur Identifikation eines Cosmidklons, der das *tim22*-Gen enthielt, wurden im ersten Intron und am Ende des Gens gewählt.

(b) Genstruktur von *tim22* in *Neurospora crassa*.

#### 4.1.1.4 Suche nach Tim18 in *Neurospora crassa*

Während der Arbeit wurde Tim18, welches eine hohe Homologie zur Succinat Dehydrogenase Untereinheit 4 (Sdh4) aufweist, in *S. cerevisiae* beschrieben (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Das entsprechende Homologe sollte in *N. crassa* identifiziert werden. In der Datenbank des Genomsequenzierungsprojekts von *N. crassa* war eine homologe Nukleotidsequenz zu finden. Gegen diese wurde eine Sonde generiert, und ein Cosmidklon isoliert, der dieses Gen beinhaltete. Es handelte sich dabei um die genomische Sequenz für die *sdh4*. Tim18 ist auch nach Vollendung der Genomsequenzierungsprojekte bisher nicht in *Neurospora crassa* nachgewiesen worden.

## 4.2 Der TIM22-Komplex in *Neurospora crassa*

### 4.2.1 Nachweis der identifizierten Proteine Tim22 und Tim54 in Mitochondrien

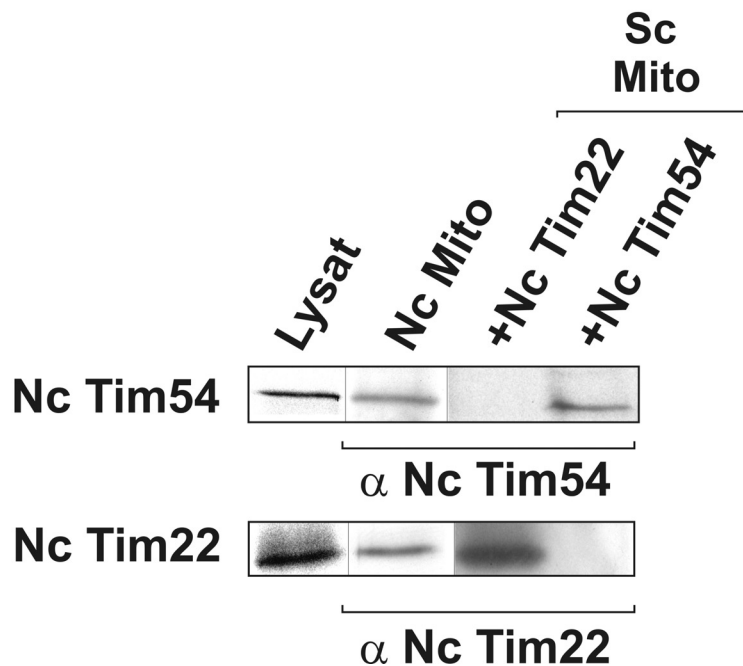
Um zu überprüfen, ob die identifizierten kodierenden Sequenzen für Tim22 und Tim54 korrekt waren, wurden zunächst Antikörper gegen diese Proteine generiert. Dies erlaubt den Vergleich der Größe des *in vitro* synthetisierten Proteins, basierend auf der identifizierten potentiell kodierenden Sequenz, mit dem endogenen Protein, welches durch Antikörper detektiert wird. Dadurch sollte das Startmethionin beider Proteine bestätigt werden. Um Antikörper herzustellen, wurde die kodierende Sequenz vom potentiellen Startcodon bis zur zweiten Transmembrandomäne, in das Plasmid pMalcRI kloniert (MBP-*NcTim22A*-Ab2). Dies ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus dem Maltosebindeprotein MBP am Aminoterminus und dem beschriebenen Bereich von *NcTim22* in *E.coli* (siehe 3.4.4.3.9). Dieses Fusionsprotein wurde über eine Amylosesäule gereinigt, und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet (siehe 3.6.11). Antikörper gegen *NcTim22* wurden aus diesem gewonnenen Antiserum über eine Affinitätsäule gereinigt und aufkonzentriert, an die das Fusionsprotein MBP-*NcTim22A*-Ab2 gekoppelt war (siehe 3.8.1 – 3.8.4).

Für Tim54 wurde der Bereich zwischen den beiden potentiellen Transmembrandomänen in das Plasmid pQE30 kloniert, um dieses Fragment mit einer aminoterminalen Hexahistidinylsequenz in *E. coli* zu exprimieren (siehe 3.4.4.3.8). Das Fragment von Tim54 mit Histidinylanhang wurde über eine Nickelsäule gereinigt und ebenfalls für die Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Die Antikörper gegen Tim54 wurden über Affinitätschromatographie mit dem entsprechenden Antigen aufgereinigt (siehe 3.8.1 – 3.8.4). Zur Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine wurden die kodierende Sequenz beider Gene in pGEM4-Plasmide kloniert und per *in vitro* Transkription und Translation radioaktiv markiertes Tim22 und Tim54 hergestellt (siehe 3.4.4.3.3, 3.4.4.3.4 und 3.6.8).

Desweiteren wurden die kodierenden Sequenzen von Tim22 und Tim54 auch in das Plasmid pRS426 kloniert, um diese in Hefe zu exprimieren (siehe 3.4.1.4.3).

Die radioaktiv markierten Proteine und mitochondrialen Proteine eines *Neurospora crassa* Wildtypstammes und der Hefestämme, welche Tim22 oder Tim54 aus *Neurospora crassa* exprimieren, wurden per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert und mittels Immunnachweis gegen *NcTim22* und *NcTim54* bzw. durch Autoradiographie untersucht. Die radioaktiv markierten, *in vitro* synthetisierten Proteine der potentiellen kodierenden Sequenzen hatten dieselbe Größe wie die endogenen Proteine aus

*Neurospora crassa* (siehe Abb. 12). Da ein Protein exakt derselben Größe auch in den Hefemitochondrien nachweisbar war, welche die entsprechende Komponente aus *N. crassa* exprimierten, aber nicht in den Hefemitochondrien, in denen die Komponente aus *N. crassa* nicht exprimiert wurde, erkannten die Antikörper spezifisch die Proteine Tim22 und Tim54 aus *N. crassa*. Die übereinstimmende Größe der *in vitro* synthetisierten und der endogenen Proteine bestätigte die Richtigkeit des vorhergesagten Leserahmens.



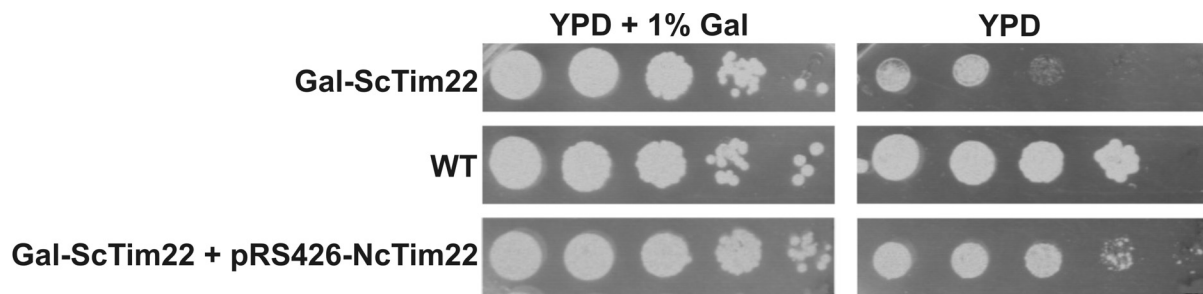
**Abb. 12: Spezifität der Antikörper gegen Tim22 und Tim54 sowie Bestätigung der Startcodons**

SDS-Gelelektrophorese der radioaktiv markierten Proteine Tim22 und Tim54 (Lysat: 1  $\mu$ l), 50  $\mu$ g mitochondriale Proteine aus *Nc* und aus Hefezellen, die entweder *NcTim22* oder *NcTim54* exprimierten. Der Immunnachweis erfolgte gegen *NcTim22* bzw. *NcTim54*, der Nachweis der radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie. Die Antikörper erkennen spezifisch Tim22 bzw. Tim54.

#### 4.2.2 Tim22 aus *Neurospora crassa* kann die Funktion von Tim22 in Hefe übernehmen

Nachdem Tim22 und Tim54 identifiziert worden waren, sollten diese Komponenten und der native TIM22-Komplex strukturell und funktionell charakterisiert werden. Zunächst wurde getestet, ob Tim22 aus *Neurospora crassa* in der Lage ist, die Funktion von Tim22 in *Saccharomyces cerevisiae* zu übernehmen. Dafür wurde ein haploider Hefestamm verwendet, bei welchem das *tim22*-Gen unter Kontrolle des Galaktosepromotors stand (Sirrenberg *et al.*, 1996). Dieser Stamm wurde mit einem Überexpressionsplasmid transformiert, in welches *tim22* von *N. crassa* kloniert worden war (3.5.1.4.3). In einem Tüpfeltest auf YPD-Agarplatten und YPD-Agarplatten, die mit 1 % Galaktose versetzt worden waren, wurde

getestet, ob *NcTim22* in der Lage ist, den Wachstumsphänotyp bei der Depletion von *ScTim22* auf YPD-Agaroseplatten zu retten (siehe 3.5.1.2). Der verwendete Stamm, der *Tim22* unter der Kontrolle des *GALI0*-Promotors trägt, basierte auf dem Wildtypstamm, W334, der die Repression des Galaktosepromotors durch Glukose verloren hat. Diesen Versuchen zufolge war *NcTim22* in der Tat in der Lage, *ScTim22* partiell funktionell zu ersetzen (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Komplementation des Wachstumsdefekts bei Depletion von *ScTim22* durch *NcTim22***

Es wurden je 5  $\mu$ l der aufgeführten Hefestämme in absteigender Konzentration auf YPD + 1% Galaktoseplatten und YPD Platten aufgetragen. Die Hefekultur des ersten aufgetragenen Punktes entsprach einer  $OD_{600}$  von 0,5; die weiteren Punkte wurden gemäß einer 1/10 Verdünnungsreihe generiert. Der Stamm, der *NcTim22* exprimiert wächst auf einer YPD-Agarplatte ähnlich wie der korrespondierende Wildtypstamm W334 (WT) unter Bedingungen unter welchen der Stamm mit niedrigem *Tim22* Expressionsniveau bereits einen deutlichen Wachstumsdefekt zeigt.

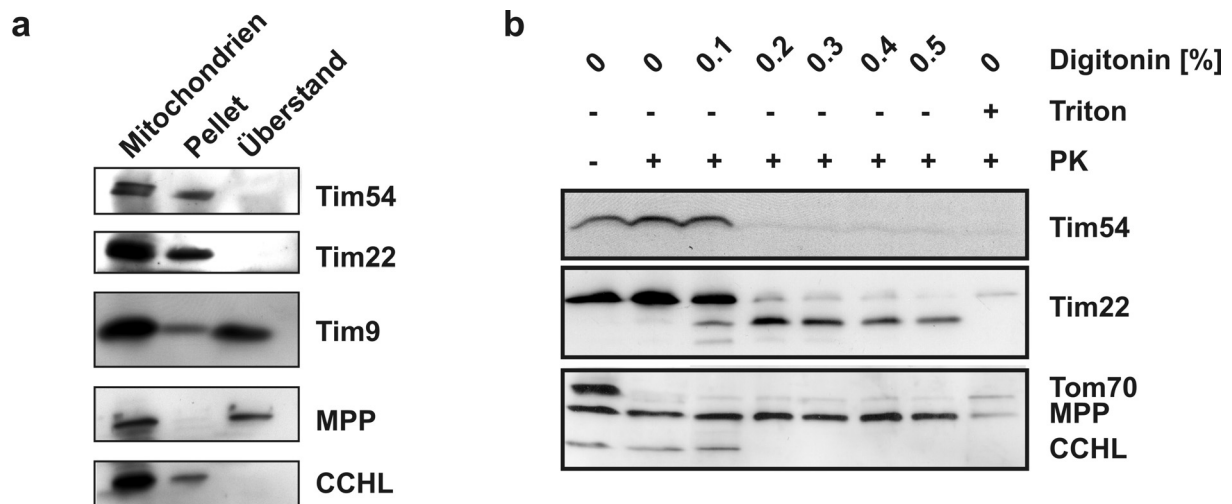
#### 4.2.3 Lokalisation von *Tim22* und *Tim54* in *Neurospora crassa*

Zur Charakterisierung der identifizierten Komponenten *Tim22* und *Tim54* aus *Neurospora crassa* sollte ihre submitochondriale Lokalisation bestimmt werden (siehe Abb. 14). Dazu wurden Mitochondrien eines *N. crassa* Wildtypstammes isoliert und durch Ultraschallaufschluß in Membranvesikel und lösliche Proteine fraktioniert. Die Membranfraktionen wurde durch Ultrazentrifugation geerntet, im Überstand verblieben lösliche Proteine. Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Immundetektion gegen die aufgeführten Proteine untersucht (siehe 3.7.5.4). Wie erwartet, konnte man *Tim22* und *Tim54* in der mitochondrialen Membranfraktion nachweisen, *Tim9* war zum größten Teil in der löslichen Fraktion zu finden, nur ein kleiner Teil von etwa 5-10% fraktionierte mit der Membranfraktion. Als Kontrollen dienten das lösliche MPP und das membranassoziierte CCHL (siehe Abb. 14a). *Tim22* und *Tim54* sind somit in *N. crassa* wie in *S. cerevisiae* mitochondriale Membranproteine.

In weiteren Versuchen wurde die Topologie beider Proteine geklärt. Insbesondere für *Tim54* war nicht erwiesen, ob es nur eine oder zwei Transmembrandomänen besitzt. Dazu wurden

Digitoninfraktionierungen von Mitochondrien durchgeführt (siehe 3.7.5.2). Bei Digitoninkonzentrationen bis 0,2% blieben die Mitochondrien intakt, zugesetzte Proteinase K konnte weder Tim22 noch Tim54 angreifen, lediglich das auf der Oberfläche der Mitochondrien exponierte Tom70 wurde abgebaut (siehe Abb. 14b). Ab einer Konzentration von 0,2% Digitonin wurde die äußere Membran geöffnet. Tim22 zeigte unter diesen Bedingungen einen Abbau zu einem Fragment von etwa 18 kDa Größe. Dies passt zu einem Modell von vier Transmembrandomänen in Tim22. Lediglich kurze Bereiche des Amino- und Carboxyterminus, die für die Protease zugänglich sind, weisen in den Intermembranraum. Die Transmembranbereiche sind in der Lipidmembranschicht vor Abbau durch Proteinase K geschützt, im Intermembranraum exponierte Bereiche zwischen den Transmembrandomänen sind zu kurz, um einen Angriffspunkt für Proteinase K zu bieten. Tim54 wurde unter diesen Bedingungen nahezu vollständig durch zugesetzte Proteinase K abgebaut. Tim54 besitzt demnach nur eine Transmembrandomäne nahe des Aminoterminus, der Großteil des Proteins wird in den Intermembranraum exponiert, wobei der N-Terminus in der Matrix und der C-Terminus im Intermembranraum lokalisiert ist. Als Kontrolle diente CCHL, welches im Intermembranraum lokalisiert ist. Auch dieses wird nach Öffnen der Außenmembran für Proteinase K zugänglich. Durch Behandlung mit TritonX-100 wird die innere mitochondriale Membran geöffnet und Proteine der mitochondrialen Matrix, wie MPP, sind für Proteinase K zugänglich. Das 18 kDa große Fragment von Tim22 wird unter diesen Bedingungen vollständig abgebaut. Dies zeigt, dass es sich nicht um ein gefaltetes protease-resistentes Fragment handelt, sondern um ein in Mitoplasten vor Abbau geschütztes Fragment. Somit kann für Tim22 eine Topologie mit vier Transmembranhelices und kurzen N- sowie C-terminalen Sequenzen, die in den Intermembranraum exponiert werden, postuliert werden. Tim54 besitzt nur eine Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus, der Großteil des Proteins ist im Intermembranraum lokalisiert.



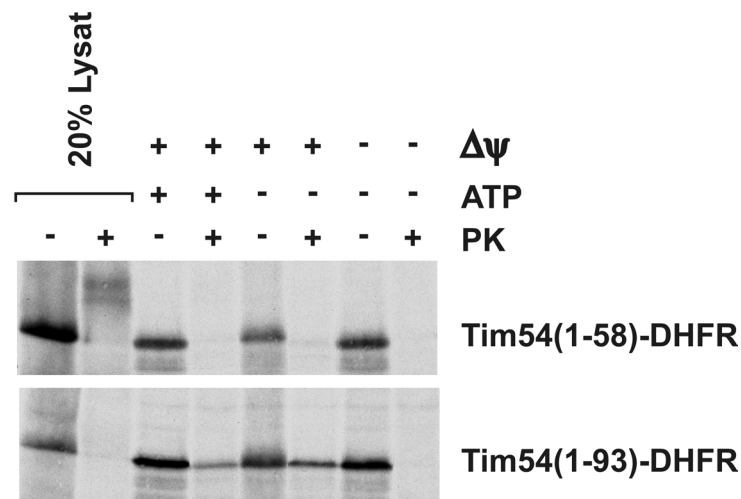


**Abb 14.: Lokalisation von Tim22 und Tim54 in *Neurospora crassa***

(a) Mitochondrien aus *Neurospora crassa* (WT) wurden durch Ultraschallbehandlung in Membranvesikel und lösliche Bestandteile fraktioniert. Membranvesikel und enthaltene Membranproteine wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert, lösliche Proteine verblieben im Überstand. Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Immundekoration gegen Tim54, Tim22, Tim9, MPP (mitochondriale Prozessierungsprotease) und CCHL (Cytochrom C Hämlyase) untersucht. (b) Mittels ansteigender Digitoninkonzentrationen wurde spezifisch die äußere mitochondriale Membran geöffnet. Durch Zugabe von Proteinase K konnte der Abbau mitochondrialer Proteine verfolgt werden. Durch Zugabe von 0,16% TritonX-100 wurden die Mitochondrien vollständig lysiert. Nach SDS-Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte der Immunnachweis der angegebenen Proteine.

#### 4.2.4 Import von Tim54 in Mitochondrien

Tim54 besitzt eine Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus, aber keine Präsequenz, die im Zuge des Imports und der Insertion abgespalten wird (Kerscher *et al.*, 1997). Es ist jedoch unklar, welche Bereiche von Tim54 tatsächlich für den effektiven Import benötigt werden. Dies wurde mithilfe von DHFR-Fusionskonstrukten untersucht. Zum einen wurden die ersten 58 Aminosäuren von Tim54 an DHFR fusioniert, dies entspricht dem N-Terminus bis zur Transmembrandomäne. Zum anderen wurden die ersten 93 Aminosäuren von Tim54 verwendet, dies entspricht dem N-Terminus einschließlich der Transmembrandomäne (siehe 3.4.4.3.5 und 3.4.4.3.6). Die radioaktiv markierten Fusionsproteine wurden *in vitro* synthetisiert und in isolierte Mitochondrien von *N. crassa* importiert (siehe 3.7.6). Importiertes Material war gegen die zugefügte Proteinase K geschützt. Für den erfolgreichen Import von Tim54 ist die Anwesenheit der Transmembrandomäne notwendig, der N-terminale Bereich bis zur Transmembrandomäne ist nicht ausreichend. Der Import ist abhängig von Membranpotential (siehe Abb. 15).



**Abb. 15: Import von Tim54**

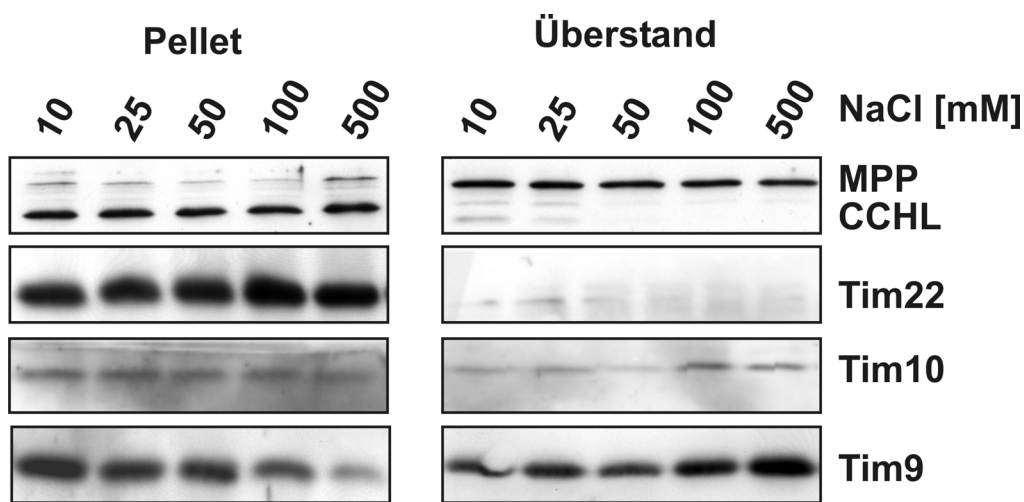
Die radioaktiv markierten Fusionsproteine Tim54(1-58)-DHFR (ohne Transmembrandomäne) und Tim54(1-93)-DHFR (mit Transmembrandomäne) wurden in Wildtyp-Mitochondrien von *Neurospora crassa* importiert. Der Import wurde mit und ohne Membranpotential sowie mit und ohne ATP-Zugabe durchgeführt. Für einen erfolgreichen Import ist die Transmembrandomäne und Membranpotential notwendig. 20% Lysat entspricht 1/5 des pro Spur eingesetzten radioaktiv markierten Proteins.

#### 4.2.4 Gibt es einen membranassoziierten TIM9/10-Komplex in *Neurospora crassa*?

In *S. cerevisiae* interagiert der integrale Membranbestandteil des TIM22-Komplexes mit einem peripher assoziierten Hexamer aus Tim12, Tim10 und Tim9. Tim12 vermittelt vermutlich die Assoziation. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* wurde in *N. crassa* sowie in Genomen weiterer vollständig sequenzierter Organismen trotz intensiver Datenbanksuche kein Tim12 identifiziert.

Tim9 und Tim10 sind in *N. crassa* als hexamerer Tim9/Tim10-Komplex vorhanden. Dieser Komplex ist größtenteils löslich im Intermembranraum lokalisiert. Es stellte sich die Frage, ob der TIM9/10-Komplex trotz des Fehlens von Tim12 neben seiner löslichen Form im Intermembranraum auch membranassoziiert vorliegt. Um diese Frage zu klären, wurden Mitochondrien aus *Neurospora crassa* bei verschiedenen Salzkonzentrationen mit Ultraschall behandelt (siehe 3.7.5.4). Dies sollte zeigen, ob der TIM9/10-Komplex mit der Membranfraktion aus Mitochondrien zu isolieren war, und ob diese Interaktion abhängig von der Salzkonzentration gestört wurde. In der Tat fanden sich Anteile des TIM9/10-Komplex sowohl in der löslichen Fraktion der mitochondrialen Proteine als auch in der Membranfraktion (siehe Abb. 16). Die Menge des membranständigen TIM9/10-Komplexes variierte mit der Salzkonzentration, bei der die Ultraschallbehandlung durchgeführt wurde. Besonders deutlich war dies für Tim9 zu sehen. Während unter Bedingungen mit geringen

Salzkonzentrationen große Mengen TIM9/10-Komplex mit den Membranen fraktionierten, nahm der Anteil mit steigenden Salzkonzentrationen ab. Im Gegenzug nahm der Anteil des TIM9/10-Komplexes mit steigendem Salzgehalt in der löslichen Fraktion zu. Dagegen verbleiben integrale Membranproteine, wie Tim22, und über hydrophobe Wechselwirkungen assoziierte Membranproteine, wie CCHL, unabhängig vom Salzgehalt in der Membranfraktion. Das lösliche Matrixprotein MPP wurde in der löslichen Fraktion gefunden. Somit ist der TIM9/10-Komplex in *N. crassa* vermutlich alleine in der Lage mit den membranintegralen Komponenten des TIM22-Komplexes zu interagieren. Diese Interaktion beruht auf ionischen Interaktionen, da sie durch erhöhte Salzkonzentrationen gestört wird.



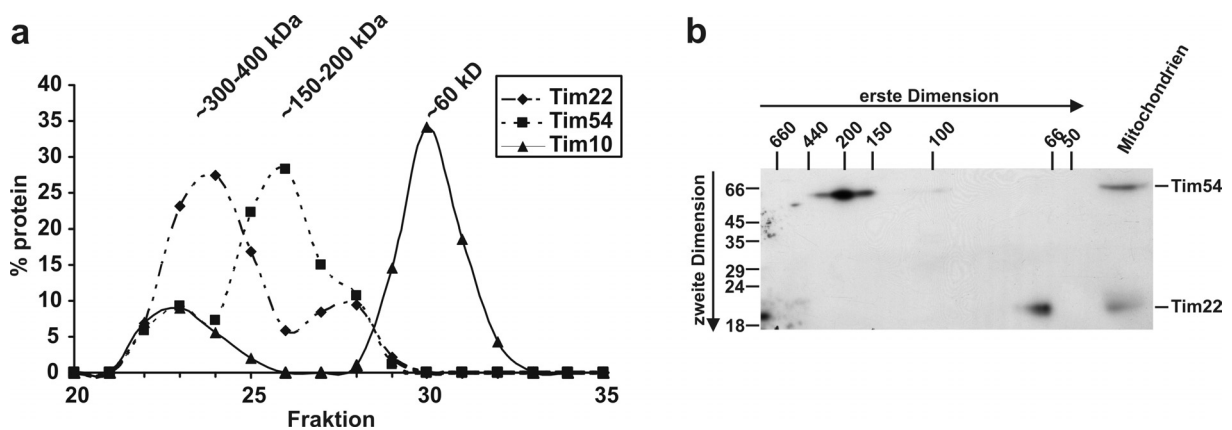
**Abb. 16: Der TIM9/10-Komplex in *Neurospora crassa* ist salzabhängig mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert**

Durch Ultraschallbehandlung bei verschiedenen Salzkonzentrationen und nachfolgender Trennung von Membranvesikeln und löslichen mitochondrialen Bestandteilen durch Ultrazentrifugation wurden Mitochondrien aus *Neurospora crassa* subfraktioniert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Immunnachweis mit den angegebenen Antikörpern.

#### 4.2.5 Der TIM22-Komplex in *Neurospora crassa*

Zur weiteren Charakterisierung des TIM22-Komplexes in *Neurospora crassa* wurden Versuche durchgeführt, um die Molekularmasse und die Zusammensetzung des Komplexes zu ermitteln. Es handelte sich hierbei sowohl um Gelfiltrationsexperimente, als auch um Nativgelanalysen mit anschließender Auftrennung durch SDS-PAGE in der zweiten Dimension (siehe 3.6.9 und 3.6.10). Bei diesen Versuchen wurde die Stabilität des Komplexes in verschiedenen Detergentien getestet. Leider erwies sich der Komplex sowohl in TritonX-100 als auch in DDM (Dodecylmaltosid) als nicht stabil. Selbst in dem milden Detergens Digitonin war der Komplex labil und dissoziierte häufig während der

Solubilisation. Es gelang in einigen Experimenten Tim22 in einem hochmolekularen Komplex durch Gelfiltration nachzuweisen (siehe Abb. 17a). Die Elutionsfraktionen, in denen Tim22 detektiert wurde, enthielt auch Tim54 und den TIM9/10-Komplex. Tim9 interagiert mit Tim22, da es aus dieser Fraktion mit Antikörpern gegen Tim22 isoliert wurde. Tim22, TIM9/10-Komplex und Tim54 waren in einem Komplex, dessen Laufverhalten in der Gelfiltration einer Molekularmasse von circa 300-350 kDa entspricht. Allerdings wurden Tim22, Tim54 und Tim9 nicht nur in diesem hochmolekularen Komplex detektiert. Ein großer Teil an Tim22 fand sich darüber hinaus in Fraktionen mit Proteinen mit einer molekularen Masse von etwa 60-80 kDa, Tim54 mit Proteinkomplexen von etwa 150-200 kDa und Tim9 mit Proteinen von etwa 60 kDa.



**Abb 17: Der Tim22-Komplex in *Neurospora crassa***

(a) Die molekulare Masse des TIM22-Komplexes von *N. crassa* wurde durch Gelfiltrationsanalyse (Superose 6) nach Solubilisation der Mitochondrien (5 mg/ml) mit Digitonin untersucht (20 mM HEPES, pH 7.4; 50 mM NaCl; 10% Glycerol; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA, 1% Digitonin). Man beobachtete hier einen etwa 300-350 kDa großen TIM22-Komplex. Daneben war Tim54 in Fraktionen der molekularen Masse von 150-200 kDa, Tim22 in Fraktionen von 60-80 kDa und Tim10 in Fraktionen von 60 kDa nachzuweisen. (b) Nach Solubilisation der Mitochondrien wie in (a) beschrieben und Blau-Nativ-Gelelektrophorese zerfällt der TIM22-Komplex komplett in den Tim54-Teilkomplex mit einer molekularen Masse von 150-200 kDa sowie einen Teilkomplex von etwa 60-80 kDa, der Tim22 enthält.

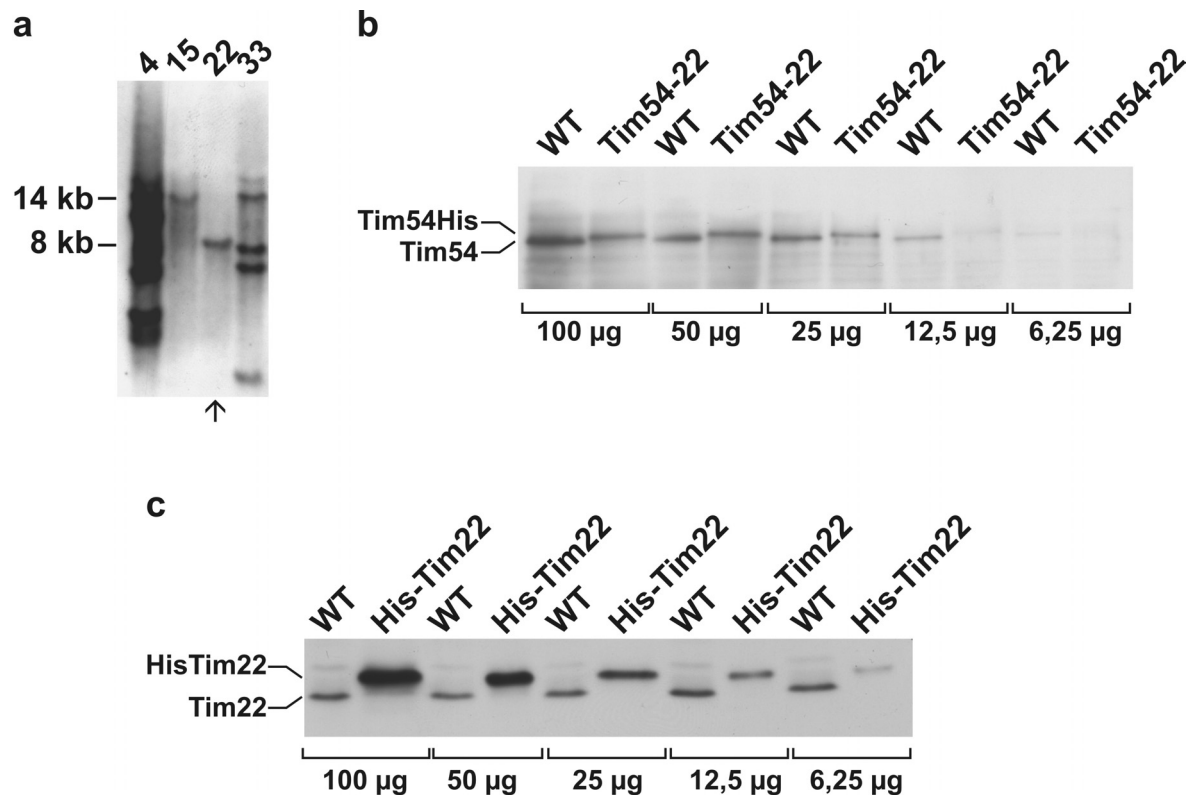
Der TIM22-Komplex zerfiel in vielen Experimenten in diese Teilkomplexe. Wie in der zweiten Dimension des Nativgels zu beobachten war, wurde Tim54 hier vollständig in dem Komplex mit der Molekularmasse von 150-200 kDa und Tim22 in dem Komplex von 60-80 kDa gefunden. (siehe Abb. 17b).

Somit ist der TIM22-Komplex von *Neurospora crassa* im Detergensextrakt deutlich instabiler als in Hefe. Den Ergebnissen zufolge ist dennoch der TIM22-Komplex in *Neurospora crassa* wie in Hefe etwa ~300-350 kDa groß und beinhaltet den Tim9/10-Komplex, Tim54 sowie Tim22. Dieser Komplex zerfällt leicht in den heterohexameren TIM9/10-Komplex, einen

Tim54-Subkomplex, möglicherweise ein Trimer von Tim54, und einem Tim22-Subkomplex, das ebenfalls ein Trimer von Tim22 darstellen könnte.

#### 4.2.6 Herstellung von Stämmen von Tim22 und Tim54 mit Oktahistidinyl-Anhang

Für die Reinigung des TIM22-Komplexes sollte eine Komponente des TIM22-Komplexes mit einer Oktahistidinylsequenz versehen werden. Da Tim54 zuerst entdeckt worden war, wurde zunächst diese Komponente mittels homologer Rekombination mit dieser Sequenz versehen. Dazu wurde Tim54 mit einer Oktahistidinylsequenz am Carboxyterminus in den *N. crassa*-Expressionsvektor pCB1179 kloniert, der einen Hygromycinresistenzmarker trägt. Zusätzlich wurde jeweils etwa 1 kb 5'- und 1 kb 3'- des *tim54*-Gens gelegener Sequenzen in einer Art und Weise in das Plasmid gebracht, dass nach Linearisierung des Vektors das endogene *tim54*-Gen vollständig gegen die Variante mit Histidinylanhang über homologe Rekombination getauscht werden konnte (siehe Abb. 6). Parallel wurde dadurch die Hygromycinresistenz auf den Wildtypstamm übertragen. (siehe 3.5.2.8.2). Dadurch wurde ein Stamm generiert, der eine Tim54-Version mit dem Oktahistidinylanhang (Tim54-His) exprimiert. Dabei war die Version mit Histidinylsequenz von Tim54 bei zahlreichen Stämmen nicht zielgerichtet inseriert worden; bei nur wenigen Stämmen war das endogene *tim54* tatsächlich ersetzt worden. Da *Neurospora crassa* ein heterokaryotischer Pilz ist, der bis zu acht Kerne pro Zelle besitzen kann, jedoch nur in einem Kern ein homologes Rekombinationsereignis stattgefunden hatte, exprimierten auch diese Stämme weiterhin Tim54 ohne Oktahistidinyl-Anhang. Das Ziel jedoch war es, einen Stamm zu generieren, der neben Tim54 mit Histidinylsequenz kein endogenes Tim54 mehr exprimiert. Deshalb wurde von einem Stamm, der im Southernblot positiv für den Austausch getestet wurde, Mikrokonidien erzeugt. Da Mikrokonidien nur einen Kern enthalten, sind Stämme, die aus Mikrokonidien gezogen werden, homokaryotisch (siehe 3.5.2.7). Die erhaltenen Stämme wurden wieder mittels Southernblot-Analyse auf den Austausch *tim54*-Gens getestet (siehe 3.4.8). Auf diese Weise konnte ein Stamm generiert werden, dessen endogenes *tim54*-Gen durch *tim54* mit der Oktahistidinylsequenz am C-Terminus ersetzt worden war (siehe Abb 18 a + b). Die endogenen Mengen von Tim54-His waren denen von Tim54 im Wildtyp vergleichbar.



**Abb. 18: Stämme der Komponenten des TIM22-Komplexes aus *N. crassa* mit Oktahistidinyl-Anhang**

(a) Southernblot verschiedener *tim54*-Disruptionsstämme. Es wurde dieselbe Sonde verwendet, die auch für die Identifizierung des *tim54*-Cosmids verwendet worden war. Der Verdau der genomischen DNA mit *Xba*I sollte im Falle des endogenen *tim54*-Gens zu einer etwa 14 kb großen Bande führen. Im Falle des erfolgreichen Austausches durch die Variante mit Histidinylanhang sollte dieses 14 kb große Fragment nicht mehr nachweisbar sein, jedoch ein 8 kb großes Fragment (siehe Abb. 6). Dies trifft für den Klon 22 zu. Bei unspezifischer Integration ohne Austausch des endogenen *tim54*-Gens findet man neben dem 14 kb Fragment weitere Fragmente, wie bei Klon 4 und 33. Klon 15 besitzt nur das Fragment, das auf die WT-Situation schließen lässt. (b) Westernblot-Analyse verschiedener Mengen (6,25 µg bis 100 µg) Mitochondrien eines *Neurospora crassa* Wildtyp-Stammes und des Stammes, der Tim54 mit C-terminalem Histidinylanhang exprimiert (Tim54-22). Für den Immunnachweis wurden Antikörper gegen *NcTim54* verwendet (c). Wie in (b) beschrieben wurden auch Mitochondrien des Stammes, der Tim22 mit N-terminalem Histidinylanhang exprimiert untersucht.

Nachfolgende Aufreinigungen über den Histidinyl-Anhang des Tim54 zeigten, dass keine ausreichenden Mengen des TIM22-Komplexes mit diesem Stamm gereinigt werden konnten. Deshalb wurde Tim22 mit einer N-terminalen Oktahistidinylsequenz versehen. Laut einer Veröffentlichungen zu Zeiten dieser Arbeit, handelte es sich bei Tim54 in *S. cerevisiae* nicht um ein essentielles Protein (Kovermann *et al.*, 2002). Tim22 ist das einzige essentielle integrale Membranprotein des TIM22-Komplexes und sollte die entscheidende Funktion bei der Membraninsertion der Substrate ausüben. Deshalb erschien es gerechtfertigt, Tim22 zu überexprimieren und zu reinigen, auch wenn Tim54 möglicherweise nur in substöchiometrischen Mengen zusammen mit Tim22 gereinigt werden könnte. Tim22 wurde

mit einer Oktahistidinylsequenz am N-Terminus inklusive etwa 1 kb 3'-flankierenden Sequenzen in einen Vektor kloniert, welcher den *cpc1*-Promotor zur Überexpression enthielt. Dieses Plasmid wurde linearisiert und in einen *Neurospora crassa* Wildtypstamm transformiert. Man erhielt auf diese Weise einen Stamm, der Tim22 mit der Oktahistidinylsequenz 8-10 fach überexprimierte (His-Tim22) (siehe Abb. 18c). Erstaunlicherweise konnte in diesem Stamm kein endogenes Tim22 über Westernblot-Analyse mehr nachgewiesen werden. Somit erwies sich die N-terminal mit der Histidinylsequenz versehene Version von Tim22 als funktionell.

Für die folgenden Versuche zur Reinigung des TIM22-Komplexes bzw. von reinem Tim22 stand ein Stamm zur Verfügung, der funktionelles Tim22 mit Histidinylanhang am N-Terminus exprimierte.

#### 4.2.7 Reinigung des TIM22-Komplexes

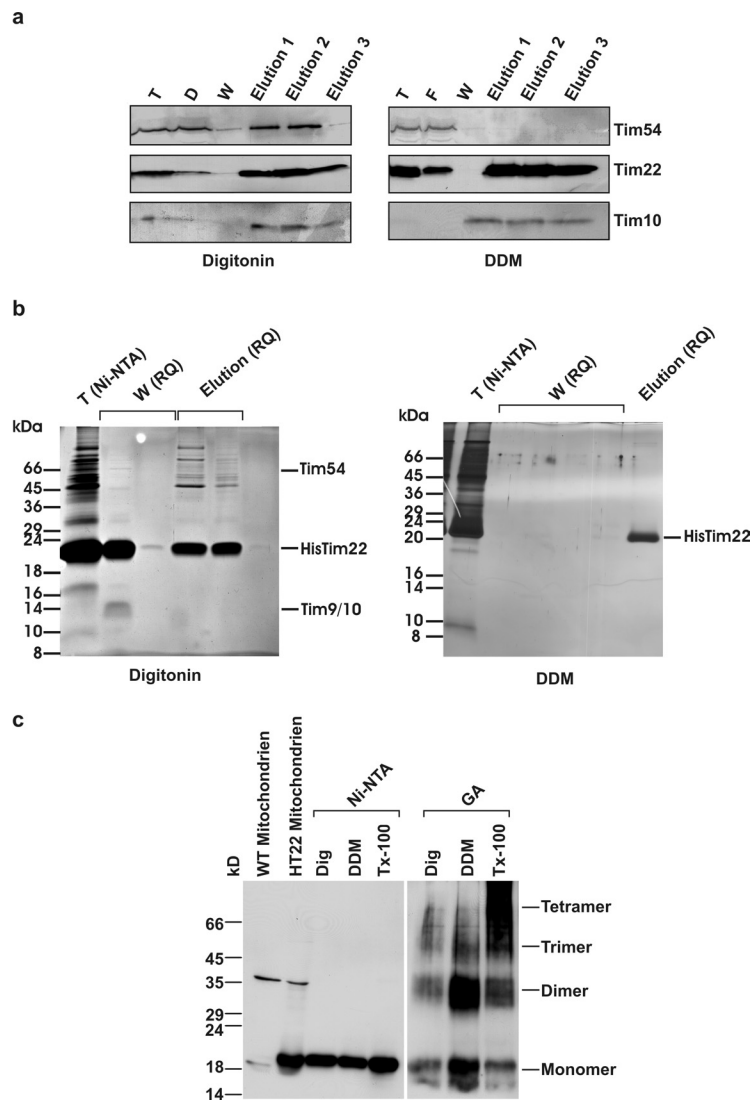
Um ausreichende Mengen in gereinigter Form für Rekonstitutionsexperimente zu gewinnen, war es nötig, den TIM22-Komplex in großem Maßstab mittels Ni-NTA-Chromatographie und weiteren Reinigungsschritten zu isolieren. Neben der Reinigung des TIM22-Komplexes wurde auch die Isolierung von His-Tim22 alleine angestrebt. Tim22 ist die einzige essentielle integrale Komponente des Tim22-Komplexes (Kovermann *et al.*, 2002). Möglicherweise ist Tim22 somit die einzige Komponente, die für die Kanalbildung und die Insertion von Substraten in die innere Membran über den TIM22-Komplex notwendig ist.

Der His-Tim22 exprimierende Stamm wurde verwendet, um den TIM22-Komplex und Tim22 zu reinigen. Zunächst wurden im kleinen Maßstab verschiedene Detergentien und Salzbedingungen getestet, um Bedingungen für die Reinigung zu etablieren. Dazu wurden kleine Mengen an Mitochondrien (0,2 g) mit dem jeweiligen Detergens solubilisiert. Nach Reinigung über eine Nickelsäule, wurde mittels Westernblot-Analyse und Immundekoration geprüft, ob Tim54 und der TIM9/10-Komplex kogereinigt wurden (siehe 3.6.13). Nach Solubilisation mit Digitonin in einem Puffer mit geringem Salzgehalt wurde auch der TIM9/10-Komplex mit Tim22 koeluiert. Tim54 war anteilig in den Elutionsfraktionen nachzuweisen; allerdings verblieben große Teile an Tim54 im Überstand und wurden nicht zusammen mit His-Tim22 isoliert. Der TIM9/10-Komplex fand sich auch nach Solubilisation in DDM in Niedrigsalzpuffer in den Elutionsfraktionen, während Tim54 vollständig im Überstand verblieb (siehe Abb. 19a). Wie in Abbildung 16 gezeigt, ist es möglich den TIM9/10-Komplex unter Hochsalzbedingungen von den Membranen abzulösen. Um

His-Tim22 rein zu isolieren, wurden Mitochondrien des His-Tim22 Stammes deshalb in den folgenden Experimenten in Solubilisationspuffer unter Hochsalzbedingungen mit DDM solubilisiert. Zusammenfassend wurde für die Reinigung des TIM22-Komplexes Solubilisationsbedingungen in Niedrigsalzpuffer (20 mM NaCl) mit 1% Digitonin gewählt. Für die Reinigung von reinem His-Tim22 benutzte man Solubilisationsbedingungen in Hochsalzpuffer (300 mM NaCl) mit 1% DDM.

Für die Isolierung großer Mengen des TIM22-Komplexes wurden 4g His-Tim22 Mitochondrien durch Ultraschall aufgeschlossen. Lösliche Proteine wurden von mitochondrialen Membranen durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die pelletierten Membranen wurden in Niedrigsalzpuffer (20 mM NaCl) mit 1% Digitonin solubilisiert. Das Solubilisat wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, um den TIM22-Komplex zu binden. Nach Waschen der Säule mit Niedrigsalzpuffer wurde der gebundene TIM22-Komplex durch Verwendung von 300 mM Imidazol eluiert. Das Eluat der Ni-NTA-Agarose wurde auf eine 1 ml Anionenaustauschersäule (Resource Q, Amersham Bioscience) geladen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen des Puffers mit 10 mM Salz gewaschen und dann mittels eines Salzgradienten von 10 mM NaCl bis 1 M NaCl über 10 Säulenvolumen eluiert. Unter diesen Reinigungsbedingungen konnte in den Waschfraktionen des Anionenaustauschers His-Tim22 mit geringen Anteilen an Tim54, jedoch einem höherem Anteil an TIM9/10-Komplex gewonnen werden. Allerdings fand man His-Tim22 in diesen Fraktionen in deutlich größerer Menge als Tim54 oder den TIM9/10-Komplex. Diese Fraktion enthält somit einen geringen Anteil intakten TIM22-Komplex, der Großteil des TIM22-Komplexes zerfällt. Ein weiterer Anteil an His-Tim22 eluiert von der Säule bei etwa 100 mM NaCl. In diesen Fraktionen finden sich allerdings auch viele weitere Proteine und kaum TIM9/10-Komplex bzw. Tim54. Die Reinigung mit dem Detergens DDM zur Isolierung von reinem His-Tim22 wurde analog durchgeführt. Jedoch verwendete man einen Puffer mit 300 mM NaCl und 1% DDM zur Solubilisierung der isolierten mitochondrialen Membranen. Nach der Ionenaustauschchromatographie fand man auf diese Weise sauberes His-Tim22, das bei etwa 100 mM NaCl vom Anionenaustauscher eluierte. Weitere Proteine eluierten bei höheren Salzkonzentrationen.





**Abb. 19: Reinigung des Tim22-Komplexes aus *Neurospora crassa***

(a) Reinigung von His-Tim22 aus 200 mg Mitochondrien (10 mg/ml) nach Solubilisation von Mitochondrien in entweder 1% Digitonin oder 0,5% DDM in Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 50 mM NaCl und 20 mM Imidazol. Die Elution erfolgte im selben Puffer mit 0,05% Digitonin und 300 mM Imidazol. Der Nachweis eluierter Proteine wurde durch Westernblot-Analyse und Immunnachweis mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Geladen wurden jeweils 20% des eingesetzten Materials (T), des Durchlaufs (D) und der Waschfraktion sowie 8 % der jeweiligen Elutionsfraktion. (b) Reinigung von His-Tim22 aus 4 g Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden zunächst durch Ultraschallbehandlung in lösliche und Membranbestandteile fraktioniert. Die Membranfraktion wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml mit 1% Digitonin in Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 20 mM NaCl und 20 mM Imidazol bzw. 1% DDM in Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol solubilisiert. Das Solubilisat wurde an eine Ni-NTA-Säule gebunden und diese mit Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 10 mM NaCl und 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 10 mM NaCl und 300 mM Imidazol. 1 ml der His-Tim22 enthaltenden Fraktionen wurde auf eine 1 ml Resource-Q-Säule geladen, mit 5 Säulenvolumen Natriumphosphatpuffer, pH 8 mit 10 mM NaCl gewaschen und über 10 Säulenvolumen mittels eines kontinuierlichen Salzgradienten von 10 mM bis 1 M NaCl eluiert. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung untersucht. Auf das Gel wurden jeweils 5% des Eluats der Ni-NTA-Säule (T) und je 40  $\mu$ l ausgewählter Fraktionen des ungebundenem Materials (W) und der Elutionen geladen. (c) Quervernetzung durch Glutaraldehyd von Elutionen der Ni-NTA-Säulen nach Solubilisation von Mitochondrien (10 mg/ml) in 1% Digitonin, 1% DDM bzw. 1% TritonX-100. Die Analyse der Quervernetzungsprodukte erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Immunnachweis von Tim22.

Nach der Ni-NTA-Reinigung wurden Quervernetzungsexperimente mit Glutaraldehyd durchgeführt. Diese zeigten, dass His-Tim22 in der Lage ist, homooligomere Komplexe zu bilden. Dies ist eine gute Voraussetzung dafür, dass Tim22 alleine in der Lage ist die Funktion des TIM22-Komplexes *in vitro* zu übernehmen.

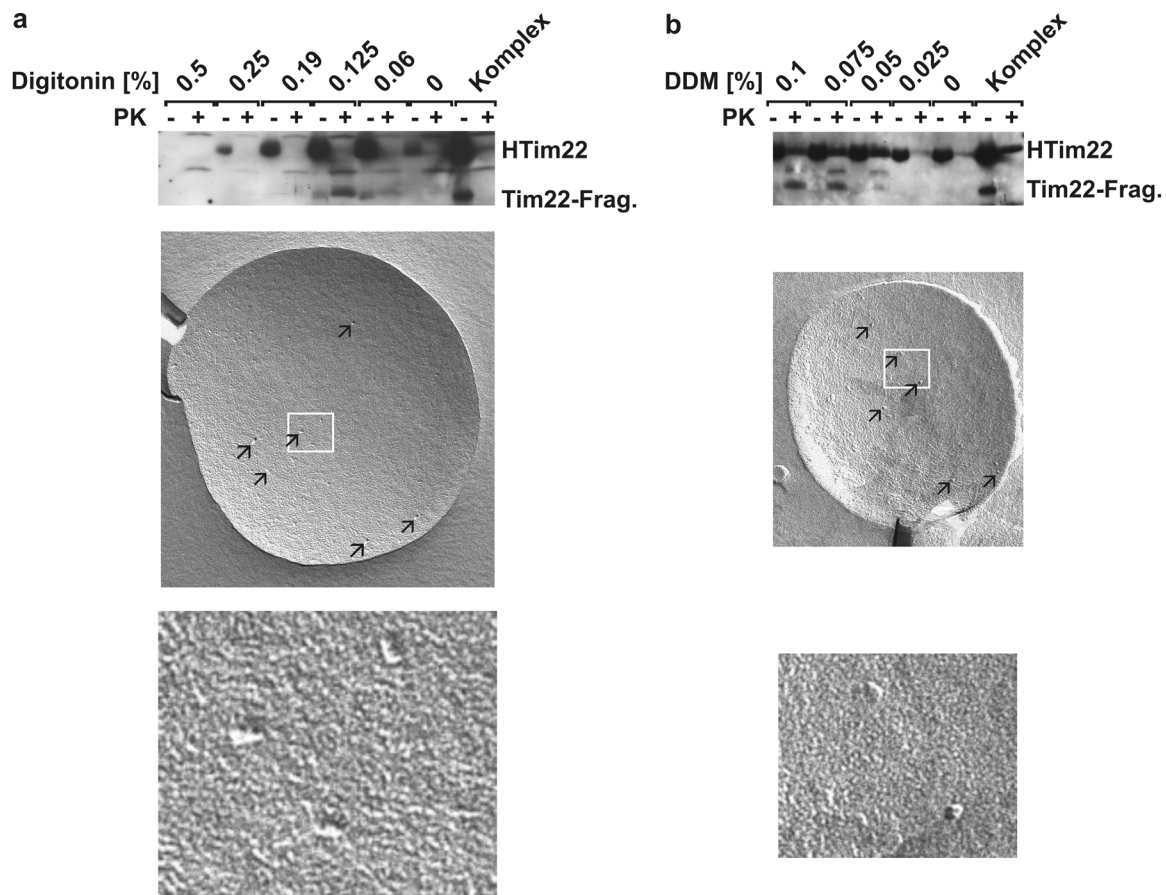
Zusammenfassend ist man in der Lage nach Solubilisation in Digitonin und Niedrigsalzpuffer Anteile intakten TIM22-Komplex über Ni-NTA- und Anionenaustauschchromatographie zu isolieren. Jedoch zerfällt der Großteil des Komplexes auch unter diesen milden Bedingungen. Nach Solubilisation in DDM und unter Hochsalzbedingungen ist es möglich durch einen analogen Aufreinigungsprozess sauberes His-Tim22 zu gewinnen.

#### 4.2.8 Rekonstitution von Tim22 in Lipidvesikel

Für funktionelle Untersuchungen wurden sowohl reines His-Tim22 als auch Fraktionen, die Anteile des intakten TIM22-Komplexes enthielten, verwendet. Dadurch wurde His-Tim22 bzw. TIM22-Komplex in Lipidvesikel rekonstituiert. Dies soll zum einen die elektrophysiologische Untersuchungen ermöglichen, um zu klären, ob Tim22 Kanäle in Lipidmembranen bilden kann. Zum anderen sollen Importstudien in dem rekonstituierten System durchgeführt werden.

Die Rekonstitutionen wurden in vorgeformte Liposomen durchgeführt. Diese Liposomen bestanden aus Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure aus dem Hühnerei in einem Verhältnis von 9:1 (siehe 3.6.15). Die vorgeformten Liposomen wurden mit Digitonin bzw. DDM in verschiedenen Konzentrationen solubilisiert. Die Lipidkonzentration betrug dabei 1 mg/ml, die Ansatzgröße 250 µl. Dann wurde Protein in einem Lipid/Protein-Verhältnis von 1/50 zugesetzt und für 10-15 Minuten inkubiert. Das Detergens wurde danach in drei Schritten mit *Biobeads* entzogen, indem jeweils nach einer Stunde *BioBeads* im Verhältnis *Biobeads*/Detergens von 10/1 (w/w) zugesetzt wurden. Die erfolgreiche Rekonstitution wurde mittels eines Sucrosegradienten verfolgt. Es wurde überprüft, unter welchen Bedingungen Tim22-Protein mit den Lipidvesikeln im Sucrosegradienten flotierte. Mittels PK-Verdau wurde getestet, ob das Tim22 eine Topologie wie in Mitochondrien aufweist. Die Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim22 untersucht. Die größte Menge Tim22 flotierte nach Rekonstitution mit 0,125% Digitonin oder mit 0,075% DDM mit den Lipidvesikeln im Sucrosegradienten. In diesen Fraktionen wurde nach PK-Verdau ein Fragment von 18 kDa erhalten, welches auch bei PK-Verdau von Mitochondrien nach Öffnen der Außenmembran entsteht. Dies bedeutet, dass Tim22 in der

dem nativen Protein entsprechenden Orientierung in die Lipidvesikel integriert. Der Intensität des Fragments zufolge war etwa 50% des flotierten Proteins in der richtigen Orientierung integriert worden. Proteinase K Behandlung des nicht rekonstituierten Proteins führte nicht zu demselben Fragment. Die erfolgreiche Rekonstitution wurde durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie bestätigt. Es wurden eindeutig Partikel in den Liposomen nachgewiesen, die auf integriertes Protein zurückzuführen waren.



**Abb. 20: Rekonstitution von His-Tim22 in vorgeformte Lipidvesikel**

(a) Lipidvesikel aus Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure (9:1) wurden durch Phasenreversion vorgeformt. Diese Lipidvesikel wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Detergens Digitonin solubilisiert bzw. desintegriert. Die Lipidvesikel wurden mit gereinigten His-Tim22 Fraktionen in 0,05% Digitonin, welches Anteile intakten TIM22-Komplexes enthielt, versetzt und das Detergens durch *Biobeads* langsam entfernt. Nach der Rekonstitution wurden die Lipidvesikel in einem Sucrosegradient flotiert. Die flotierten Vesikel wurden entweder mit Proteinase K behandelt oder verblieben unbehandelt. Die Proben wurden mittels Westernblotanalyse auf die Anwesenheit von Tim22 untersucht. Das durch Proteaseverdau generierte Tim22-Fragment (18 kDa) bestätigte die richtige Orientierung des rekonstituierten Tim22 in den Lipidvesikeln. Darunter abgebildet sind elektronenmikroskopische Abbildungen nach Gefrierbruch der gewonnenen Lipidvesikel, welche durch Rekonstitution mit 0,125% Digitonin gewonnen wurden. Durch Pfeile gekennzeichnet sind Beispiele von Partikeln in den Membranen, die auf rekonstituiertes Protein zurückzuführen sind. Durch ein Viereck markiert ist ein Bereich, der darunter vergrößert dargestellt ist und Partikel integrierten Proteins enthält. (b) Die Rekonstitution wurde analog durch Versetzen der Lipidvesikel mit verschiedenen Konzentrationen DDM durchgeführt. Hier wurde gereinigtes His-Tim22 zusammen mit 0,03% DDM zugesetzt. Die Rekonstitution und der Nachweis der Insertion des zugesetzten Proteins sowie dessen Orientierung in der Membran erfolgte wie in (a) beschrieben.

Somit wurde Tim22 erfolgreich in Lipidvesikel rekonstituiert. Die Integration in Lipidvesikel erwies sich bei Verwendung von Digitonin effizienter als bei DDM. Das rekonstituierte Tim22 zeigte keine bevorzugte Orientierung in der Membran, etwa die Hälfte des rekonstituierten Proteins wurde in der endogenen Orientierung inseriert.

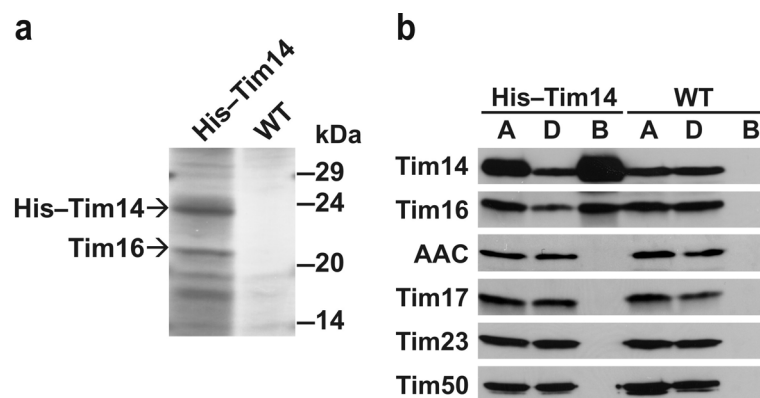
### 4.3 Identifizierung von Tim16 in *Saccharomyces cerevisiae*

Ein Ziel der Arbeit war die Identifizierung bisher nicht bekannter Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie. Parallel zu dem Ansatz der Reinigung von Translokationskomplexen in großem Maßstab aus *Neurospora crassa* wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach neuen Komponenten gesucht. In *S. cerevisiae* sind die Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Komponenten der Importkomplexe bereits weiter fortgeschritten. Dennoch war auch in diesem Organismus noch nicht der volle Satz am Import beteiligter Proteine identifiziert. Kürzlich wurde mit Tim14 eine weitere Komponente des mitochondrialen Importmotors der TIM23-Translokase beschrieben, zusätzlich zu den seit mehrere Jahren bekannten Proteinen Tim44, dem Chaperon mtHsp70 und dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (D'Silva *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2003b; Truscott *et al.*, 2003). Tim14 wurde über ein bisher nicht zugeordnetes Quervernetzungsprodukt von Tim44 identifiziert. Auf Grund des Laufverhaltens des Quervernetzungsprodukts in der SDS-Gelelektrophorese und des daraus vorhergesagten Molekulargewichts des interagierenden Proteins, sowie seiner potentiellen mitochondrialen Lokalisation wurde Tim14 als Kandidat für das mit Tim44 interagierende Protein entdeckt und nachfolgend als Interaktionspartner verifiziert. Im Rahmen der Identifizierung von Tim14 wurde in den Quervernetzungsversuchen beobachtet, dass es ein Quervernetzungsprodukt von Tim44 mit einem weiteren Protein gibt. Dieses ähnelt im Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese dem Tim44-Tim14 Quervernetzungsprodukt, was auf ein interagierendes Protein ähnlicher Größe wie Tim14 hinweist. Der mitochondriale Importmotor schien bisher nicht identifizierte Proteine aufzuweisen.

#### 4.3.1 Koreinigung von Tim16 mit Tim14 mit N-terminalem Oktahistidinylanhang

Um weitere Komponenten des mitochondrialen Importmotors zu identifizieren, wurde Tim14 über eine aminoterminalen Oktahistidinylsequenz mittels Ni-NTA-Agarose-Kugeln isoliert und die Elutionsfraktion nach koisolierten Proteinen untersucht. In dem verwendeten Stamm war die endogene kodierende Sequenz von Tim14 mittels homologer Rekombination aminoterminal um acht Histidinreste verlängert und unter Kontrolle des *GALI0*-Promotors kodiert. Dieser Stamm und der entsprechende Wildtypstamm wurden in Medium mit 1% Galaktose angezogen. Um die Expression von His-Tim14 etwa dem Niveau von Tim14 im Wildtypstamm anzugleichen, wurden die Zellen in Medium mit 0,1% Glucose überführt.

Nach Wachstum in galaktosefreiem Medium für fünf Stunden war das Expressionsniveau von His-Tim14 leicht erhöht. Die Mitochondrien wurden mit TritonX-100 solubilisiert, und die Solubilisate mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Gebundenes His-Tim14 und interagierende Proteine wurden mit imidazolhaltigem Puffer eluiert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie-Brilliant-Blue Färbung detektiert (Abb.: 21a). Neben His-Tim14 wurde ein weiteres Protein in signifikanter Menge in der Elutionsfraktion detektiert. Dieses Protein wurde im Gegensatz zu weiteren, unspezifisch an das Trägermaterial bindenden Proteinen, nicht in der Reinigung aus Mitochondrien des Wildtypstammes gefunden. Die entsprechende Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Es handelte sich um ein Protein, das durch den offenen Leserahmen YJL104W kodiert und fortan als Tim16 bezeichnet wird.



**Abb. 21: Identifizierung von Tim16 durch Koreinigung mit His-Tim14**

(a) Zum einen isolierte man Mitochondrien aus einem Hefestamm, der Tim14 mit einem aminoterminalen Oktahistidinylanhang exprimierte, zum anderen aus dem entsprechenden Wildtypstamm (YPH499). Die Mitochondrien wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml mit 1% Triton-X100 solubilisiert und Tim14 mit Oktahistidinylanhang durch Bindung an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Koeluierte Proteine wurden nach Auftrennung in einem SDS-Gel durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue oder (b) Westernblot-Analyse und Immundekoration mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Die aufgetragenen Proben sind 20% des Auftrag (A), Durchfluss (D) und gebundene Proteine (B).

Die Spezifität der Interaktion von Tim14 mit Tim16 wurde durch Westernblot-Analyse der Elutionsfraktion der Reinigung von His-Tim14 in kleinem Maßstab bestätigt (Abb.: 21b). Der Großteil an His-Tim14 und Tim16 konnte in dieser Elutionsfraktion nachgewiesen werden, was für eine Interaktion beider Komponenten spricht. Als Kontrolle für ein Protein, das nicht mit den Komponenten des Importmotors interagiert, wurde AAC verwendet. Dieses Protein wurde nicht mit His-Tim14 von den Ni-NTA-Kügelchen koeluiert. Desweiteren wurden die

Komponenten des membranständigen Teils des TIM23-Komplexes unter diesen Bedingungen nicht mit His-Tim14 gereinigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tim16 mit Tim14 interagiert, während die Interaktion beider Proteine mit den membranintegralen Komponenten des TIM23-Komplexes nach Solubilisation mit TritonX-100 nicht stabil ist.

#### 4.3.2 Tim16 ist ein konserviertes Protein, welches dem J-Protein Tim14 strukturell ähnelt

Das identifizierte Protein Tim16 besitzt 149 Aminosäurenreste und ist im gesamten Reich der Eukaryoten hoch konserviert (siehe Abb. 22a).

**a**

Sc Tim16	MAHRAFIQVILITCTQVEGKAFABAYEQAASQSVKQGATNAS...RRRTGKGEY	50
Sp bc713	MSLPRAVGRFHIVCSOVMSKAFVQAYKQMIANAAQSTGQAAAS...KSTAVRR	52
Dm BLP	MAKYIACIIVLCAQAVGRAFTKALROEIAASQEAARRAGGGKQGDKSAESNLR	53
Hs MAGMAS	MAKYLACIIVMCEVQVCRFAFARALROEFAASRAAADARG...RAGHRSAASNL	51
Sc Tim16	GELTLDSECKITLNIIESKGLDLMNDKINNRFNYPFEVNDKEKGGSFYLOSKVVRRA	105
Sp bc713	GEMTITQEAAGSITLNIKPEISLE...EGELEKRFQKMFENDPKGGSFYLOSKVVRRAH	105
Dm BLP	TGMTLEEAQKILLNDDPKN...VDALTKNYEHLFOVNERSKGGSFYLOSKVVRRAK	105
Hs MAGMAS	SGLSLQEAQQILLNWSKLS...PEEVQKNYEHLFKVNDKSVGGSFYLOSKVVRRAK	102
Sc Tim16	ERLKWELAQREKNAKAKAGDASTAKPPPNSTNSGADNSASSNQ	149
Sp bc713	ERLKSLEDQKIQEQSPAKPTSSP	128
Dm BLP	ERLDHEIKAHQPRSSNTEAAQDTAEESSQSRSRQRR	141
Hs MAGMAS	ERLDEELKIQAGEDREKQMPHT	125

**b**

Tim16	.....	0
Tim14	MSSQNTGNSLEAPQLPIPGQTNGSANVTVDGAGVNVGIQNGSQGQKTGMPLYFD	55
Tim16	.MAHRAFIQVILITCTQVEGKAFABAYRQAASQSVKQCATNASRRGTCKEYGGIT	54
Tim14	QALNYMGEHPVITCFGARLTLYFTAGAYKSISKGLNCGKSTAFLEKCFDPKMN	109
	H1 H2 H3	
Tim16	LDESECKITLNIIESKGLDLMNDKINNRFNYPFEVNDKEKGGSFYLOSKVVRRAERIK	109
Tim14	SKEALQILLNLTENTLTKKKLKEVHRKIMLANHPDK...GGSPFLATKINEAKDFTE	162
	H1 H2 H3	
Tim16	WELAQREKNAKAKAGDASTAKPPPNSTNSGADNSASSNQ	149
Tim14	KRGISK	168

**Abb. 22: Tim16 ist ein konserviertes Protein mit struktureller Ähnlichkeit zu Tim14**

(a) Vergleich der Aminosäuresequenzen von homologen Tim16 Proteinen verschiedener Organismen  
 Sc: *Saccharomyces cerevisiae* / Sp: *Schizosaccharomyces pombe* / Dm: *Drosophila melanogaster* / Hs: *Homo sapiens*. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäurereste mit einer Identität von 75% sind grau unterlegt.

(b) Vergleich der Aminosäuresequenz von Tim14 und Tim16 aus *S. cerevisiae*. Vorhergesagte  $\alpha$ -Helices (H1, H2 und H3) sind durch Balken in Tim14 und Tim16 markiert. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Das HPD-Motiv in Tim14 und der entsprechende Bereich in Tim16 ist durch einen Rahmen markiert

In *S. cerevisiae* hat es ein Molekulargewicht von etwa 16 kDa; sein isoelektrischer Punkt liegt bei 10,25. Der aminoternale Bereich von Tim16 weist überwiegend hydrophobe Aminosäurereste auf und könnte mit mitochondrialen Membranen assoziiert sein. Ein

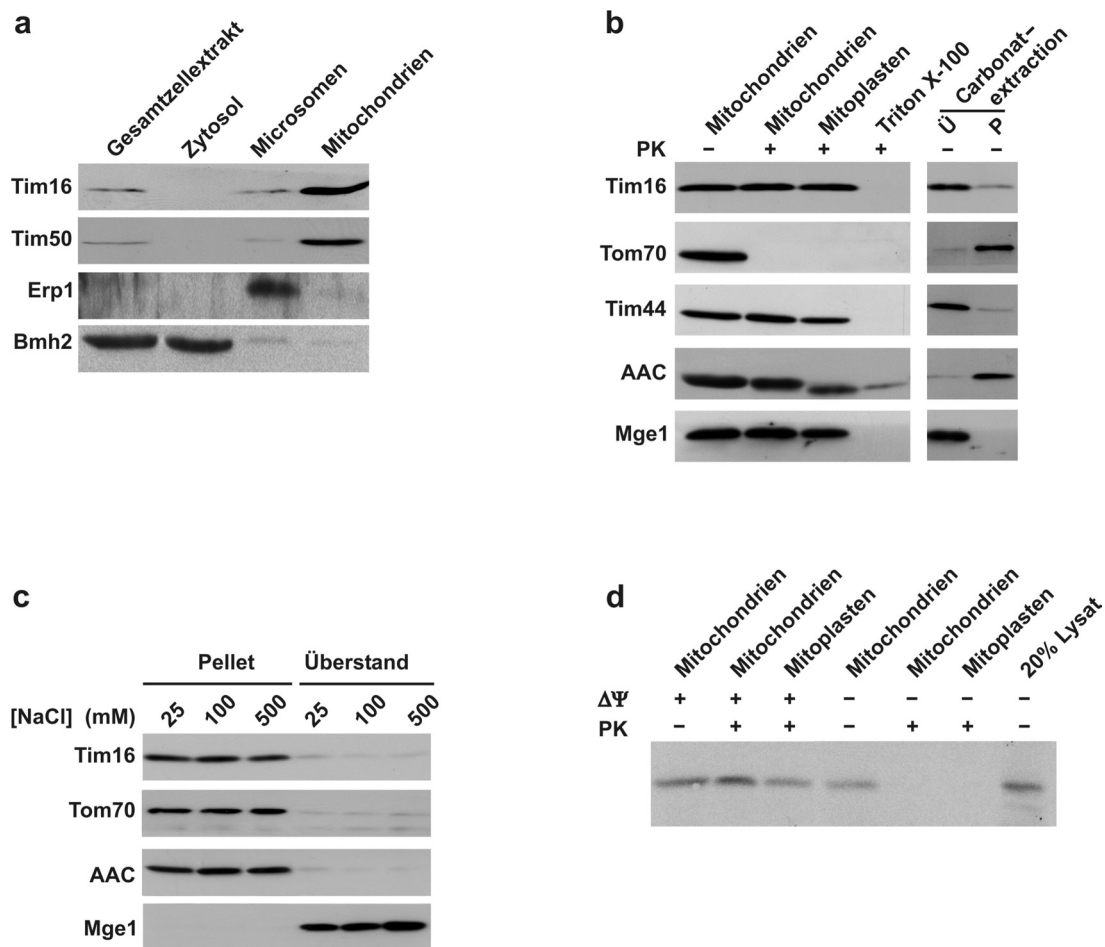
charakteristisches Matrixsortierungssignal ist nicht vorhanden. Tim16 aus *S. cerevisiae* zeigt limitierte Sequenzhomologie zu dem J-Protein Tim14 der Hefe. Gemäß der Vorhersage der Sekundärstrukturen ähneln sich beide Proteine bezüglich der Anordnung der  $\alpha$ -Helices im C-terminalen Bereich allerdings stark (siehe Abb. 22b). Diese Abfolge von drei  $\alpha$ -helicalen Segmenten ist mittels NMR-Spektroskopie im bakteriellen Kochaperon DnaJ experimentell nachgewiesen worden. Tim16 kann somit als ein J-Protein-ähnliches Protein bezeichnet werden.

#### **4.3.3 Tim16 ist ein mitochondriales Matrixprotein, welches mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert ist**

Zur Charakterisierung des Proteins wurde zunächst dessen Lokalisation bestimmt. Durch differentielle Zentrifugation wurden Fraktionen der verschiedenen Zellkompartimente Zytosol, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien gewonnen (siehe 3.7.2). Die Proteinfractionen wurden durch Westernblot-Analyse und Immundekoration analysiert. Tim16 wurde in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen. Als Kontrollproteine für die zellulären Kompartimente dienten Bmh1 für das Zytosol, Erp1 für das endoplasmatische Retikulum, sowie Tim50 für die mitochondriale Fraktion (siehe Abb. 23a).

Die submitochondriale Lokalisation wurde durch PK-Behandlung von Mitochondrien und von Mitoplasten bestimmt. Mitoplasten wurden durch das hypotone Schwellen zum Öffnen der Außenmembran erzeugt. Tim16 wurde durch PK nicht abgebaut, wenn Mitochondrien oder Mitoplasten mit der Protease behandelt wurden (Abb. 23b). Dagegen war das Außenmembranprotein Tom70 für den Abbau durch PK in Mitochondrien zugänglich. Innenmembranproteine mit Segmenten im Intermembranraum, wie der AAC, waren nur in Mitoplasten, aber nicht in Mitochondrien sensitiv gegenüber der Protease. Beim Proteaseverdau von AAC entstand ein Fragment, welches etwas kleiner als das intakte Protein ist. Die mitochondrialen Matrixproteine Tim44 und Mge1 verhalten sich wie Tim16: Sie sind gegen Proteaseverdau in Mitochondrien und Mitoplasten geschützt. Wenn die mitochondrialen Membranen durch Behandlung mit dem Detergens TritonX-100 geöffnet wurden, wurden Tim44 und Mge1 sowie Tim16 durch PK abgebaut. Dies zeigt, dass die für Mitochondrien und Mitoplasten beobachtete Proteaseresistenz von Tim16 nicht eine intrinsische Eigenschaft des Proteins ist.





**Abb. 23: Tim16 ist ein mitochondriales Matrixprotein, assoziiert mit der inneren mitochondrialen Membran**

(a) Subzelluläre Lokalisierung von Tim16 in Mitochondrien. Es wurden Proteinfractionen (50  $\mu$ g) verschiedener Zellkompartimente einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Nach Westernblot-Analyse erfolgte der Immunnachweis mit den Antikörpern gerichtet gegen die aufgeführten Proteine. (b) Submitochondriale Lokalisierung von Tim16 in der mitochondrialen Matrix. Mitochondrien und Mitoplasten eines WT-Stammes wurden mit PK (100  $\mu$ g/ml) behandelt. Ebenso wurden Mitochondrien untersucht, die keinem Proteaseverdau unterworfen worden waren. Zum vollständigen Solubilisieren von Mitochondrien wurde TritonX-100 benutzt. Die Proben wurden wie in (a) beschrieben untersucht. (c) Membranassoziation von Tim16 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Durch Ultraschallbehandlung von WT-Mitochondrien in Puffern verschiedener Salzkonzentration und darauffolgender Ultrazentrifugation wurden lösliche mitochondriale Bestandteile und Membranen voneinander getrennt. Die Analyse der Proben erfolgte wiederum durch Westernblot-Analyse und Immunnachweis der angegebenen Proteine. (d) Import von Tim16 in WT-Mitochondrien. Radioaktiv markiertes Tim16 wurde membranpotentialabhängig in WT-Mitochondrien importiert und mit PK (100  $\mu$ g/ml) behandelt. Der Nachweis erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie.

Die Ergebnisse der Protease-Behandlung erlauben drei Möglichkeiten der submitochondrialen Lokalisierung: 1.) Tim16 könnte ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix sein. 2.) Tim16 könnte ein integrales Innenmembranprotein sein, das keine für PK zugänglichen Segmente im Intermembranraum besitzt. 3.) Tim16 ist peripher mit der Matrixseite der Innenmembran assoziiert. Um das Subkompartiment zu bestimmen, wurde einerseits eine

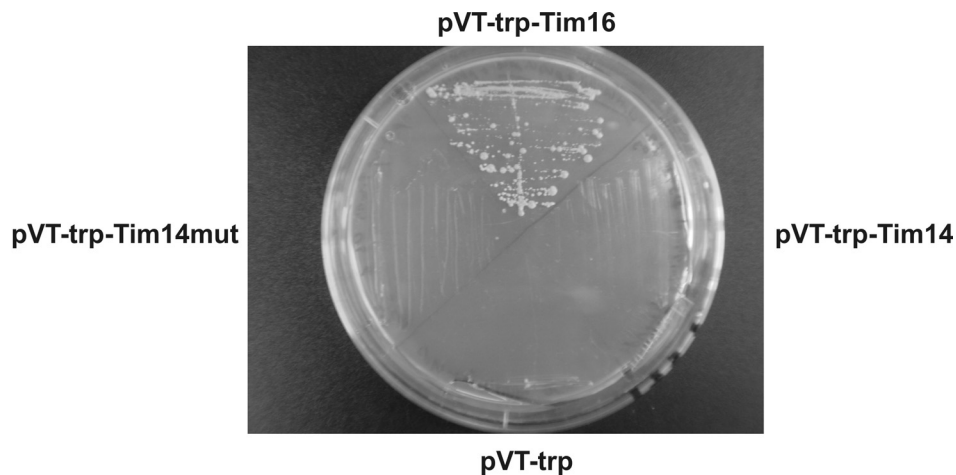
Carbonatextraktion durchgeführt (siehe 3.7.5.3) andererseits wurden mitochondriale Membranen bei verschiedenen Salzgehalten isoliert (siehe 3.7.5.4). Membranproteine können durch Behandlung mit 0,1 M Carbonat bei pH 11,5 nicht aus der Membran herausgelöst werden und finden sich nach Ultrazentrifugation im Pellet (z.B. Tom70, AAC), während nicht integrale Membranproteine im Überstand verbleiben. In diesem Versuch verhält sich Tim16 wie die löslichen Proteine Tim44 und Mge1 (siehe Abb. 23b). Es handelt sich nicht um ein integrales Membranprotein. Wenn Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und lösliche Proteine wie Mge1 und Membranvesikel durch Ultrazentrifugation getrennt wurden, blieb Tim16 bei 500 mM NaCl mit den Membranen assoziiert (siehe Abb. 23c).

Zusammenfassend ist Tim16 ein Matrixprotein, das eng mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert ist. Die Assoziation mit der Membran könnte über den hydrophoben Aminoterminus oder über eine hydrophobe Interaktion mit Proteinen der inneren mitochondrialen Membran vermittelt werden. Die mitochondriale Lokalisation wurde auch durch den Import von *in vitro* hergestelltem radioaktiv markiertem Tim16-Präprotein in Mitochondrien untermauert (siehe Abb. 23d). Trotz des Fehlens einer spaltbaren, mitochondrialen Signalsequenz wird Tim16 in die mitochondriale Matrix importiert. Der Mechanismus für den zielgerichteten Import ist hierbei noch nicht geklärt und Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

#### 4.3.4 Tim16 ist ein essentielles Protein

Als nächstes sollte überprüft werden, ob Tim16 ein essentielles Protein für das Wachstum der Hefe darstellt. Um diese Frage zu klären, wurde zunächst in einem diploiden Wildtypstamm ein Allel von Tim16 mittels homologer Rekombination durch das *HIS3*-Gen ersetzt (siehe 3.5.1.4.2). Dieser Stamm wurde mit einem Überexpressionsplasmid transformiert, das sowohl *TIM16* als auch den *URA3*-Selektionsmarker trägt (pVT-ura-Tim16). Nach Sporulation konnte ein haploider Stamm generiert werden, dessen chromosomale Kopie von *TIM16* disruptiert war, der aber durch Expression des plasmidkodierten Tim16 gerettet wurde. Dieser haploide Stamm wurde mit einem Überexpressionsplasmid transformiert, das sowohl Tim16 als auch den *TRP1*-Selektionsmarker trägt (pVT-trp-Tim16). Als Kontrolle diente das leere Plasmid (pVT-trp). Danach wurden die Stämme auf 5'-Fluoroorotsäure-Platten übertragen. Auf diesem Medium wuchsen nur Stämme, die kein *URA3*-Gen besitzen. Deshalb hatten alle lebensfähigen Stämme das Plasmid mit dem *URA3*-Marker und *TIM16* verloren (siehe

3.5.1.6). Nur der Stamm, der mit pVT-trp-Tim16 transformiert worden war, und somit noch Tim16 exprimiert, konnte unter diesen Bedingungen wachsen. Der mit Vektor transformierte Stamm enthielt kein *TIM16* und war nicht lebensfähig. Somit handelt es sich bei *TIM16* um ein essentielles Gen.



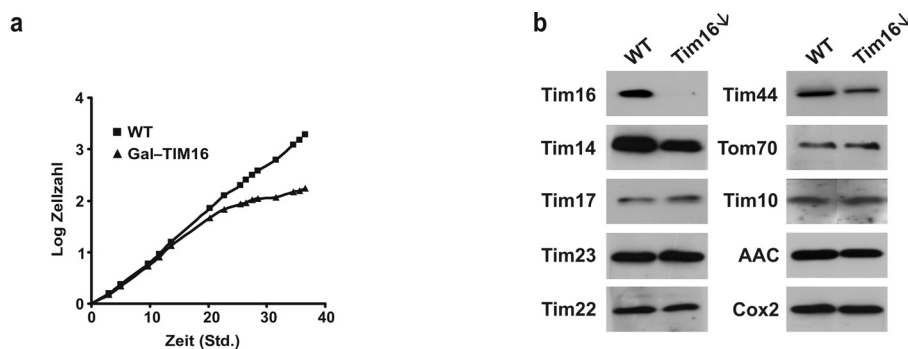
**Abb. 24 : Komplementation der Tim16-Disruption**

Ein heterozygoter Stamm, bei welchem eine Kopie des *TIM16*-Gens mit der *HIS3*-Kassette disruptiert worden war, wurde mit einem Überexpressionsplasmid für Tim16 mit Uracyl-Selektionsmarker transformiert (pVT-ura-Tim16). Dieser Stamm wurde sporuliert und ein homozygoter Stamm generiert, in welchem *TIM16* disruptiert ist und gerettet wird durch Expression des plasmidkodierten Tim16. Dieser Stamm wurde mit Überexpressionsplasmiden mit Tryptophan-Selektionsmarker transformiert, die entweder Tim14 (pVT-trp-Tim14), Tim14 mit mutiertem HPD-Motiv (pVT-trp-Tim14<sub>mut</sub>) oder Tim16 (pVT-trp-Tim16) kodierten. Als Kontrolle diente das leere Plasmid (pVT-trp). Durch Überführen auf die abgebildete 5-FOA-Platte wird der Verlust des Plasmids pVT-Ura-Tim16 induziert. Die Überexpression von Tim14 bzw. Tim14<sub>mut</sub> kann nicht die Deletion von Tim16 retten.

Wie in Abb. 22b gezeigt, besitzen Tim14 und Tim16 bezüglich ihrer Sekundärstruktur starke Ähnlichkeit. Allerdings fehlt Tim16 das HPD-Motiv, das für J-Proteine charakteristisch ist. Möglicherweise könnte aber die Expression von Tim14 mit mutiertem HPD-Motiv, die Disruption von Tim16 retten. Deshalb wurde der haploide Disruptionsstamm von *TIM16*, der durch die Expression von plasmidkodiertem Tim16 (pVT-ura-Tim16) lebensfähig ist, mit Überexpressionsplasmiden mit *TRP1*-Selektionsmarker transformiert, die entweder *TIM14* (pVT-trp-Tim14) oder *TIM14*<sub>mut</sub> mit dem Aminosäureaustausch H141Q tragen (pVT-trp-Tim14<sub>mut</sub>). Nach Verlust des Plasmids pVT-ura-Tim16 ergab sich trotz der Überexpression von Tim14 oder von Tim14<sub>mut</sub> ein letaler Phänotyp (siehe Abb. 24). Die Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von Tim14 nicht in der Lage ist, die Disruption von Tim16 zu retten. Es ist nicht ausreichend, das HPD-Motiv in Tim14 zu mutieren, um ein Protein zu generieren, welches die Funktion von Tim16 übernehmen kann.

#### 4.3.5 Die Depletion von Tim16 beeinflusst den Import über den TIM23-Komplex

Um die Funktion von Tim16 zu untersuchen, wurde ein haploider Stamm generiert, bei welchem durch homologe Rekombination der Bereich vor dem *TIM16* Gen durch den *GAL10*-Promotor ausgetauscht wurde (Gal-TIM16). Durch Wachstum in galaktosehaltigem Medium ist es möglich, Tim16 zu exprimieren, in galaktosefreiem Medium wird die Expression von Tim16 reprimiert. Die Depletion von Tim16 bei Wachstum in Medium ohne Galaktose führte zu einem deutlichen Wachstumsdefekt (siehe Abb. 25a). Dies bestätigte die essentielle Funktion von Tim16 für das Wachstum der Hefe. Für die folgenden Importstudien wurden Mitochondrien nach 30 Stunden Anzucht in galaktosefreiem Medium isoliert. Zu diesem Zeitpunkt war bereits ein deutlich verlangsamtes Wachstum zu erkennen. Durch Westernblot-Analyse der isolierten Mitochondrien des Gal-TIM16 Stammes im Vergleich zu Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes wurde gezeigt, dass Tim16 nicht mehr in nachweisbaren Mengen vorhanden war (Abb. 25b). Die meisten getesteten Proteine, die am Proteinimport in Mitochondrien beteiligt sind (Tim17, Tim23, Tim22, Tim44, Tim10 und Tom70), waren in ihrer endogenen Menge kaum verändert. Man fand eine geringfügig schwächere Expression für endogenes Tim14. Weitere Kontrollproteine der Innenmembran, wie AAC und Cox2, schienen nicht beeinflusst zu sein.



**Abb. 25: Tim16 ist ein essentielles Gen**

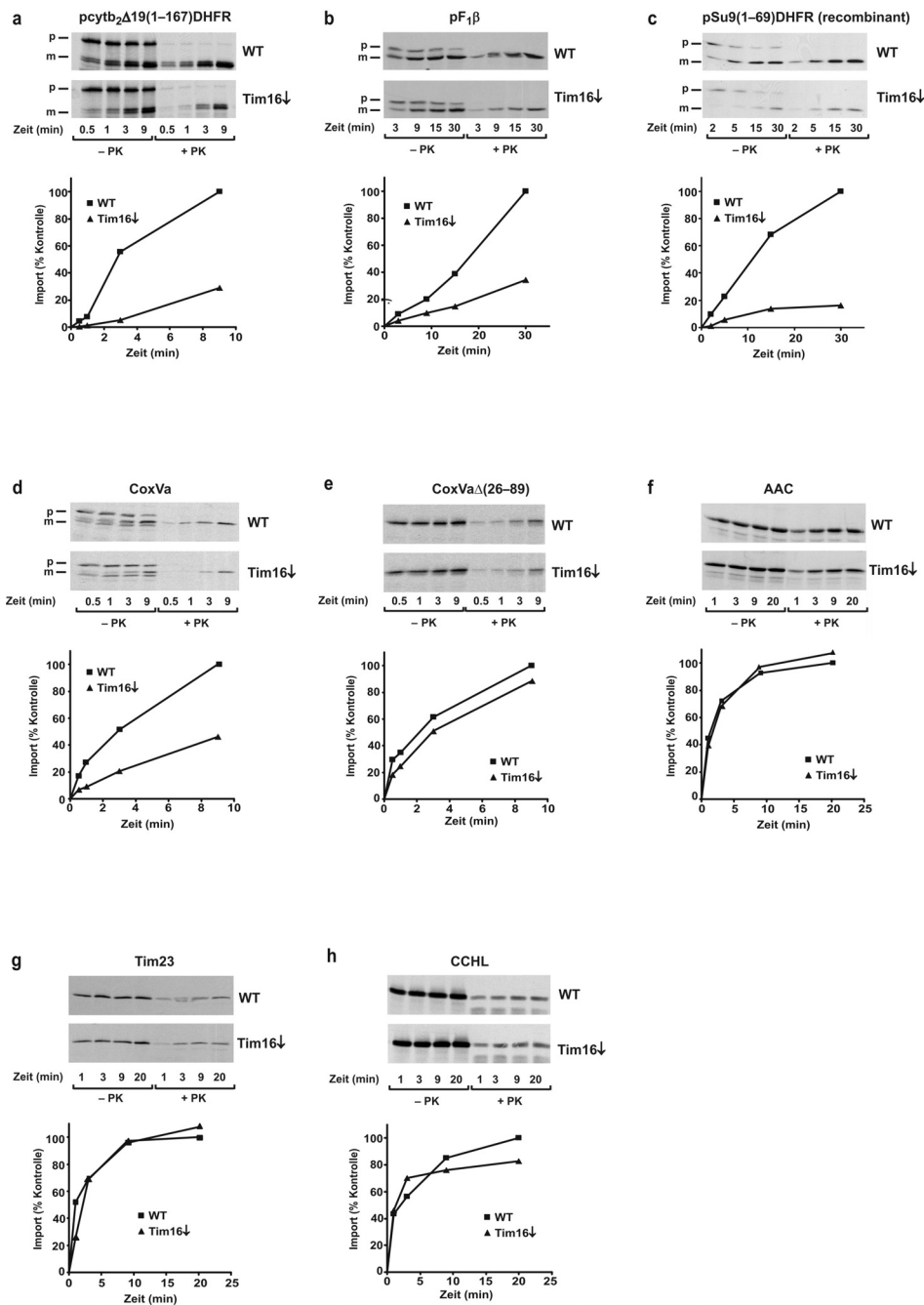
(a) Tim16 steht unter Kontrolle des *Gal10*-Promotors. Durch Wechsel zu einem galaktosefreien Medium zum Zeitpunkt Null wird die Expression von Tim16 herunterreguliert. Das Wachstum im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtypstamm ist dargestellt. (b) Das Expressionsniveau von Proteinen verschiedener mitochondrialer Kompartimente und verschiedener Komponenten der Importmaschinerien wurden nach 30 Stunden Wachstum ohne Galaktose durch Westernblot-Analyse und Immundetektion mit den angegebenen Antikörpern bestimmt.

Um zu untersuchen, ob Tim16 für den Import von Proteinen in Mitochondrien benötigt wird, wurden *in vitro* Importstudien durchgeführt (siehe 3.7.6) Dabei wurden Präproteine in Wildtyp-Mitochondrien und Mitochondrien importiert, bei welchen Tim16 depletiert worden

war. Die ausgewählten Präproteine waren Substrate verschiedener Importwege in Mitochondrien (Abb. 26 **a-h**).

Als Substrate des TIM23-Komplex wurden folgende Präproteine verwendet: pcyt $b_2\Delta$ 19(1-167)DHFR, ein Fusionsprotein aus der Dihydrofolatreduktase von Maus mit den ersten 167 Aminosäuren von Cytochrom  $b_2$ , ohne das Signal für die Sortierung in die Innenmembran; F1 $\beta$ , dem Präprotein der  $\beta$ -Untereinheit der F $_1$ F $_0$ -ATP-Synthase (Abb. 26**b**); pSu9(1-69)DHFR, ein Konstrukt aus der Dihydrofolatreduktase mit den ersten 69 Aminosäuren der Untereinheit 9 der F $_1$ F $_0$ -ATP-Synthase von *N. crassa* (Abb. 26**c**); CoxVa, dem Präprotein der Untereinheit 5 der Cytochromoxidase (Abb. 26**d**), und CoxVa( $\Delta$ 26-89), dem Präprotein der Untereinheit 5 der Cytochromoxidase ohne den Matrixteil des Proteins (Abb. 26**e**). Diese Proteine, mit Ausnahme von pSu9(1-69)DHFR, wurden als radioaktiv markierte Proteine synthetisiert und in Mitochondrien importiert. Nach dem Import wurden die mitochondrialen Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie. pSu9DHFR wurde rekombinant mit carboxyterminalem Hexahistidinyl-Anhang hergestellt und über Ni-NTA-Agarose gereinigt. Das rekombinante pSu9DHFR wurde in Mitochondrien importiert und die mitochondrialen Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Westernblot-Analyse untersucht. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern, die gegen die Histidinylsequenz gerichtet waren. Der Import dieser TIM23 Substrate war in Mitochondrien mit depletiertem Tim16 stark reduziert. Eine Ausnahme stellte CoxVa( $\Delta$ 26-89) dar. Im Vergleich zu CoxVa fehlt diesem Präprotein der Matrixteil des Proteins. Aufgrund des Fehlens wird es unabhängig vom Importmotor importiert und in die innere Membran inseriert (Gärtner *et al.*, 1995). Der Import dieses Konstrukts war bei Depletion von Tim16 nicht reduziert, was auf eine Rolle von Tim16 im mitochondrialen Importmotor hinweist.

Bei CCHL handelt es sich um ein Protein des mitochondrialen Intermembranraumes, das nur den TOM-Komplex für seinen Import benötigt. Der Import von CCHL ist in Tim16 depletierten Mitochondrien nicht negativ betroffen (siehe Abb. 26**h**). AAC und Tim23 sind Proteine, die über den TIM22-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert werden. Auch diese Proteine wurden in Tim16 depletierte Mitochondrien gleichermaßen wie in Wildtyp-Mitochondrien importiert (siehe Abb. 26 **f + g**). Dies zeigt, dass die Depletion von Tim16 spezifisch den Import von Substraten hemmt, die für ihren Import den Importmotor des TIM23-Komplexes benötigen.

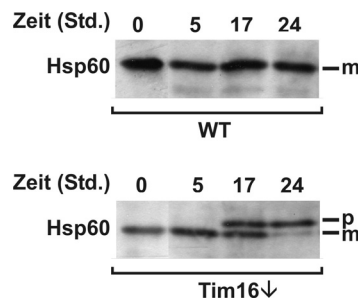


**Abb. 26: *In vitro* Import verschiedener Präproteine in Mitochondrien der Stämme Gal-Tim16 und WT nach 30 Stunden Wachstum in galaktosefreiem Medium**

Es wurden entweder radioaktiv markierte Präproteine (**a-c** und **e-h**) oder rekombinantes Präprotein (**d**) importiert. (**a**) Es handelte sich dabei um die Präproteine pcytb $\Delta$ 19(1-167)-DHFR, (**b**) F1 $\beta$ , (**c**) Su9(1-69)DHFR und (**d**) CoxVa. Dies sind Substrate, die abhängig vom Importmotor importiert werden. (**e**) CoxVa $\Delta$ (26-89) wird unabhängig vom Importmotor in die innere mitochondriale Membran inseriert. (**f**) AAC und (**g**) Tim23 sind Substrate des TIM22-Komplexes. (**h**) CCHL wird nur durch den TOM-Komplex transloziert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden nach SDS-Gelelektrophorese und Westernblot Analyse durch Autoradiographie detektiert. Der Import chemischer Mengen rekombinanten Su9(1-69)-DHFRs wurde nach der Westernblot Analyse durch Immundekoration mit Antikörpern gegen den Histidylanhang verfolgt (**c**).

*In vivo* Experimente unterstützten die erzielten Ergebnisse. Bei Defekten in der Importmaschinerie kommt es zur Anreicherung von nicht importierten Präproteinen (Kang *et*

*al.*, 1990). Dies wurde bereits für Hsp60 gezeigt. Nach Depletion von Tim16 in Zellen des Gal-TIM16 Stammes wurde auf eine Akkumulation des Präproteins von Hsp60 getestet (siehe Abb. 27). Im Gegensatz zum Wildtyp wurde in Zellen des Gal-TIM16 Stammes mit zunehmender Depletion von Tim16 das nicht prozessierte Präprotein in Gesamtzellextrakten nachgewiesen. Zusammenfassend kann man somit für Tim16 eine Rolle beim Import von Präproteinen über den TIM23-Komplex postulieren.

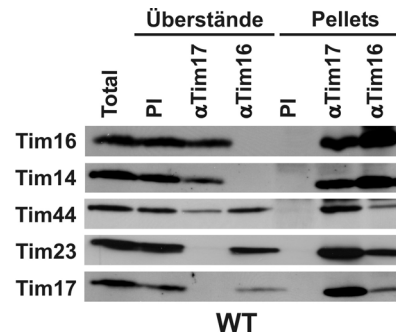


**Abb. 27: Anreicherung von Hsp60-Präprotein bei Fehlen von Tim16**

Gesamtzellextrakte des Stammes Gal-Tim16 und des zugehörigen Wildtypstammes (YPH500) wurden bei Wachstum in galaktosehaltigem Medium (Zeitpunkt 0) und nach Wachstum in galaktosefreiem Medium, supplementiert mit 0,1% Glukose, nach verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Die Anreicherung von Hsp60-Präprotein wurde mittels Westernblot und Immundekoration nachgewiesen.

#### 4.3.6 Tim16 ist eine Komponente des TIM23-Komplexes

Da Tim16 am Import über den TIM23-Komplex beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob Tim16 eine Komponente des TIM23-Komplexes ist. Dazu wurden Mitochondrien des Wildtypstammes mit 1% Digitonin solubilisiert und eine Immunpräzipitation mit Präimmenserum oder Antikörper gegen Tim17 bzw. Tim16 durchgeführt (siehe 3.8.5). Bei Verwendung dieses milden Detergens ist die Integrität des TIM23-Komplexes gewährleistet. Während Tim23 vollständig zusammen mit Tim17 präzipitiert wurde, wurden Tim44, Tim14 und Tim16 nur teilweise gebunden (siehe Abb. 28). Dennoch wurden alle TIM23-Komponenten nach Fällung mit dem Antikörper gegen Tim17 koeluiert. Die Koimmunfällung mit dem Antikörper gegen Tim16 bestätigte das Ergebnis. Im Eluat der Immunfällung wurden alle Komponenten nachgewiesen. Neben Tim16 wurde auch Tim14 aus dem Solubilisat depletiert, während Tim17, Tim23 und Tim44 nicht vollständig gebunden wurden. Dies spricht für einen stabilen Subkomplex aus Tim14 und Tim16, der weniger stabil mit den Komponenten Tim44, Tim17 und Tim23 interagiert.



#### Abb.28: Tim16 ist Bestandteil des TIM23-Komplexes

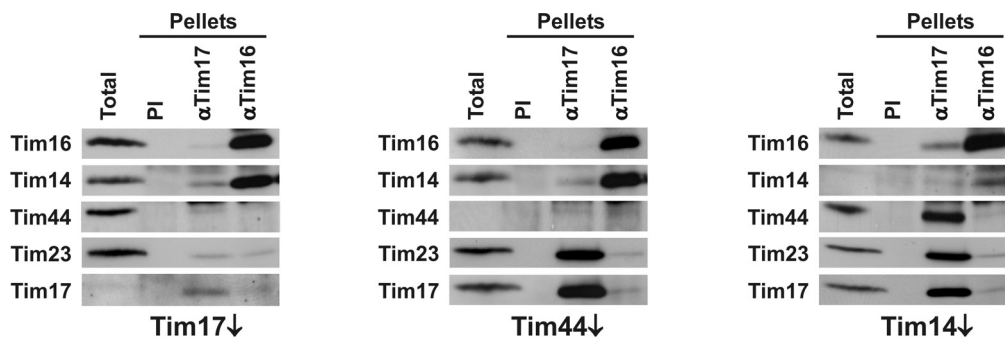
Koimmunpräzipitation aus Mitochondrien des Wildtypstammes YPH499 (1 mg/ml), solubilisiert mit 1% Digitonin mit Antikörpern gegen Tim17 und Tim16. Gezeigt sind 20% des Gesamtproteingehalts der Mitochondrien (Total) und der Überstände der Immunpräzipitation mit Präimmenserum (PI), mit Antikörpern gerichtet gegen Tim17 und gegen Tim16. Die Pellets repräsentieren die Proteine, die durch die angegebenen Antikörper präzipitiert werden konnten.

#### 4.3.7 Tim44 vermittelt die Interaktion des TIM14/16-Subkomplexes mit dem Tim17/23-Subkomplex

Welche Komponente die Interaktion des Tim14/16-Subkomplexes mit den membranintegralen Komponenten Tim17/Tim23 vermittelt, wurde durch Koimmunfällungen untersucht. Dazu wurden isolierte Mitochondrien von Stämmen verwendet, bei welchen spezifisch die Komponenten Tim17, Tim44 bzw. Tim14 depletiert wurden (Abb. 29). Bei allen Stämmen war die entsprechende Komponente in mit Digitonin solubilierten Mitochondrien nicht mehr nachweisbar (Total). Auch für diese Koimmunfällungen wurden gegen Tim17 und gegen Tim16 gerichtete Antikörper an Protein-A-Sepharose gebunden.

In Tim17 depletierten Mitochondrien konnte mit dem Antikörper gegen Tim16 nach wie vor der TIM14/16-Subkomplex gefällt werden. Die Fällung von TIM-Komponenten aus diesen Mitochondrien mit dem Tim17-Antikörper war nicht möglich. Aus dem Solubilisat Tim44 depletierter Mitochondrien wurde der integrale Membrankomplex aus Tim17 und Tim23 mit Antikörpern gegen Tim17 isoliert, während Tim16-Antikörper den TIM14/16-Subkomplex jedoch nicht Tim17 und Tim23 präzipitierte. Bei Fehlen von Tim14 konnten die Komponenten Tim17, Tim23 und Tim44 zusammen gefällt werden, jedoch nicht Tim16. Tim14 und Tim16 bilden somit einen stabilen Subkomplex. Tim17, Tim23 und Tim44 interagieren unabhängig vom Tim14/Tim16-Subkomplex. Tim44 ist in der Lage, den Tim14/Tim16-Subkomplex an den Importkanal zu rekrutieren.





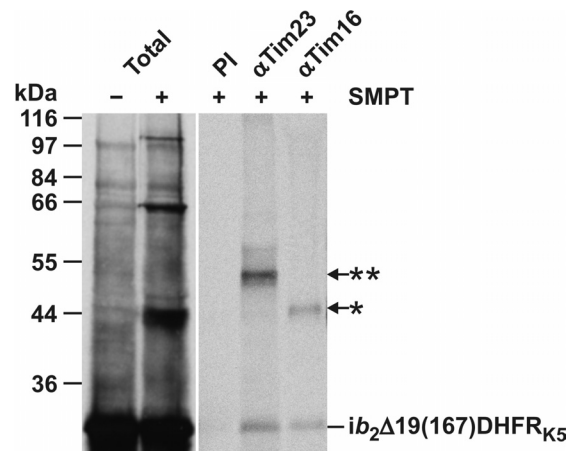
**Abb. 29: Tim14 und Tim16 bilden einen Subkomplex, der über Tim44 mit dem TIM23-Komplex interagiert**

Koimmunpräzipitation aus Mitochondrien verschiedener Stämme, die die angegebenen Tim-Komponenten unter der Kontrolle des Gal-Promotors exprimieren, nach Depletion der entsprechenden Komponenten in galaktosefreiem Medium, supplementiert mit 0,1% Glucose. Die Mitochondrien (1 mg/ml) wurden mit 1% Digitonin solubilisiert. Die Koimmunfällung wurde mit Antikörpern gegen Tim17 und Tim16 durchgeführt. Gezeigt sind 20% des Gesamtproteingehalts der Mitochondrien (Total), und Proteine, die mit den angegebenen Antikörpern kopräzipitiert wurden.

#### 4.3.8 Tim16 ist in der Nachbarschaft translozierender Präproteine lokalisiert

Die Beteiligung von Tim16 im aktiven Importkomplex konnte auch durch seine räumliche Nähe zu einem Präprotein gezeigt werden, das während des Imports arretiert wurde (siehe 3.6.14). Als Präprotein wurde radioaktiv markiertes  $pb_2\Delta 19(167)DHFR_{K5}$  verwendet (Schneider *et al.*, 1994). Nach Arretieren mittels Methotrexat erhielt man ein Importintermediat, das sowohl den TOM-Komplex als auch den TIM23-Komplex spannte. Dabei stabilisierte das Dihydrofolatanalogon Methotrexat den gefalteten Zustand von DHFR, sodass die weitere Translokation durch den TOM-Komplex nicht möglich war. Durch Behandlung mit einem quervernetzenden Agens wurde dieses Intermediat mit benachbarten Komponenten gekoppelt. Quervernetzungsprodukte zu spezifischen Komponenten konnten durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen diese Proteine gefällt werden. Die spezifischen Quervernetzungsprodukte zu dem radioaktiv markierten Importintermediat wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und durch Autoradiographie ausgewertet. Präimmunsereum führte nicht zur Fällung von Quervernetzungsprodukten. Dagegen wurde mit Antikörpern gegen Tim23 ein Quervernetzungsprodukt aus Tim23 und dem radioaktiven Präprotein nachgewiesen. In der Elution der Präzipitation mit Tim16 Antikörpern wurde ebenfalls ein Quervernetzungsprodukt detektiert. Das Produkt zeigt ein Laufverhalten in der Gelelektrophorese, welches dem eines

Produktes aus Tim16 mit dem Präprotein entspricht. Demnach ist Tim16 während des Imports von Präproteinen in engem Kontakt mit der translozierenden Polypeptidkette.



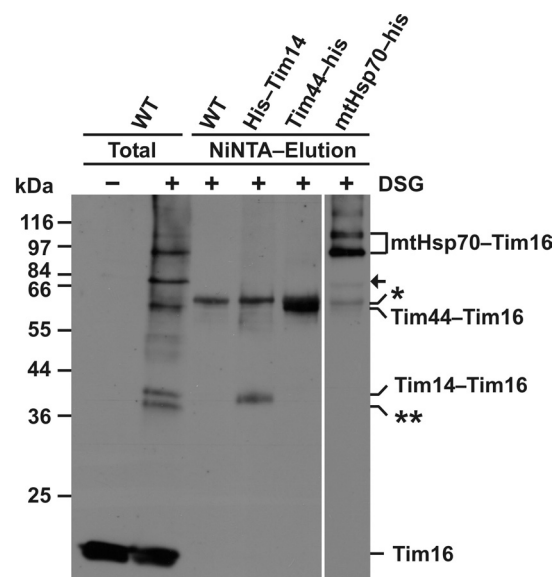
**Abb. 30: Tim16 kann mit translozierenden Präproteinen quervernetzt werden.**

Radioaktiv markiertes Präprotein  $pb_2\Delta 19(167)DHFR_{K5}$  wurde beim Import arretiert und spannt als Intermediat die äußere und die innere Membran. Quervernetzung zu benachbarten Proteinen wurde durch Zugabe von SMPT durchgeführt, eine weitere Probe blieb unbehandelt. Ein Teil wurde als Ausgangsmaterial (Total) verwahrt, der Rest wurde einer Immunpräzipitation mit den angegebenen Antikörpern oder Präimmenserum unterworfen. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, mittels Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Autoradiographie ausgewertet. Die letzten drei Spuren wurden doppelt solange exponiert. i steht für das Intermediat von  $pb_2\Delta 19(167)DHFR_{K5}$ , mit einem Stern (\*) gekennzeichnet ist das Quervernetzungsprodukt zu Tim16, mit zwei Sternen (\*\*\*) das zu Tim23. Mit Total gekennzeichnet ist 20 % des eingesetzten Materials.

#### 4.3.9 Tim16 interagiert mit den mitochondrialen Motorkomponenten Tim14, Tim44 und mtHsp70

Um zu überprüfen, mit welchen Komponenten des mitochondrialen Importmotors Tim16 interagiert, wurden Quervernetzungsexperimente in Mitochondrien durchgeführt, die jeweils eine Komponente des mitochondrialen Importmotors mit Histidinylanhang exprimierten (siehe 3.6.14). In diesen Stämmen war das endogene Allel der entsprechenden Komponente mittels homologer Rekombination durch eine Kopie ersetzt worden, die für die Variante mit Histidinylanhang kodierte. Nach Quervernetzung wurden die Mitochondrien mit SDS solubilisiert und mit TritonX-100 haltigem Puffer verdünnt bevor das Solubilisat auf Ni-NTA-Agarose-Material geladen wurde. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot und Immunnachweis gegen Tim16 analysiert. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Mitochondrien verwendet, die man entweder ebenso mit quervernetzendem Agens behandelt hatte oder die unbehandelt verblieben waren. Der Vergleich dieser beiden Spuren zeigte alle Quervernetzungsprodukte mit Tim16 (siehe

Abb. 31). Die meisten quervernetzten Produkte konnten durch die Koreinigung mit den bekannten Komponenten mit Histidinylsequenz identifiziert werden. Markiert sind die identifizierten Quervernetzungsprodukte von Tim16 zu Tim14, Tim44 und mtHsp70. Es verbleiben zwei nicht identifizierte Quervernetzungsprodukte. Bei dem einen (Abb. 31: ←), handelt es sich um einen bisher nicht identifizierten Interaktionspartner. Das andere (Abb. 31: ★★) ist aufgrund der Größe vermutlich ein Tim16-Dimer. Durch die Ergebnisse konnte verifiziert werden, dass Tim16 in engem Kontakt zu den Motorkomponenten Tim14, Tim44 und mtHsp70 steht.

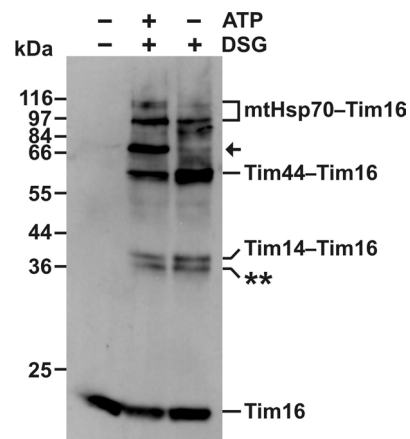


### Abb. 31: Tim16 interagiert mit Komponenten des mitochondrialen Importmotors

Mitochondrien wurden aus Stämmen isoliert, die die Motorkomponenten Tim14, Tim44 oder mtHsp70 mit Histidinylanhang exprimieren. Nach Quervernetzung mit DSG wurden die Mitochondrien (1 mg/ml) solubilisiert und die Proben mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Gebundene Proteine wurden eluiert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse untersucht. Quervernetzungsprodukte zu Tim16 wurden durch Immundekoration mit Tim16-Antikörpern identifiziert. Ein Stern (★) bezeichnet eine unspezifische Bande, zwei Sterne (★★) kennzeichnen ein potentielles Tim16-Dimer, der Pfeil (←) markiert ein bisher nicht identifiziertes Quervernetzungsprodukt.

#### 4.3.10 Tim16 interagiert dynamisch mit den Motorkomponenten mtHsp70 und Tim44

Da die Funktion des Importmotors stark ATP-abhängig ist, stellte sich die Frage, ob auch die Interaktion von Tim16 zu den Motorkomponenten durch ATP beeinflusst ist (Abb. 32). Dafür wurden Quervernetzungsexperimente in Wildtyp-Mitochondrien nach Zugabe von ATP bzw. nach ATP-Depletion durch Apyrase und Oligomycin durchgeführt. Der Nachweis der Quervernetzungsprodukte erfolgte wiederum durch SDS-Gelelektrophorese, Westernblot-Analyse und Immundekoration von Tim16. In diesen Experimenten schien bei Depletion von ATP die Interaktion von Tim16 zu Tim44 stärker zu sein, während die zu mtHsp70 deutlich schwächer war. Die Quervernetzung von Tim16 zu Tim14 wurde nicht durch ATP reguliert. Die beobachtete ATP-Abhängigkeit der Interaktionen von Tim16 zu Motorkomponenten unterstützt entschieden die Hypothese, dass Tim16 eine funktionelle Komponente des Motors ist.



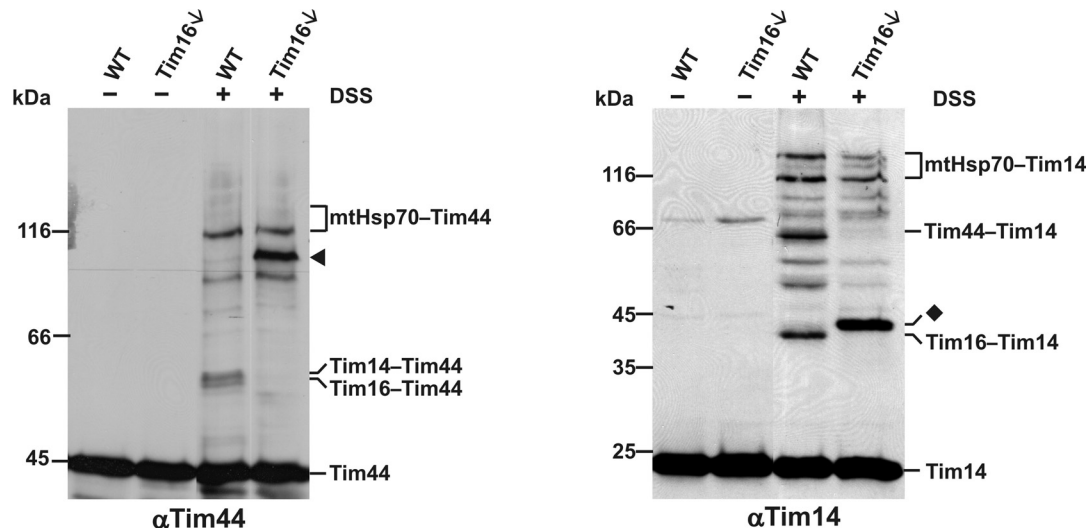
**Abb. 32: Die Interaktion von Tim16 mit mtHsp70 ist ATP abhängig.**

Mitochondrien des Wildtypstammes wurden zum einen nach ATP-Zugabe zum anderen nach ATP-Depletion mit DSG zur Quervernetzung versetzt. Reisolierete Mitochondrien wurden einer SDS-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse unterworfen. Quervernetzungsprodukte zu Tim16 wurden mit Tim16 Antikörpern nachgewiesen. Zwei Sterne (\*\*\*) kennzeichnen ein potentielles Tim16-Dimer, der Pfeil (←) markiert ein bisher nicht identifiziertes Quervernetzungsprodukt.

#### 4.3.11 Tim16 ist essentiell für die Integrität des mitochondrialen Importmotors

Die bisherigen Ergebnisse ergaben, dass Tim16 für den Import von Substraten nötig ist, die einen funktionellen Importmotor des TIM23-Komplexes für ihren Import benötigen. Zudem steht Tim16 in räumlicher Nähe zu den membranassoziierten Komponenten des Importmotors. Es blieb zu klären, welche Funktion Tim16 in dem mitochondrialen

Importmotor übernimmt. Dazu wurden Quervernetzungsexperimente und Koimmunpräzipitationen durchgeführt.



**Abb. 33: Depletion von Tim16 führt zu signifikanten Veränderungen im mitochondrialen Motor**

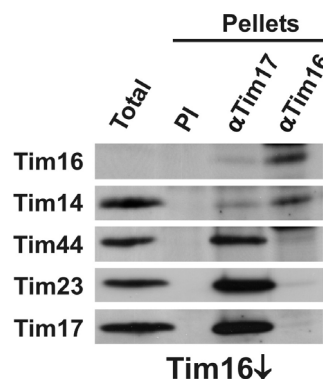
Zur Depletion von Tim16 wurde der Stamm mit Tim16 unter *GAL*-Promotorkontrolle in galaktosefreiem Medium gezogen. Als Kontrolle diente der entsprechende Wildtypstamm. Zur Quervernetzung wurden Mitochondrien beider Stämme mit DSS versetzt oder verblieben unbehandelt. Die Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse untersucht. Die Immundekoration erfolgte zum einen mit Antikörpern gegen Tim44 oder mit Antikörpern gegen Tim14. Mit einem Dreieck (▲) gekennzeichnet ist ein potentielles Tim44-Dimer, mit einer Raute (◆) ein potentielles Tim14 Dimer.

Veränderungen im mitochondrialen Motor auf Grund des Fehlens von Tim16 wurden durch Quervernetzungsexperimente in Wildtyp- und Tim16 depletierten Mitochondrien analysiert. Die quervernetzten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse untersucht und mittels Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim44 (Abb. 33 linker Teil) und Tim14 (Abb. 33 rechter Teil) nachgewiesen (siehe Abb. 33). Die Depletion von Tim16 führte zu drastischen Veränderungen der Interaktionen der beteiligten Proteine des mitochondrialen Motors. Neben dem erwarteten Verlust des Quervernetzungsprodukts von Tim16 zu Tim44, wurde Tim14 nicht mehr in der Nachbarschaft zu Tim44 gefunden. Die Interaktion von Tim44 mit Hsp70 schien aber noch vorhanden zu sein. Ein Quervernetzungsprodukt war in den Tim16 depletierten Mitochondrien deutlich stärker nachweisbar (Abb. 33: ▲). Aufgrund der Größe könnte es sich hierbei um ein Tim44 Dimer handeln, was allerdings noch untersucht werden muss. Das Quervernetzungsprodukt von Tim14 zu Tim16 konnte in Tim16 depletierten Mitochondrien nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ebenfalls kein Tim14-Tim44-Quervernetzungsprodukt in Abwesenheit von Tim16 detektiert. Die Interaktion von Tim14 mit mtHsp70 war zwar deutlich schwächer, aber

nach wie vor nachweisbar. Auffällig ist ein Quervernetzungsprodukt (Abb. 33: ◆), das in Tim16 depletierten Mitochondrien stark angereichert vorliegt. Aufgrund der Größe könnte es sich um ein Tim14-Dimer handeln. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass in Abwesenheit von Tim16 die Interaktionen der anderen Motorkomponenten verändert sind.

Die Rolle von Tim16 für die Integrität des TIM23-Komplexes wurde durch Koimmunfällungen bestätigt (siehe Abb. 34). Mitochondrien des Tim16 depletierten Stammes wurden mit Digitonin solubilisiert. An Protein-A-Sepharose gebundene Antikörper gegen Tim17 und Tim16 wurden verwendet, um die entsprechenden Komponenten und interagierende Proteine zu präzipitieren. Die präzipitierten Proteine wurden nach Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse mit Antikörpern gegen Tim16, Tim14, Tim44, Tim23 und Tim17 untersucht. Nach Depletion von Tim16 eluierten Tim17, Tim23 und Tim44 aber nicht Tim14 in einem Komplex (vgl. Abb. 28). Somit ist Tim16 für die strukturelle Vermittlung der Interaktion von Tim14 mit Tim17, Tim23 und Tim44 verantwortlich.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Tim16 bedeutend für die Integrität des Importmotors des TIM23-Komplexes ist. Tim16 ist notwendig, um das essentielle Kochaperon Tim14 mit Tim44 und den integralen Komponenten des TIM23-Komplexes zu assemblieren.

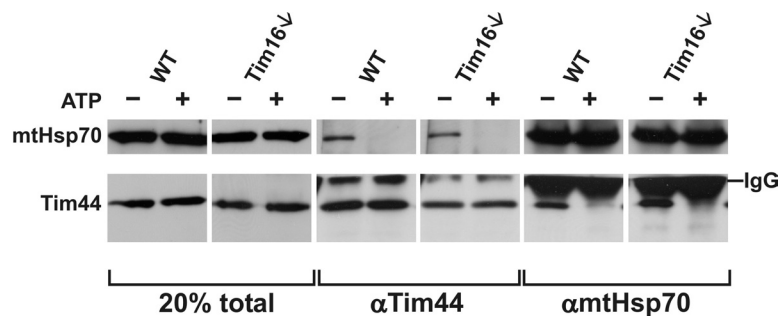


**Abb. 34: Die Depletion von Tim16 beeinflusst nicht die Stabilität des membranständigen TIM23-Komplexes**

Koimmunpräzipitation aus Mitochondrien des Gal-Tim16 Stammes nach Depletion der entsprechenden Komponente in galaktosefreiem Medium, supplementiert mit 0,1% Glucose. Als Kontrolle dienten Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes. Die Mitochondrien (1 mg/ml) wurden mit 1% Digitonin solubilisiert. Die Koimmunfällung wurde mit Antikörpern gegen Tim17 und Tim16 durchgeführt. Gezeigt sind 20% des Gesamtproteingehalts der Mitochondrien (Total) und die Proteine, die mit den angegebenen Antikörpern gefällt werden konnten. Die Immundetektion erfolgte mit den angegebenen Antikörpern.

### 4.3.13 Die Interaktion von Tim44 mit mtHsp70 ist unabhängig von Tim16

Ob die Interaktion von Tim44 zu mtHsp70 durch Depletion von Tim16 gestört wird, wurde in weiteren Koimmunfällungen untersucht. Die ATP-abhängige Interaktion von Tim44 zu mtHsp70 war bereits aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt (Moro *et al.*, 2002). Mitochondrien des Wildtypstammes und Tim16 depletierte Mitochondrien wurden unter Zugabe von ATP bzw. Zugabe von EDTA (-ATP) mit TritonX-100 solubilisiert. Für die Koimmunfällungen wurden Antikörper gegen Hsp70 oder Tim44 an Protein-A-Sepharose gekoppelt. Aus Wildtyp-Mitochondrien konnte mtHsp70 in den ATP-freien Proben zusammen mit Tim44 gefällt werden, unabhängig von der Verwendung des Tim44- oder des Hsp70-Antikörpers (siehe Abb. 35). Dies war jedoch nicht der Fall in den Proben, zu welchen ATP zugesetzt worden war (Moro *et al.*, 2002). Die gleiche Interaktion wurde auch in Mitochondrien beobachtet, in denen Tim16 depletiert war (siehe Abb. 35). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von Tim16 keinen Einfluss auf die Interaktion von Tim44 und mtHsp70 hat.



**Abb. 35: Die Depletion von Tim16 beeinflusst nicht die Stabilität der Interaktion von Tim44 mit mtHsp70**

Koimmunpräzipitation aus Mitochondrien des Gal-Tim16 Stammes nach Depletion der entsprechenden Komponente in galaktosefreiem Medium, supplementiert mit 0,1% Glucose. Parallel wurden Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes mitgeführt. Die Mitochondrien (1 mg/ml) wurden mit 0,2% TritonX-100 solubilisiert. Die Koimmunfällung wurde mit Antikörpern gegen Tim44 und mtHsp70 durchgeführt. Die Immunpräzipitation wurde mit Zugabe von ATP bzw. Zugabe von EDTA (-ATP) durchgeführt. Abgebildet sind 20% des gesamten eingesetzten Materials (20% total) und die koimmunpräzipitierten Proteine. Der Immunnachweis erfolgte mit Antikörpern gegen Tim44 und mtHsp70.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Vergleich der TIM-Translokasen von *N. crassa*, *S. cerevisiae* und dem Menschen**

Translokasen in der äußeren und inneren Membran von Mitochondrien vermitteln den Import von Proteinen in die Mitochondrien. Die Reinigung dieser Translokationskomplexe ermöglicht es, ihre Struktur und Funktion zu charakterisieren. *N. crassa* kann sehr einfach in großen Kulturen angezogen werden. Somit können Mitochondrien in großen Mengen isoliert und die Komponenten der Translokationsmaschinerien gereinigt werden. Für die Translokase der äußeren Membran aus *N. crassa* ist die Reinigung und Rekonstitution bereits gelungen (Ahting *et al.*, 1999; Künkele *et al.*, 1998b). Die Translokasen der inneren Membran sollten entsprechend aus *N. crassa* gereinigt und charakterisiert werden. Dazu war es notwendig, die Komponenten der Translokationsmaschinerien in *Neurospora crassa* zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Komponenten Tim22 und Tim54 der TIM22-Translokase und die Komponente Tim44 des Importmotors der TIM23-Translokase im Genom von *N. crassa* gefunden. Zur Identifikation dieser Komponenten wurden PCR-Reaktionen mit degenierten Primern durchgeführt, die basierend auf Sequenzen homologer Proteine anderer Pilze gewählt worden waren. Dieser Ansatz führte zur Amplifikation kurzer Bereiche der cDNA von Tim44 bzw. Tim54, die zur Identifizierung der genomischen Sequenz und der cDNA beider Proteine genutzt wurden (siehe 4.1.1.1 und 4.1.1.2). Parallel wurde das Genomsequenzierungsprojekt von *N. crassa* verfolgt. Nach der Sequenzierung eines Bereichs, der Tim22 in *N. crassa* kodierte, konnte die cDNA auch dieses Proteins bestimmt werden (siehe 4.1.1.3). Tim23 wurde durch Frau Dejana Mokranjac (Doktorarbeit Dejana Mokranjac) und Tim17 in der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Nargang (nicht publiziert) identifiziert. Die kleinen Tim-Komponenten Tim9 und Tim10 wurden durch Frau Andreja Vasiljev und Tim8 und Tim13 in der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Nargang gefunden (Hoppins *et al.*, 2004; Vasiljev *et al.*, 2004; Doktorarbeit Andreja Vasiljev). Die Komponenten Tim14 und Tim16 wurden erst im Zeitraum dieser Arbeit in *S. cerevisiae* beschrieben. Über Homologie wurden die entsprechenden Gene in *N. crassa* identifiziert. Es wurden keine Komponenten gefunden, die Tim12 und Tim18 aus *S. cerevisiae* entsprechen. Da das Genom von *N. crassa* mittlerweile vollständig sequenziert ist, kann man vom Fehlen beider Komponenten in diesem Organismus ausgehen. Somit wurden in *N. crassa* alle Komponenten der Proteintranslokasen der inneren mitochondrialen Membran identifiziert, die



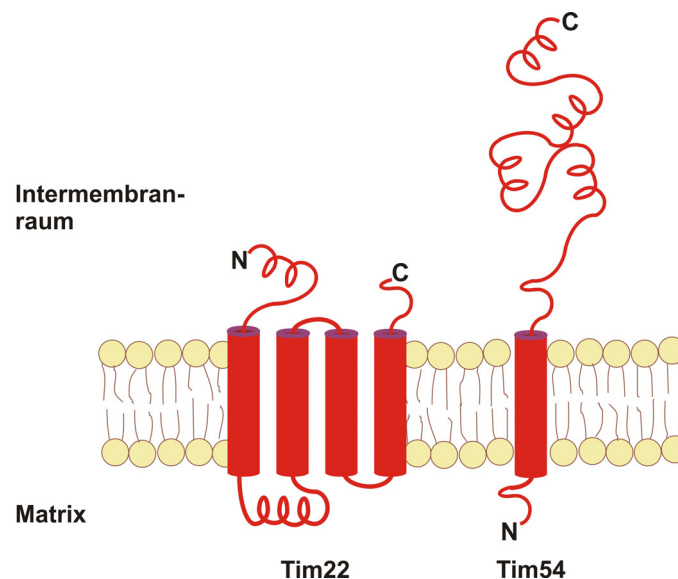
in diesem Organismus vorkommen und in *S. cerevisiae* bekannten sind. Dies zeigt den Erfolg des gewählten methodischen Ansatzes zur Identifizierung von Translokationskomponenten in *N. crassa*. Die folgende Tabelle bietet einen vergleichenden Überblick über die Komponenten der Translokationsmaschinerien der inneren mitochondrialen Membran von *S. cerevisiae*, *N. crassa* und Säugern (Hoogenraad *et al.*, 2002). Tim12 und Tim18 wurden bisher nur in *S. cerevisiae*, Tim54 nur im Reich der Pilze gefunden (Kerscher *et al.*, 1997; Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000; Sirrenberg *et al.*, 1998).

Komponente	<i>S. cerevisiae</i>	<i>N. crassa</i>	Säuger
Tim17	+	+	Tim17a Tim17b
Tim23	+	+	+
Tim50	+	+	+
Tim22	+	+	+
Tim54	+	+	-
Tim12	+	-	-
Tim18	+	-	-
Tim9	+	+	+
Tim10	+	+	Tim10a Tim10b
Tim8	+	+	Tim8a (DDP1) Tim8b (DDP2)
Tim13	+	+	Tim13
Tim44	+	+	+
Tim14	+	+	+
Tim16	+	+	+
Mge1	+	+	+

## 5.2 Charakterisierung des TIM22-Komplexes in *Neurospora crassa*

### 5.2.1 Die Lokalisation und Topologie der Komponenten Tim22 und Tim54 in *Neurospora crassa*

Die Identifizierung der Komponenten in *Neurospora crassa* ermöglichte die strukturelle und funktionelle Untersuchung der verschiedenen Translokationskomplexe. In dieser Arbeit wurde der TIM22-Komplex von *Neurospora crassa* analysiert.



**Abb. 36: Topologie der Komponenten Tim22 und Tim54 aus *Neurospora crassa***

Tim22 besitzt 4 Transmembranhelices und exponiert sowohl den C- als auch den N-Terminus in den Intermembranraum. Die Schleifen zwischen den Transmembranhelices sind in der Regel klein; die längste ist zwischen der ersten und zweiten Transmembranhelix lokalisiert und weist in den Matrixraum. Tim54 besitzt nur eine Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus, der Großteil des Proteins wird in den Intermembranraum exponiert. Die 58 N-terminalen Aminosäuren werden in die Matrix exponiert.

Antikörper gegen Tim22 und Tim54 wurden dazu verwendet, die Lokalisation und Topologie von Tim22 und Tim54 zu ermitteln (Kerscher *et al.*, 1997; Sirrenberg *et al.*, 1996). Sowohl Tim22 als auch Tim54 konnten der mitochondrialen Membranfraktion der inneren Membran zugeordnet werden. Durch Öffnen der äußeren Membran mit Digitonin und PK-Verdau wurde die Topologie von Tim22 und Tim54 geklärt. Tim22 besitzt vier Transmembrandomänen und exponiert den C- und N-Terminus in den Intermembranraum. Tim54 hat nur eine Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus, der in die Matrix weist. Den größten Teil des Proteins findet man im Intermembranraum (siehe Abb. 36). In Hefe war gezeigt worden, dass Tim54 den Großteil des Proteins in den Intermembranraum exponiert, ob es jedoch eine oder

zwei Transmembrandomänen besitzt, ist noch nicht geklärt. Die Ergebnisse zur Ermittlung der Topologie von Tim54 in *N. crassa* befürworten in diesem Organismus die Existenz nur einer Transmembrandomäne (Kerscher *et al.*, 1997). Für Tim22 konnte die gleiche Topologie ermittelt werden, wie sie auch in Hefe gefunden worden war (Sirrenberg *et al.*, 1996).

Um diese Topologie in der Innenmembran zu erreichen, benutzt Tim22 in *N. crassa* vermutlich den TIM22-Komplex. Die Substrate, die durch den TIM22-Komplex in die innere Membran inseriert werden, besitzen vier oder sechs Transmembranhelices und interne Signalsequenzen. Die internen Signalsequenzen liegen entweder in den Transmembranhelices selbst oder sind durch geladene Aminosäurereste in angrenzenden Schleifenstrukturen repräsentiert (Curran *et al.*, 2002a; Vasiljev *et al.*, 2004). Mit vier Transmembranhelices und internen Signalsequenzen anstelle einer N-terminalen Präsequenz ähnelt Tim22 den Substraten des TIM22-Komplexes (Kübrich *et al.*, 1998; Kurz *et al.*, 1999b; Sirrenberg *et al.*, 1996). In der Tat wurde für Tim22 in *S. cerevisiae* gezeigt, dass es über den TIM22-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert wird (Kurz *et al.*, 1999b; Leuenberger *et al.*, 1999; Sirrenberg *et al.*, 1996).

Für Tim54 stellte sich jedoch die Frage, wie es in die innere mitochondriale Membran inseriert wird? Es sollte untersucht werden, welche Sequenzbereiche von Tim54 den Import in Mitochondrien vermitteln. Die 58 N-terminalen Aminosäurereste von Tim54 beinhalten fünf positiv geladenen Aminosäuren aber nur eine negativ geladene Aminosäure. Damit zeigt dieser Bereich eine limitierte Ähnlichkeit zu N-terminalen mitochondrialen Signalsequenzen, die positiv geladene und hydroxylierte aber kaum negativ geladene Aminosäurereste enthalten. An diesen N-terminalen Bereich schließt sich ein hydrophobes Segment an, welches als Transmembranregion dient. Unsere Ergebnisse mit Fusionskonstrukten aus Tim54-Sequenzabschnitten und DHFR zeigen, dass die 58 N-terminalen Aminosäurereste alleine für den Import in Mitochondrien nicht ausreichend sind. Die Transmembranregion von Tim54 ist ebenfalls essentiell für dessen Import. Somit ähnelt der Import von Tim54 dem der D-Laktatdehydrogenase (DLD). Diese benötigt für ihre Insertion in die innere mitochondriale Membran eine N-terminale Signalsequenz in Kombination mit einer Transmembranregion, und nachfolgenden geladenen Aminosäureresten, was als *Stop-Transfer*-Signal dient. Ein Unterschied zur DLD besteht darin, dass der N-terminale Bereich von Tim54 im Zuge des Imports in Mitochondrien nicht abgespalten wird. Das Fehlen einer spaltbaren N-terminalen Signalsequenz wurde auch für das Tim54-Homolog von *S. cerevisiae* gezeigt (Kerscher *et al.*, 1997; Kurz *et al.*, 1999a). Durch Blockieren des Tim23-Importweges und mit Hilfe einer temperatursensitiven Mutante von Tim23 wurde für in Hefe gezeigt, dass Tim54 über den

TIM23-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert wird. Zusammenfassend kann man für NcTim54 annehmen, dass dieses über den TIM23-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert wird. Die 58 N-terminalen Aminosäurereste haben eine Funktion als N-terminale Signalsequenz, werden aber nicht durch MPP prozessiert. Die N-terminale Signalsequenz wirkt zusammen mit dem folgenden Transmembranbereich als Importsignal und vermittelt in einem *Stop-Transfer*-Weg die Insertion in die Innenmembran.

### 5.2.2 Aufbau und Stabilität des TIM22-Komplexes

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der TIM22-Komplex in *N. crassa* aus den Komponenten Tim22, Tim54, Tim9 und Tim10 besteht. Im Vergleich zu dem Komplex in *S. cerevisiae* fehlen die Komponenten Tim12 und Tim18.

In *S. cerevisiae* stellt Tim12 eine essentielle Komponente für das Wachstum der Hefe dar (Koehler *et al.*, 1998a; Sirrenberg *et al.*, 1998). Es bildet zusammen mit zwei Molekülen Tim10 und drei Molekülen Tim9 einen membranassoziierten heterohexameren Subkomplex des TIM22-Komplexes. Im Gegensatz zu diesem Komplex findet man im Intermembranraum einen löslichen heterohexameren Komplex aus drei Molekülen Tim9 und drei Molekülen Tim10. Tim12 vermittelt die Membranassoziation des TIM9/10/12-Komplexes. Es stellte sich die Frage, wie sich das Fehlen von Tim12 in *N. crassa* auf den Aufbau des TIM22-Komplexes auswirkt. Man findet etwa 10% des TIM9/10-Komplexes von *N. crassa* in Assoziation mit der mitochondrialen Innenmembran, ca. 90% sind löslich im Intermembranraum. Dies ähnelt der Verteilung der Komponenten Tim9 und Tim10 in Hefe, wo man ebenso etwa 10% membranassoziiert im TIM9/10/12-Subkomplex bzw. 90% löslich im Intermembranraum im TIM9/10 Subkomplex findet (Koehler *et al.*, 1998b). Der membranständige Anteil kann in beiden Organismen durch erhöhte Salzkonzentrationen von der Membran abgelöst werden. In dieser Arbeit wurde durch Koreinigung gezeigt, dass der membranständige Anteil des TIM9/10-Subkomplexes mit dem membranintegralen TIM22-Komplex in *N. crassa* interagiert. Somit ist Tim12 für die Interaktion des TIM9/10-Subkomplexes mit dem TIM22-Komplex in *N. crassa* nicht notwendig. Die Funktion von Tim12 wird in diesem Organismus von Tim9 oder Tim10 übernommen. Eine direkte Interaktion zwischen dem membranintegralen Teil des TIM22-Komplexes und dem TIM9/10-Komplex wird durch die Beobachtung gestützt, dass der gereinigte TIM9/10-Komplex und Tim22 *in vitro* einander binden (Daten nicht gezeigt).

Der TIM22-Komplex von *N. crassa* ist nach Solubilisation mit Detergens sehr viel instabiler als der TIM22-Komplex von *S. cerevisiae*. Trotz Verwendung des milden Detergens Digitonin wurde nur ein Teil als hochmolekularer TIM22-Komplex mit einer molekularen Masse von etwa 350 kDa detektiert. In Nativgelen und bei größeren Reinigungsansätzen zerfiel der Komplex in einen TIM54-Subkomplex einer Masse von etwa 150 kDa, einen TIM22-Subkomplex von etwa 80 kDa und einen TIM9/10-Komplex von etwa 60 kDa. Bei diesen Subkomplexen könnte es sich auf Grund der molekularen Masse um ein Di- oder Trimer von Tim54, einem Trimer von Tim22 und einen heterohexameren TIM9/10-Komplex handeln. Quervernetzungsversuche mit gereinigtem His-Tim22 zeigten, dass dieses in der Lage ist, Homooligomere zu bilden (siehe Abb. 19). Das Laufverhalten des gereinigten TIM9/10-Komplexes in der Gelfiltration und bei der Nativgelelektrophorese ergab eine molekulare Masse des Komplexes von etwa 60 kDa. (Vasiljev *et al.*, 2004). Somit bilden Tim9 und Tim10 auch in *N. crassa* einen heterohexameren Komplex.

Was könnten die Gründe sein, dass der TIM22-Komplex in *N. crassa* weniger stabil als der Komplex in Hefe ist? In *N. crassa* wurden in dem TIM22-Komplex die Komponenten Tim22, Tim54, Tim9 und Tim10 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu finden sich in Hefe Tim12 und Tim18 zusätzlich im TIM22-Komplex. Für Tim18 wurde in *S. cerevisiae* eine stabilisierende Rolle im TIM22-Komplex sowie eine Beteiligung bei der Assemblierung des Komplexes gezeigt (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Tim12 ist für die Assoziation des TIM9/10/12-Komplexes mit den integralen Komponenten des TIM22-Komplexes essentiell. Möglicherweise beruht die geringere Stabilität des TIM22-Komplexes im Detergensextrakt auf dem Fehlen von Tim12 und Tim18. In intakten Mitochondrien ist anzunehmen, dass der TIM22-Komplex von *N. crassa* nicht in Subkomplexe dissoziiert, sondern nahezu vollständig als komplett assemblierter Komplex vorliegt, da er funktionell ist.

### 5.2.3 Reinigung des TIM22-Komplexes und des Tim22

Trotz der Instabilität des TIM22-Komplexes wurde ein Teil vollständig assemblierter TIM22-Komplex nachgewiesen, der isoliert werden sollte. Im Tim54-His-Stamm wurde Tim54 durch Tim54 mit C-terminaler Oktahistidinylsequenz unter der Kontrolle des endogenen Promotors ersetzt. Dieser Stamm erlaubte keine effiziente Reinigung von Tim54-His und assoziiertem Tim22, da die Bindung an die Nickelsäule sehr ineffektiv war. Möglicherweise war die Histidinylsequenz nicht ausreichend auf der Oberfläche des Proteins exponiert. Eine Koreinigung von Tim22 war nicht möglich. Deshalb wurde ein Stamm generiert, der Tim22

mit N-terminalem Histidinylanhang unter Kontrolle des *cpc1*-Promotors überexprimierte. Dies führte zu einer acht- bis zehnfachen Überexpression von Tim22. Da in diesem Stamm kein endogenes Tim22 nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass Tim22 mit N-terminalem Oktahistidinylanhang die Funktion des endogenen Tim22 übernehmen kann.

Mitochondrien dieses Stammes wurden verwendet, um His-Tim22 zu reinigen. Nach Solubilisation in verschiedenen Detergentien unter Niedrigsalzbedingungen bestätigte sich die Instabilität des TIM22-Komplexes von *Neurospora crassa*. Nur nach Solubilisation in dem milden Detergens Digitonin konnte Tim54 in geringen Mengen mit Tim22 von der Ni-NTA-Agarose koeluiert werden. Wurden die Mitochondrien in DDM solubilisiert, war Tim54 nicht in den Elutionsfraktionen nachweisbar. Nach Solubilisation mit Digitonin oder DDM unter Niedrigsalzbedingungen konnte etwa 10% des gesamten TIM9/10-Komplexes zusammen mit Tim22 gereinigt werden. Da der TIM9/10-Komplex in Abwesenheit von Tim54 mit Tim22 isoliert wurde, lässt sich schließen, dass der TIM9/10-Komplex über die Untereinheit Tim22 an den TIM22-Komplex bindet. Dies bestätigt die zentrale Bedeutung von Tim22 im TIM22-Komplex. Die Verwendung von Salzkonzentrationen größer als 300 mM führte zum Verlust der Interaktion des TIM9/10-Komplexes mit Tim22. Durch einen weiteren Reinigungsschritt über einen Anionenaustauscher (Resource Q) konnte nach Solubilisation mit DDM unter Hochsalzbedingungen sehr rein His-Tim22, nach Solubilisation mit Digitonin unter Niedrigsalzbedingungen His-Tim22 mit Anteilen von Tim54 und TIM9/10-Komplex gewonnen werden. Somit steht für zukünftige strukturelle und funktionelle Studien zum einen die zentrale Komponente Tim22 des TIM22-Komplexes in einer hochmolekularen Form zum anderen eine gereinigte Fraktion mit teilweise vollständig assembliertem Komplex zur Verfügung.

Diese Anteile assemblierten TIM22-Komplexes reichen möglicherweise für funktionelle Studien aus. Allerdings ist von Nachteil, dass es sich bei diesen Fraktionen um eine gemischte Population aus TIM22-Komplex und nicht assemblierten Tim22 handelt. Bei dem gereinigten His-Tim22 nach Solubilisation mit DDM unter Hochsalzbedingungen liegt eine homogene Tim22-Population vor. Einige Hinweise sprechen dafür, dass Tim22 allein in der Lage ist, die Funktion des membranintegrierten TIM22-Komplexes zu übernehmen. Tim22 ist in *N. crassa* vermutlich die einzige für das Wachstum des Pilzes essentielle Membrankomponente des TIM22-Komplexes. Tim18, welches in *S. cerevisiae* identifiziert worden war, stellt keine essentielle Komponente für das Wachstum der Hefe dar und fehlt in *N. crassa*. Für Tim54 wurde gezeigt, dass auch dieses in *S. cerevisiae* keine essentielle Rolle für die Lebensfähigkeit der Hefe spielt (Kovermann *et al.*, 2002). Darüberhinaus findet man Tim54

nur im Reich der Pilze, Tim18 wurde bisher nur in *S. cerevisiae* identifiziert. Da alle diese Komponenten in höheren Organismen wie *C. elegans* oder dem Menschen fehlen, kann man annehmen, dass Tim22 die wesentliche Komponente des TIM22-Komplexes für die Membraninsertion von Substraten ist. Tim9 und Tim10 sind essentiell für den TIM22-Translokationsweg und werden für den Transport und Transfer von Substraten auf Tim22 benötigt (Endres *et al.*, 1999; Leuenberger *et al.*, 1999). Der TIM9/10-Komplex wurde in unserem Institut gereinigt. Somit stehen alle essentiellen Komponenten des Tim22-Translokationsweges zur Verfügung. Für funktionelle Studien des Imports nach Rekonstitution in Lipidvesikel kann der gereinigte TIM9/10-Komplex zu hochreinem Tim22 zugegeben werden. Für folgende Importstudien besteht die Möglichkeit Tim23 als Substrat zu verwenden. Tim23 kann in Mitoplasten über den TIM22-Komplex in die innere Membran inseriert werden und ist somit unabhängig von löslichen Komponenten des Intermembranraums (Paschen *et al.*, 2000).

#### 5.2.4 Rekonstitution des TIM22-Komplexes in Lipidvesikel

Um *in vitro* die Funktion des TIM22-Komplexes zu untersuchen, muss er in Lipidvesikel rekonstituiert werden. Für die Rekonstitution wurde das hochreine Tim22 in DDM bzw. His-Tim22 mit Anteilen des intakten TIM22-Komplexes in Digitonin verwendet. Die Rekonstitution erfolgte in Lipidvesikel, die man aus Phosphatidsäure und Phosphatidylcholin hergestellt hatte. Diese Lipidvesikel wurden mit geringen Mengen Detergens und gereinigten Tim22-Fractionen versetzt. Durch Entziehen des Detergens mit *BioBeads* inserierte Tim22 in die Lipidvesikel. Die Insertion wurde durch Flotieren des Tim22-Proteins mit den Lipidvesikeln und Proteinase-K Verdau der Vesikel getestet. Letzteres ermöglichte zusätzlich eine Aussage über die Orientierung des inserierten Tim22 in die Lipidvesikel. Tim22 wurde erfolgreich in Lipidvesikel integriert; etwa 50% des rekonstituierten Tim22 lag in den Lipidvesikeln in der richtigen Orientierung inseriert vor. Die erfolgreiche Rekonstitution wurde durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Rekonstitution erwies sich als effektiver bei der Verwendung von Digitonin an Stelle von DDM zur Solubilisation der Lipidvesikel, sowie bei Einsatz von gereinigtem Tim22 aus Digitonin solubilisierten Mitochondrien. Die Gefrierbruch-EM Bilder zeigten die relativ homogene Verteilung von Partikeln über die Liposomen. Allerdings lässt sich mittels dieser Technik keine Aussage über die Partikelgröße treffen (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987). Da die Färbung mit Platin-Carbon durchgeführt wurde, kommt es zu einem *shadowing* der inserierten Proteinpartikel, sodass die

Aufnahmen nicht die exakte Partikelgröße widerspiegeln. Neben relativ großen wurden auch kleine Partikel beobachtet. Dies könnte auf das verschiedene *shadowing* in verschiedener Orientierung inserierter Partikel zurückzuführen sein. Unabhängig von der Größe wurden etwa 200 bis 250 Partikel pro Lipidvesikel beobachtet. Da davon etwa 50% in der richtigen Orientierung vorlagen, entspräche dies etwa 100 funktionellen Partikeln pro Vesikel.

Damit wurden gute Voraussetzungen für funktionelle Studien geschaffen. Die Etablierung der Reinigung und die erfolgreiche Rekonstitution in Lipidvesikel sind Voraussetzung für die elektronenmikroskopische Untersuchung des isolierten Komplexes, elektrophysiologische Messungen mit isoliertem TIM22-Komplex und gereinigtem Tim22, sowie funktionelle Untersuchungen der Insertion von Substraten des TIM22-Komplexes in Lipidvesikel. Da die Insertion von Substraten des TIM22-Komplexes in die innere mitochondriale Membran von Membranpotential abhängig ist, muss ein Membranpotential in den Lipid-Protein-Vesikeln nach Rekonstitution von Tim22 erzeugt werden. Dies gelang bereits mit Hilfe eines Kaliumdiffusionsgradienten und legt die Grundlage für Importstudien von Substraten des TIM22-Komplexes in diesem definierten System.

Während diese Arbeit entstand, ist es gelungen, ScTim22 in *E. coli* zu exprimieren, unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen und rückzufalten (Kovermann *et al.*, 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen mit diesem Material zeigten, dass Tim22 alleine in der Lage ist eine Pore zu bilden. Diese wird sowohl spannungsabhängig, als auch von internen Signalsequenzen reguliert (Kovermann *et al.*, 2002).

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen des gereinigten, nativen TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae*, scheint dieser einen Komplex von etwa 300 kDa zu bilden (Rehling *et al.*, 2004; Rehling *et al.*, 2003a). Der native TIM22-Komplex weist zwei Poren auf. Elektrophysiologische Messungen zeigten, dass diese Poren in Anwesenheit eines Peptids mit einer internen Signalsequenz der *Carrier*-Familie und angelegtem Membranpotential (ca. 60mV) öffnen. Folgendes dreistufige Modell für die Insertion von Proteinen der *Carrier*-Familie über den TIM22-Komplex wurde vorgeschlagen: Proteine der *Carrier*-Familie binden membranpotentialunabhängig an den TIM9/10/12-Subkomplex des TIM22-Komplexes. Bei niedrigem Membranpotential ( $\sim 60$  mV) kann eine Schleifenstruktur aus zwei  $\alpha$ -Helices in eine der Poren inserieren, wird jedoch noch nicht in die Membran inseriert. Bei hohem Membranpotential wird die Insertion dieser Schleifenstruktur durch laterales Öffnen ermöglicht. Die Pore, die eine Schleife in die Membran inseriert hat, wird verschlossen, während sich die zweite Pore öffnet und die Aufnahme einer weiteren Schleifenstruktur aus zwei  $\alpha$ -Helices ermöglicht.



Das beschriebene Modell basiert abgesehen von den Ergebnissen zur Komplexstruktur und den Kanaleigenschaften auf *in organello* gewonnenen Daten. Die Rekonstitution des nativen TIM22-Komplexes aus *N. crassa* in Lipidvesikel ermöglicht es, die Funktion des isolierten Komplexes zu untersuchen. Eine zukünftige Aufgabe wird darin bestehen, durch dieses definierte System eingehende Erkenntnisse über die Funktion des TIM22-Komplexes und der Membraninsertion von Proteinen der mitochondrialen *Carrier*-Familie in die innere Membran zu gewinnen.

## 5.3 Das Kochaperon Tim16 des mitochondrialen Importmotors

### 5.3.1 Identifizierung von Tim16 in *S. cerevisiae*

Es war ein Ziel dieser Arbeit bisher unbekannte Komponenten der mitochondrialen Translokationsmaschinerien zu identifizieren. Die Kombination eines biochemischen und bioinformatischen Ansatzes führte zur Identifizierung von Tim14 in *S. cerevisiae* (Mokranjac *et al.*, 2003b). Bereits in früheren Quervernetzungsversuchen war gezeigt worden, dass eine Komponente mit einem Molekulargewicht von 14-20 kDa mit Tim44 interagiert (Moro *et al.*, 1999). Durch die Datenbanksuche nach einem für das Wachstum essentiellen Protein dieses Molekulargewichts mit mitochondrialer Sortierungsinformation wurde Tim14 als Kandidatenprotein identifiziert. Die Quervernetzungsversuche ließen auf die Beteiligung mindestens einer weiteren Komponente schließen, die mit Tim44 interagiert (Mokranjac *et al.*, 2003b). Diese Komponente hatte voraussichtlich eine Größe von etwa 15-20 kDa. Durch Koreinigung mit Tim14 und massenspektrometrischer Untersuchung wurde dieses Protein identifiziert. Aufgrund seines Molekulargewichts von 16 kDa wurde dieses Protein gemäß der Nomenklatur für die mitochondrialen Translokasen als Tim16 bezeichnet (Pfanner *et al.*, 1996). In einer zeitgleichen Studie wurde dieselbe Komponente identifiziert und Pam16 (presequence associated import motor) benannt (Frazier *et al.*, 2004). Tim16 bildet mit Tim14 einen stabilen Subkomplex, wie sowohl durch Koreinigung als auch durch Koimmunoprecipitation und in Quervernetzungsexperimenten gezeigt wurde. Man findet Tim16 in der mitochondrialen Matrix assoziiert mit der inneren mitochondrialen Membran. Es stellt jedoch kein integrales Membranprotein dar, wie es für Tim14 der Fall ist. Die stabile Assoziation mit der inneren Membran könnte entweder durch die Interaktion des hydrophoben aminoterminalen Bereichs von Tim16 mit der Lipidmembran oder über

hydrophobe Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen, wie Tim14, vermittelt sein.

### **5.3.2 Tim16 ist eine essentielle Komponente der Importmotor-abhängigen-Translokation für Vorstufenproteine**

Bei Tim16 handelt es sich um ein für das Wachstum der Hefe essentielles Protein. Dies konnte sowohl durch Disruptionsversuche als auch durch Depletion von Tim16 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors gezeigt werden. Alle bisher bekannten essentiellen Proteine der Mitochondrien sind entweder an der Synthese von Fe/S-Clustern beteiligt, stellen Chaperone dar oder sind Komponenten der Proteintranslokasen (Lill *et al.*, 2000). Für Tim16 konnte eine Beteiligung am Proteinimport aufgrund folgender Kriterien gezeigt werden:

- 1.) *In vivo* konnte man bei Depletion von Tim16 die Anreicherung des Präproteins von Hsp60 nachweisen. Dies wird bei Defekten der Proteintranslokationsmaschinerie beobachtet (Moczko *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1995).
- 2.) Mitochondrien, in welchen Tim16 depletiert war, zeigten Defekte im Import von Proteinen, die unter Verwendung des Importmotors über den TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix importiert werden. Der Import über den TIM22-Komplex oder den TOM-Komplex war nicht betroffen. Die Importstudien haben gezeigt, dass Tim16 eine Rolle in der importmotorabhängigen Translokation von Proteinen spielt. CoxVa wird über einen *Stop-Transfer* Mechanismus während des Imports über den TIM23-Komplex in die innere mitochondriale Membran inseriert. Nach Depletion von Tim16 wird dieses Substrat deutlich ineffektiver importiert. CoxVa $\Delta$ (26-89), ein Konstrukt ohne den Matrixteil des Proteins, wird über den TIM23-Komplex unabhängig vom Importmotor in die innere mitochondriale Membran inseriert. Dieses Substrat ist bei Depletion von Tim16 nicht betroffen. Somit spielt Tim16 eine Rolle im mitochondrialen Importmotor.
- 3.) Arretierte man ein radioaktiv markiertes Vorstufenprotein während des Imports über den TIM23-Komplex, so konnte man durch Quervernetzung und Immunpräzipitation die räumliche Nähe von Tim16 zu translozierenden Polypeptidketten zeigen.

### 5.3.3 Tim16 ist eine Komponente des mitochondrialen Importmotors des TIM23-Komplexes

Da Tim16 eine Rolle im Importmotor spielt, stellte sich die Frage, ob Tim16 eine neue Komponente der TIM23-Translokase ist. Die Interaktion von Tim16 mit den Komponenten des TIM23-Komplexes konnte in der Tat durch Koimmunpräzipitationsexperimente gezeigt werden. Die Interaktion des TIM14/16-Subkomplexes mit dem TIM17/23-Subkomplex wird über Tim44 vermittelt. In Abwesenheit von Tim44 sind der TIM14/16-Subkomplex als auch der TIM17/23-Subkomplex stabil; allerdings können die beiden Subkomplexe nicht mehr zusammen immunpräzipitiert werden.

Durch Quervernetzungsversuche und Immunpräzipitationen wurde die Interaktion von Tim16 mit den Komponenten des Importmotors nachgewiesen. Tim16 wurde sowohl mit Tim14 als auch mit Tim44 und Hsp70 kovalent vernetzt. Dabei ist die Interaktion mit Komponenten des Importmotors ATP-abhängig. Quervernetzungsprodukte zu mtHsp70 wurden bei Depletion von ATP deutlich schwächer nachgewiesen, hingegen erschien die Interaktion mit Tim44 etwas stärker. Dies spiegelt die Dynamik des mitochondrialen Importmotors wieder. Tim16 scheint stärker an mtHsp70 in der ATP-Form zu binden, welches am Importkanal mit Tim44 interagiert.

Für Tim44 wurde gezeigt, dass es im Importmotor als Dimer vorliegt (Moro *et al.*, 1999). Dasselbe gilt für die porenbildende Komponente Tim23 (Bauer *et al.*, 1996). Somit besitzt der TIM23-Komplex einen dimeren Aufbau. Es stellt sich die Frage, ob Tim14 und Tim16 einen heterotetrameren Komplex aus zwei Tim14- und zwei Tim16-Proteinen ausbilden oder aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit einen heterodimeren Komplex aus einem Tim14 und einem Tim16 formieren. Durch Immunpräzipitationen mit Tim16 Antikörpern nach Quervernetzung benachbarter Proteine in Mitochondrien, wurde ein Quervernetzungsprodukt zwischen Tim14 und Tim16 nachgewiesen. Daneben detektierte man ein kleineres Quervernetzungsprodukt, das aus zwei Molekülen Tim16 aufgebaut sein könnte. Für die weitere Charakterisierung dieser Quervernetzungsprodukte waren die Stämme sehr hilfreich, in welchen Tim16 bzw. Tim14 depletiert werden konnten. Das Quervernetzungsprodukt, das einem Tim16-Dimer entsprechen könnte, war deutlich stärker nachzuweisen, wenn Tim14 depletiert war. Ein entsprechendes Quervernetzungsprodukt, das zwei Moleküle Tim14 darstellen könnte, wurde detektiert, wenn Tim16 depletiert wurde. Möglicherweise führt das Fehlen des Komplexpartners im verbleibenden Molekül zu einer Konformationsänderung, das die Quervernetzung der homodimeren Strukturen begünstigt. Zukünftige Experimente sollen

klären, ob der Tim14/Tim16-Subkomplex aus je einem Molekül Tim14 und Tim16 besteht, oder ob sie einen heterotetrameren Komplex bilden. Ein oligomerer Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa, der sowohl Tim14 als auch Tim16 beinhaltet, wurde bereits durch Nativgelelektrophorese nachgewiesen (Frazier *et al.*, 2004).

Der Stamm, in dem Tim16 selektiv depletiert werden konnte, lieferte für die Untersuchung der Funktion des Tim16 im Importmotor wichtige Ergebnisse. Die Depletion von Tim16 führte zu starken Veränderungen in der Organisation der Motorkomponenten. Man verliert in diesem Falle nicht nur die Interaktion von Tim16 und Tim44, sondern auch die Interaktion von Tim14 zu Tim44. Tim16 wird für die Interaktion von Tim14 und Tim44 benötigt. In Abwesenheit von Tim16 wurden zusätzlich Quervernetzungsprodukte beobachtet, die aufgrund der Größe und Nachweisbarkeit mit den entsprechenden Antikörpern wahrscheinlich Dimere von Tim14 bzw. Tim44 darstellen. Dies zeigt eine veränderte Struktur des Importmotors in Abwesenheit von Tim16.

Die Interaktion von Tim44 zu mtHsp70 wird durch die Depletion von Tim16 nicht gestört. Allerdings wurde diese Interaktion bei der Verwendung von temperatursensitiven Mutanten von Tim16 nicht beobachtet (Frazier *et al.*, 2004). Möglicherweise ist Tim16 bei nicht permissiver Temperatur für diese Interaktion nicht nötig, die temperatursensitive Mutante unterbricht jedoch den Zyklus des Importmotors an einer Stelle, an welcher Tim44 und mtHsp70 nicht miteinander interagieren.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass Tim16 eine essentielle Rolle für die Integrität des Importmotors spielt. Ob es weitere Funktionen im Importmotor übernimmt, bleibt zu untersuchen.

### **5.3.5 Der mitochondriale Importmotor weist mit Tim44 und Tim16 zusätzliche Komponenten gegenüber dem bakteriellen DnaK/DnaJ/GrpE-System auf**

Der Importmotor in Mitochondrien von *S. cerevisiae* ähnelt sehr dem bakteriellen DnaK/DnaJ/GrpE-System. DnaK ist das Homolog des mitochondrialen Hsp70, DnaJ ist homolog zu dem kürzlich identifizierten Tim14 und GrpE zu dem mitochondrialen Nukleotidaustauschfaktor Mge1. Das bakterielle Hsp70-Homolog DnaK spielt als molekulares Chaperon bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle (Walter *et al.*, 2002). Dazu gehören beispielsweise die Proteinfaltung und der Abbau nicht stabiler Proteine. Die Funktionsweise beruht auf der Bindung kurzer hydrophober Segmente partiell gefalteter Polypeptide. Dadurch wird die Aggregation verhindert und der Faltungsprozess reguliert. Die

Partnerproteine DnaJ und GrpE haben eine regulatorische Funktion auf DnaK (Liberek *et al.*, 1991; Schönfeld *et al.*, 1995; Wall *et al.*, 1994; Zylicz *et al.*, 1987). DnaJ ist in der Lage die ATPase-Aktivität von DnaK zu stimulieren, GrpE verringert die Affinität von DnaK für Nukleotide. Interessanterweise besitzt der mitochondriale Importmotor im Vergleich zum DnaK/DnaJ/GrpE-System in Bakterien zusätzlich die Komponenten Tim44 und Tim16. Tim44 hat dabei wahrscheinlich die Aufgabe mtHsp70 aus der Matrix an den TIM23-Komplex zu rekrutieren. Eine der Aufgaben von Tim16 ist es, Tim14 an den TIM23-Komplex zu binden.

Strukturvorhersagen für Tim16 zeigen eine erstaunliche Ähnlichkeit zum kurz zuvor identifizierten Tim14. So besitzt Tim16 auf der Ebene der Aminosäuresequenz zwar nur eine geringe Homologie zu Tim14, allerdings ähneln sich beide Proteine bezüglich ihrer vorhergesagten Struktur sehr stark. Tim14 zählt demnach zu den J-Proteinen und besitzt deren charakteristische Struktur, die aus drei  $\alpha$ -Helices gebildet wird, und ein HPD-Motiv, das man bei allen J-Proteinen findet. Das J-Protein Tim14 stimuliert die ATPase-Aktivität von mitochondrialem Hsp70 (D'Silva *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2003b; Truscott *et al.*, 2003). Auch für Tim16 ist die charakteristische Struktur der J-Proteine mit drei  $\alpha$ -Helices vorhergesagt. Allerdings besitzt es nicht das HPD-Motiv. Die Stimulation der ATPase-Aktivität von mtHsp70 war selbst dann nicht möglich, wenn ein HPD-Motiv in Tim16 an der analogen Position zu Tim14 eingeführt wurde (Martin Sichtung, nicht publiziert) (Li *et al.*, 2004). Möglicherweise bindet Tim16 nicht in gleicher Weise an mtHsp70 wie Tim14, so dass es trotz des HPD-Motivs nicht stimulierend auf mtHsp70 wirkt. Es wäre auch denkbar, dass das eingeführte HPD-Motiv in Tim16 nicht so integriert ist, dass es zu einem funktionellen J-Protein führt. Zusammenfassend kann man Tim16 als ein J-ähnliches Protein bezeichnen. Tim16 ist im Gegensatz zu Tim14 nicht in der Lage, die ATPase-Aktivität von mtHsp70 zu stimulieren (Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

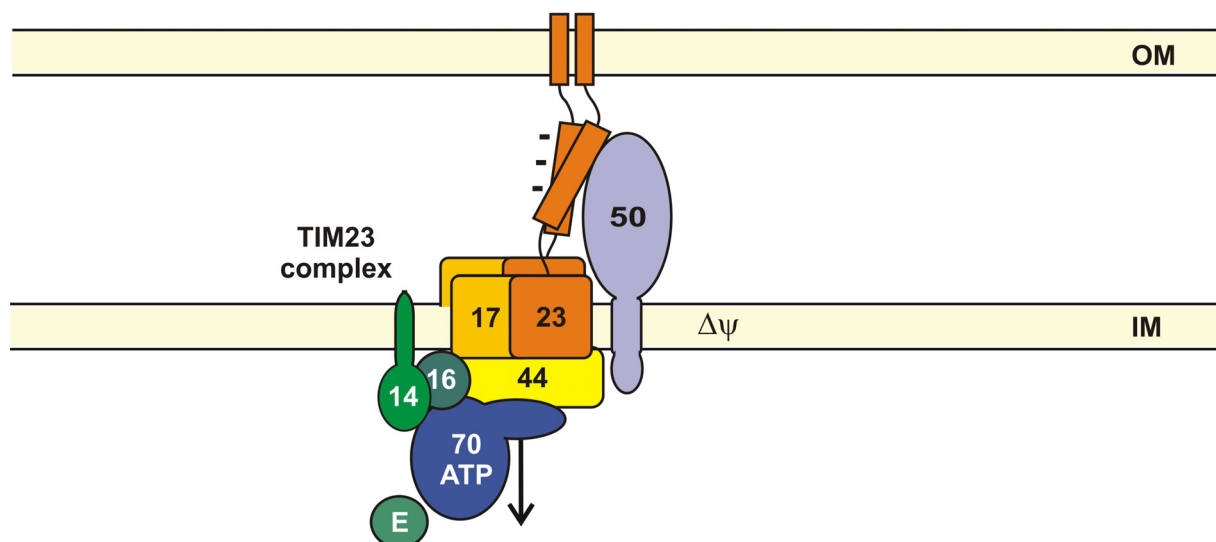
Die Ähnlichkeit von Tim16 zu J-Proteinen, insbesondere zu Tim14, könnte neben seiner strukturellen Bedeutung für den Importmotor auch für eine regulatorische Rolle im Importprozeß sprechen. Dabei sind zwei Modelle für seine Funktion denkbar.

Es besteht die Möglichkeit, dass Tim16 in ähnlicher Weise mit mtHsp70 interagiert wie Tim14. Auf diese Weise könnte Tim16 die Stimulierung der ATPase Aktivität von mtHsp70 durch Tim14 unterbinden, wenn kein Präprotein transloziert werden soll.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass Tim16 eine inhibitorische Funktion auf Tim14 durch die spezifische Interaktion mit Tim14 ausüben kann. Möglicherweise induziert Tim16 eine Konformationsänderung in Tim14, wenn kein Präprotein transloziert werden soll. Tim14

kann dann nicht die ATPase-Aktivität von mtHsp70 stimulieren. Bei Anwesenheit von Präprotein kommt es zu einer Konformationsänderung in Tim14 und zur Stimulation von mtHsp70. Tatsächlich gibt es erste Hinweise, dass Tim16 in der Lage ist, antagonistisch auf die ATPase-Aktivität von Tim14 zu wirken (Li *et al.*, 2004). Diese antagonistische Funktion wurde spezifisch für Tim14, nicht jedoch für andere Kochaperone der J-Familie von mtHsp70 gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Importmotor in Mitochondrien somit ein deutlich komplexeres System als das bakterielle DnaK/DnaJ/GrpE-System darstellt. Es wird eine der zukünftigen Aufgaben sein, das Wechselspiel der Komponenten und den Ablauf der Vorgänge im ATP-getriebenen Zyklus des mitochondrialen Importmotors aufzuklären.



**Abb. 37: Der TIM23-Komplex in *S. cerevisiae***

Der TIM23-Komplex besteht aus den integralen Membrankomponenten Tim14, Tim17, Tim23 und Tim50. Tim23 stellt die porenbildende Komponente dar. Tim23 durchspannt sowohl die Außen- und die Innenmembran. Tim50 ist vermutlich am Transfer von Präproteinen vom TOM-Komplex zur TIM23-Translokase beteiligt. Die Funktion von Tim17 ist bisher ungeklärt. Tim14 ist die einzige membranintegrale Komponente des Importmotors der TIM23-Translokase. Der Importmotor besteht aus den Komponenten Tim14, Tim16, Tim44, mtHsp70 und Mge1 (E). Tim44 rekrutiert mtHsp70 zur Importpore. Tim16 bildet einen Subkomplex mit Tim14. Tim14 stimuliert die ATPase-Aktivität von mtHsp70. Mge1 stellt den Nukleotidaustauschfaktor des mtHsp70 dar.

## **6. Zusammenfassung**

Die Innenmembran von Mitochondrien besitzt zwei Translokasen für den Import von Proteinen. Der TIM23-Komplex vermittelt die Translokation über und in die Innenmembran, der TIM22-Komplex inseriert Proteine mit mehreren hydrophoben Segmenten in die Innenmembran. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Komponenten dieser Translokationsmaschinerien in *N. crassa* und *S. cerevisiae* identifiziert und charakterisiert werden.

In *N. crassa* waren zu Beginn der Arbeit im Vergleich zu *S. cerevisiae* nur wenige Komponenten der TIM-Translokasen bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine Tim22, Tim54 und Tim44 in *N. crassa* identifiziert. Dies wurde entweder durch die Verwendung degenerierter Primer in PCR-Reaktionen mit cDNA aus *N. crassa* oder durch Durchmustern von Datenbanken erreicht. Die identifizierten Proteine des TIM22-Komplexes wurden bezüglich ihrer Lokalisation und Topologie untersucht. Es handelt sich bei Tim22 um ein Membranprotein der inneren mitochondrialen Membran mit vier Transmembranhelices, das sowohl den N- als auch den C-Terminus in den Intermembranraum exponiert. Tim54 ist ebenso in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und besitzt nur eine Transmembranhelix. Der größte Teil des Proteins liegt im Intermembranraum, nur wenige Aminosäurereste befinden sich in der mitochondrialen Matrix. Ferner wurde der TIM22-Komplex von *N. crassa* charakterisiert. Dazu zählten die Untersuchungen der beteiligten Komponenten, der Komplexgröße und der Stabilität des Komplexes. In *N. crassa* besteht der TIM22-Komplex aus den Komponenten Tim22, Tim54, Tim9 und Tim10, die einen etwa 350 kDa großen Komplex bilden. Für spätere funktionelle Untersuchungen wurde der TIM22-Komplex bzw. Tim22 alleine gereinigt. Beides wurde in Lipidvesikel rekonstituiert. Dieses Verfahren bietet die Grundlage für Untersuchungen in einem definierten experimentellen System, wie Proteine der *Carrier*-Familie in Lipidmembranen inseriert werden.

In *S. cerevisiae* wurde mit Tim16 eine neue Komponente des mitochondrialen Importmotors des TIM23-Komplexes identifiziert. Dies konnte durch Koreinigung mit einer weiteren Komponente des Importmotors, Tim14, erreicht werden. Die strukturelle Vorhersage für Tim16 ähnelt stark der des J-Proteins Tim14. Tim16 fehlt allerdings das für die Funktion von J-Proteinen essentielle HPD-Motiv. Tim16 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und peripher mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert. Durch Depletion von Tim16 wird der Import von Substraten in Mitochondrien beeinträchtigt, die vom mitochondrialen Importmotor abhängig sind. Durch Koimmunopräzipitationen und

Quervernetzungsexperimente wurde Tim16 als neue Komponente des mitochondrialen Importmotors der TIM23-Translokase definiert. Funktionell spielt Tim16 eine große Rolle für die Integrität des Importmotors. Die genaue Struktur des Importmotors, seine Regulation und dessen Dynamik im Zuge der Translokation von Präproteinen muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.



## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Mishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. and 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.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1995) The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 6196-6205.
- Allen, S., Lu, H., Thornton, D. and Tokatlidis, K. (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem*, **278**, 38505-38513.
- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S. and Dujardin, G. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett*, **382**, 111-115.
- Arnold, I., Fölsch, H., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome c1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1469-1476.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. and Schatz, G. (1990) A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature*, **348**, 605-609.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol*, **10**, 25-31.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, **87**, 33-41.

- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. and Brunner, M. (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81**, 1085-1093.
- Binder, J., Hofmann, S., Kreisel, S., Wohrle, J.C., Bazner, H., Krauss, J.K., Hennerici, M.G. and Bauer, M.F. (2003) Clinical and molecular findings in a patient with a novel mutation in the deafness-dystonia peptide (DDP1) gene. *Brain*, **126**, 1814-1820.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blom, J., Dekker, P.J. and Meijer, M. (1995) Functional and physical interactions of components of the yeast mitochondrial inner-membrane import machinery (MIM). *Eur J Biochem*, **232**, 309-314.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bomer, U., Pfanner, N. and Dietmeier, K. (1996) Identification of a third yeast mitochondrial Tom protein with tetratricopeptide repeats. *FEBS Lett*, **382**, 153-158.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1994) OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol*, **239**, 201-212.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1997) The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1043-1045.
- Brix, J., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem*, **272**, 20730-20735.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. and 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.
- Cao, W. and Douglas, M.G. (1995) Biogenesis of ISP6, a small carboxyl-terminal anchored protein of the receptor complex of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **270**, 5674-5679.

- Caplan, A.J. and Douglas, M.G. (1991) Characterisation of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J. Cell. Biol.*, **114**, 609-621.
- Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **138**, 179-207.
- Chauwin, J.F., Oster, G. and Glick, B.S. (1998) Strong precursor-pore interactions constrain models for mitochondrial protein import. *Biophys J*, **74**, 1732-1743.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Schmidt, E. and Koehler, C.M. (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol*, **158**, 1017-1027.
- Davis, A.J., Sepuri, N.B., Holder, J., Johnson, A.E. and Jensen, R.E. (2000) Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol*, **150**, 1271-1282.
- Davis, R.H. and De Serres, F.J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.*, **17**.
- Dekker, P.J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett*, **330**, 66-70.
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J. and Pfanner, N. (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *Embo J*, **16**, 5408-5419.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 6515-6524.
- Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W. and Rapaport, D. (2001) Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, **276**, 17679-17685.
- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. and Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*, **388**, 195-200.

- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- D'Silva, P.D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. and Craig, E.A. (2003) J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13839-13844.
- Ebbole, D.J. and Sachs, M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidiation. *Fung. Genet. Newsl.*, **37**, 17-18.
- Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol*, **122**, 1003-1012.
- Endres, M., Neupert, W. and 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.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. and Muller, G.A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal Biochem*, **210**, 235-244.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J*, **15**, 479-487.
- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Bilanchone, V., Cumsky, M.G., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 226-233.
- Frey, T.G. and Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 319-324.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982a) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to ER. *J. Cell Biol.*, **93**, 97-102.
- Gärtner, F., Voos, W., Querol, A., Miller, B.R., Craig, E.A., Cumsky, M.G. and Pfanner, N. (1995) Mitochondrial Import of Subunit Va of Cytochrome c Oxidase Characterized with Yeast Mutants. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3788-3795.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.

- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1425.
- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, **80**, 11-14.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R.L. and Schatz, G. (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69**, 809-822.
- Glick, B.S., Wachter, C., Reid, G.A. and Schatz, G. (1993) Import of cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space: the tightly folded heme-binding domain makes import dependent upon matrix ATP. *Protein Sci*, **2**, 1901-1917.
- Gruhler, A., Ono, H., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1995) A novel intermediate on the import pathway of cytochrome b2 into mitochondria: evidence for conservative sorting. *Embo J*, **14**, 1349-1359.
- Gulik-Krzywicki, T., Seigneuret, M. and Rigaud, J.L. (1987) Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study. *J Biol Chem*, **262**, 15580-15588.
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K. and Omura, T. (1993) A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J*, **12**, 1579-1586.
- Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T. and Mihara, K. (1994) MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *Embo J*, **13**, 5146-5154.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995) Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, **376**, 705-709.
- Hamel, P., Lemaire, C., Bonnefoy, N., Brivet-Chevillotte, P. and Dujardin, G. (1998) Mutations in the membrane anchor of yeast cytochrome c1 compensate for the absence of Oxa1p and generate carbonate-extractable forms of cytochrome c1. *Genetics*, **150**, 601-611.
- Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H. and Dujardin, G. (1997) Functional complementation of an oxa1- yeast mutation identifies an Arabidopsis thaliana cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant J*, **12**, 1319-1327.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; NY.

- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B. and Neupert, W. (1987) Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell*, **51**, 1027-1037.
- He, C.H., Masson, J.Y. and Ramotar, D. (1996) Functional mitochondria are essential for *Saccharomyces cerevisiae* cellular resistance to bleomycin. *Curr Genet*, **30**, 279-283.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, **418**, 367-370.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J*, **20**, 1281-1288.
- Herrmann, J.M. and Bonnefoy, N. (2004) Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J Biol Chem*, **279**, 2507-2512.
- Herrmann, J.M., Fölsch, H., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1994) Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In Celis, J.E. (ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, Vol. 1, pp. 538-544.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J*, **16**, 2217-2226.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature*, **395**, 516-521.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J*, **15**, 2125-2137.
- Honlinger, A., Kubrich, M., Moczko, M., Gartner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., Jacquet, M. and et al. (1995) The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 3382-3389.
- Hoogenraad, N.J., Ward, L.A. and Ryan, M.T. (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 97-105.

- Hoppins, S.C. and Nargang, F.E. (2004) The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, **279**, 12396-12405.
- Horst, M., Jenö, P., Kronidou, N.G., Bolliger, L., Oppliger, W., Scherer, P., Manning-Krieg, U., Jascur, T. and Schatz, G. (1993) Protein import into yeast mitochondria: the inner membrane import site protein ISP45 is the MPI1 gene product. *Embo J*, **12**, 3035-3041.
- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. and Sclafani, R.A. (1989) Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene*, **83**, 57-64.
- Hurt, E.C. and van Loon, A.P.G.M. (1986) How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. *Trends Biol. Sci.*, **11**, 204-207.
- Hwang, S., Jascur, T., Vestweber, D., Pon, L. and Schatz, G. (1989) Disrupted yeast mitochondria can import precursor proteins directly through their inner membrane. *J Cell Biol*, **109**, 487-493.
- Jia, L., Dienhart, M., Schrapf, M., McCauley, M., Hell, K. and Stuart, R.A. (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *Embo J*, **22**, 6438-6447.
- Jin, H., Kendall, E., Freeman, T.C., Roberts, R.G. and Vetrie, D.L. (1999) The human family of Deafness/Dystonia peptide (DDP) related mitochondrial import proteins. *Genomics*, **61**, 259-267.
- Kaldi, K. and Neupert, W. (1998) Protein translocation into mitochondria. *Biofactors*, **8**, 221-224.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. and Douglas, M.G. (1993) Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *Embo J*, **12**, 3023-3034.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, **139**, 1663-1675.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B. and Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, **11**, 103-116.

- Kerscher, S.J. (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*, **1459**, 274-283.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Sollner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, **348**, 610-616.
- Koehler, C.M. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. and Schatz, G. (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-2146.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J*, **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000) Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 1187-1193.
- Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. and Hartl, F.U. (1992) Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, **68**, 1163-1175.
- Komiya, T. and Mihara, K. (1996) Protein import into mammalian mitochondria. Characterization of the intermediates along the import pathway of the precursor into the matrix. *J Biol Chem*, **271**, 22105-22110.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. and 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.
- Komiya, T., Rospert, S., Schatz, G. and Mihara, K. (1997) Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *Embo J*, **16**, 4267-4275.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Muller, H., Jensen, R.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial



- protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, **9**, 363-373.
- Kozany, C., Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2004) The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 234-241.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **278**, 48520-48523.
- Kronidou, N.G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. and Horst, M. (1994) Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12818-12822.
- Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M. and Pfanner, N. (1994) The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett.*, **349**, 222-228.
- Kübrich, M., Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. and Hönlinger, A. (1998) The import route of ADP/ATP carrier into mitochondria separates from the general import pathway of cleavable preproteins at the trans side of the outer membrane. *J. Biol. Chem.*, 16374-16381.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998a) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019 issn: 0092-8674.
- Künkele, K.P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F.E., Henry, J.P., Neupert, W., Lill, R. and Thieffry, M. (1998b) The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem*, **273**, 31032-31039.
- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N. and Ryan, M. (1999a) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell*, **10**, 2461-2474.
- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (1999b) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell*, **10**, 2461-2474.
- Kushnirov, V.V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, **16**, 857-860.

- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J-Biochem-Biophys-Methods*, **10**, 203-209 issn: 0165-0022x.
- Lafontaine, D. and Tollervey, D. (1996) One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3469-3472.
- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1999) The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem*, **274**, 20937-20942.
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. and Taylor, J.W. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsl.*, **35**, 23.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J. and Dujardin, G. (2000) Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F0-ATPase subunit accumulation in an oxal1 deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **275**, 23471-23475.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G. and Koehler, C.M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo J*, **18**, 4816-4822.
- Li, Y., Dudek, J., Guiard, B., Pfanner, N., Rehling, P. and Voos, W. (2004) The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria: Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem*.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2874-2878.
- Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 352-356.
- Lister, R., Mowday, B., Whelan, J. and Millar, A.H. (2002) Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria. *Plant J*, **30**, 555-566.
- Lithgow, T., Junne, T., Wachter, C. and Schatz, G. (1994) Yeast mitochondria lacking the two import receptors Mas20p and Mas70p can efficiently and specifically import precursor proteins. *J Biol Chem*, **269**, 15325-15330.
- Lohret, T.A., Jensen, R.E. and Kinnally, K.W. (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.

- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P. and Tokatlidis, K. (2004a) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 18952-18958.
- Lu, H., Golovanov, A.P., Alcock, F., Grossmann, J.G., Allen, S., Lian, L.Y. and Tokatlidis, K. (2004b) The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J Biol Chem*, **279**, 18959-18966.
- Lutz, T., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, **22**, 4400-4408.
- Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. and Meijer, M. (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *Embo J*, **11**, 3619-3628.
- Maarse, A.C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. and Meijer, M. (1994) Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS Lett*, **349**, 215-221.
- Martin, J., Mahlke, K. and Pfanner, N. (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*, **266**, 18051-18057.
- Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995) Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*, **80**, 127-137.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, **21**, 2337-2348.
- Meyer, W., Bomer, U. and Pratje, E. (1997) Mitochondrial inner membrane bound Pet1402 protein is rapidly imported into mitochondria and affects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes. *Biol Chem*, **378**, 1373-1379.
- Milisav, I., Moro, F., Neupert, W. and Brunner, M. (2001) Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 25856-25861.
- Miller, B.R. and Cumsy, M.G. (1991) An unusual mitochondrial import pathway for the precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit Va. *J Cell Biol*, **112**, 833-841.
- Miller, B.R. and Cumsy, M.G. (1993) Intramitochondrial sorting of the precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit Va. *J Cell Biol*, **121**, 1021-1029.

- Moczko, M., Ehmman, B., Gartner, F., Honlinger, A., Schafer, E. and Pfanner, N. (1994) Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem*, **269**, 9045-9051.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (2001) Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Biol*, **8**, 361-370.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W. and Hell, K. (2003a) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 816-825.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2003b) Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 4945-4956.
- Moro, F., Okamoto, K., Donzeau, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of Mthsp70 with Tim44. *J Biol Chem*, **277**, 6874-6880.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J*, **18**, 3667-3675.
- Muto, T., Obita, T., Abe, Y., Shodai, T., Endo, T. and Kohda, D. (2001) NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. *J Mol Biol*, **306**, 137-143.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 555-565.
- Neupert, W., Hartl, F.U., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell*, **63**, 447-450 issn: 0092-8674.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J*, **21**, 3659-3671
- Paschen, S.A. and Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life*, **52**, 101-112.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J*, **19**, 6392-6400.

- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. and Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, **426**, 862-866.
- Pelham, H.R.B. and Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247-256.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K. and Shore, G.C. (1996) Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 51-52.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 339-349.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M. and Neupert, W. (1987a) The carboxyl-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. and Meijer, M. (1995) Protein sorting. Pulling in the proteins. *Curr Biol*, **5**, 132-135.
- Pfanner, N. and Neupert, W. (1987b) Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J Biol Chem*, **262**, 7528-7536.
- Pfanner, N., Tropschug, M. and Neupert, W. (1987c) Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell*, **49**, 815-823.
- Pfanner, N. and Wiedemann, N. (2002) Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 400-411.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. and Schatz, G. (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *Embo J*, **12**, 4115-4123.
- Rassow, J., Guiard, B., Wienhues, U., Herzog, V., Hartl, F.U. and Neupert, W. (1989) Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J Cell Biol*, **109**, 1421-1428.
- Rassow, J., Harmey, M.A., Müller, H.A., Neupert, W. and Tropschug, M. (1990a) Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for the mitochondrial precursor protein of the  $\beta$ -subunit of F1-ATPase from *Neurospora crassa*. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 4922.
- Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990b) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.*, **275**, 190-194.

- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, **127**, 1547-1556.
- Rehling, P., Brandner, K. and Pfanner, N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 519-530.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. and Pfanner, N. (2003a) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, **299**, 1747-1751.
- Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003b) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol*, **326**, 639-657.
- Reichert, A.S. and Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 41-49.
- Rigaud, J.L. and Levy, D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol*, **372**, 65-86.
- Roise, D. and Schatz, G. (1988a) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4509-4511.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., Allison, D.S. and Schatz, G. (1988b) Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J.*, **7**, 649-653.
- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem*, **273**, 8040-8047.
- Rospert, S., Glick, B.S., Jenö, P., Schatz, G., Todd, M.J., Lorimer, G.H. and Viitanen, P.V. (1993a) Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10967-10971.
- Rospert, S., Junne, T., Glick, B.S. and Schatz, G. (1993b) Cloning and disruption of the gene encoding yeast mitochondrial chaperonin 10, the homolog of *E. coli* GroES. *FEBS Lett.*, **335**, 358-360.
- Rothbauer, U., Hofmann, S., Muhlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2001) Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in

- import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 37327-37334.
- Royer, J.C.a.Y., C.T. (1992) Generation of transformable spheroplasts from mycelia, macroconidia, microconidia and germinating ascospores of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Newsl.*, **39**, 76-79.
- Ryan, K.R., Leung, R.S. and Jensen, R.E. (1998) Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol Cell Biol*, **18**, 178-187.
- Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S. and 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**, 529-538.
- Ryan, M.T., Muller, H. and Pfanner, N. (1999) Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **274**, 20619-20627.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, 2nd Edition, C. Nolan, ed.
- Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, **217**, 220-230 issn: 0003-2697.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231 issn: 0003-2697.
- Schatz, G. (1997) Just follow the acid chain [news; comment]. *Nature*, **388**, 121-122 issn: 0028-0836.
- Schleyer, M. and Neupert, W. (1985) Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell*, **43**, 339-350.

- Schleyer, M., Schmidt, B. and Neupert, W. (1982) Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem*, **125**, 109-116.
- Schmitt, M., Neupert, W. and Langer, T. (1995) Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *Embo J*, **14**, 3434-3444.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Schönfeld, H.-J., Schmidt, D., Schröder, H. and Bukau, B. (1995) The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quarternary structures and interactions of DnaK and GrpE components. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2183-2189.
- Schulke, N., Sepuri, N.B., Gordon, D.M., Saxena, S., Dancis, A. and Pain, D. (1999) A multisubunit complex of outer and inner mitochondrial membrane protein translocases stabilized in vivo by translocation intermediates. *J Biol Chem*, **274**, 22847-22854.
- Schwartz, M.P. and Matouschek, A. (1999) The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13086-13090.
- Sebald, W., Neupert, W. and Weiss, H. (1979) Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria. *Methods Enzymol.*, **55**, 144-148.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Simon, S.M. and Blobel, G. (1993) Mechanisms of translocation of proteins across membranes. *Subcell Biochem*, **21**, 1-15.
- Simon, S.M., Peskin, C.S. and Oster, G.F. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3770-3774.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.



- Söllner, T. (1991) Spezifische Erkennung von Vorstufen beim Import von Proteinen in die Mitochondrien: Identifizierung eines Rezeptorkomplexes. München.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.
- Söllner, T., Rassow, J. and Pfanner, N. (1991) Analysis of mitochondrial protein import using translocation intermediates and specific antibodies. *Meth. Cell Biol.*, **34**, 345-358.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtmann, M., Kinsey, J.A. and Selker, E.U. (1989) Use of bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fung. Genet. Newsl.*, **36**, 79-81.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nussberger, S., Neupert, W. and Rapaport, D. (2000) Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *Embo J*, **19**, 4895-4902.
- Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W. and Rapaport, D. (2003) Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol*, **23**, 2239-2250.
- Steger, H.F., Söllner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K.A., Pfaller, R., Trulzsch, K.S., Tropschug, M., Neupert, W. and Pfanner, N. (1990) Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J Cell Biol*, **111**, 2353-2363.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995) Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem*, **270**, 22842-22849.
- Stuart, R. (2002) Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 79-87.
- Sweigard, J., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., Valent, B. (1997) A series of vectors for fungal transformation. *Fung. Genet. Newsl.*, **44**, 52-53.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *Embo J*, **22**, 6448-6457.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 267-271.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of

- the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, **8**, 1074-1082.
- Truscott, K.N. and Pfanner, N. (1999) Import of carrier proteins into mitochondria. *Biol Chem*, **380**, 1151-1156.
- Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N. (2003) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*, **163**, 707-713.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F.E., Go, N.E., Habib, S.J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. and Rapaport, D. (2004) Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol Biol Cell*, **15**, 1445-1458.
- Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene*, **52**, 225-233.
- Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J. and Tokatlidis, K. (2002) Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J Biol Chem*, **277**, 36100-36108.
- Vollmer, S. and Yanofsky, C. (1986) Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4869-4873.
- von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J*, **5**, 1335-1342.
- Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259-265.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1065-1075.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.

- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.*, **13**, 5135-5145.
- Wall, D., Zylicz, M. and Georgopoulos, C. (1994) The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem*, **269**, 5446-5451.
- Walter, S. and Buchner, J. (2002) Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 1098-1113.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo J*, **20**, 951-960.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**, 519-528.
- Young, J.C., Barral, J.M. and Ulrich Hartl, F. (2003a) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci*, **28**, 541-547.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J. and Hartl, F.U. (2003b) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, **112**, 41-50.
- Zinser, E. and Daum, G. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 493-536.
- Zylicz, M., Ang, D. and Georgopoulos, C. (1987) The grpE protein of Escherichia coli. Purification and properties. *J Biol Chem*, **262**, 17437-17442.

**8. Abkürzungen**

[ <sup>35</sup> S]-Methionin	[ <sup>35</sup> S]-markiertes Methionin
Δψ	Membranpotential
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol pro Liter
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
7mGpppG	7-Methyl-Guanosintriphosphat
α	Antikörper
Å	Angström
AAC	ADP/ATP- <i>Carrier</i>
Abb.	Abbildung
An	<i>Aspergillus nidulans</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5' triphosphat
bar <sup>R</sup>	Basta-Resistenz
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
Bmh	<i>Brain modulosignalin</i> Homolog
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Ca	<i>Candida albicans</i>
CCHL	Cytochrom c-Häm-Lyase
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CNBr-aktivierte Sepharose	Cyanogenbromid aktivierte Sepharose
Cox	Cytochrom Oxidase
cpc	<i>cross pathway control</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
Cyt <i>b</i> <sub>2</sub>	Cytochrom <i>b</i> <sub>2</sub>
d	Durchmesser
DDM	Dodecylmaltosid
ddp	<i>deathness-dystonia protein</i>
DFDNB	1,5-difluoro-2,4dinitrobenzene
DHFR	Dihydrofolatreductase
Dig	Digitonin
Dig-11-dUTPs	Digoxygenin markiertes Desoxyuridintriphosphat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat

DSG	Disuccinimidyl-Glutarat
DSS	Disuccinimidyl-Suberat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EM	Elektronenmikroskopie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
Emp	ER Membranprotein
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erp1	Emp24p/Erv25p Related Protein 1
F1 $\beta$	F1-ATPase beta-Untereinheit
<i>Fe/S-Cluster</i>	Eisen/Schwefel- <i>Cluster</i>
FIGS-Agarplatten	Fructose-Glucose-Sorbose Agarplatten
g	Gramm
GA	Glycerinaldehyd
GIP	generelle Importpore
h	Stunde
hDDP1	humanes <i>deathness-dystonia</i> Protein 1
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
Hg	Quecksilber
Hmi1	Helicase der mitochondrialen inneren Membran
HPD-Motiv	Motiv der Aminosäureabfolge Histidin-Prolin-Aspartat
HRP	Meerrettichperoxidase
Hs	<i>Homo sapiens</i>
Hsc	heat shock cognates
Hsp	Hitzeschockprotein
<i>hyg</i>	Hygromycinresistenz
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Membran
imp	<i>inner membrane peptidase</i>
IMS	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union Of Pure And Applied Chemistry
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
MCF	mitochondriale <i>Carrier</i> Familie
MBP	Maltose-Binde-Protein

mg	Milligramm
MgAc <sub>2</sub>	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
MIN-Medium	Minimalmedium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
MPP	Matrixprozessierungspeptidase
mRNA	messenger RNA
MSF	mitochondrial import stimulation factor
mt	mitochondrial
MTS	Mohr-Traeneberg Syndrom
MTX	Methotrexat
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Na-Acetat	Natriumacetat
NADH	Nicotinsäureamid-adeninnucleotid
NADP	Nicotinsäureamid-adeninnucleotid-phosphat
Nc	<i>Neurospora crassa</i>
NET-Puffer	NaCl, EDTA, Tris-Puffer
ng	nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
ORF	open reading frame
Oxa	Cytochrome Oxidase Activity
Pam	<i>Presequence translocase associated motor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmunserum
PK	Proteinase K
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pN	Pikonewton
PTC-Puffer	PEG-Tris-Calciumchlorid Puffer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RNasin	Ribonuclease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ	Resource Q

RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetisches Vollmedium mit Dextrose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer
SEMK	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer mit KCl
SEMP	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer mit PMSF
SGal	Synthetisches Vollmedium mit Galaktose
SHKCl	HEPES-Sorbitol-Puffer + KCl
SH-Puffer	HEPES-Sorbitol-Puffer
SMPT	4-succinimidylloxycarbonyl-a-methyl-a-(2-pyridyldithio)-toluene
SM-Puffer	Saccharose-MOPS-Puffer
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SSC	Natriumcitrat-Natriumchlorid Puffer
STC-Puffer	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid Puffer
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-Buffered-Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TER	Tris-EDTA-RNase Puffer
Tim	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
TIM	Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
Tim	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
TOM	Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
Tom	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TTP	Thymin-5`-triphosphat
Tx-100	TritonX-100
UTP	Uridin-5`triphosphat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches des Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YPD-Medium	Hefeextrakt-Pepton Medium mit Dextrose
YPG-Medium	Hefeextrakt-Pepton Medium mit Glycerol
YP-Medium	Hefeextrakt-Pepton Medium

## Danke !

- Meinen Eltern, die mir es ermöglicht haben, meine Doktorarbeit zu absolvieren, und mir immer eine moralische Stütze geboten haben.
- Professor Neupert, der immer ratend zur Seite stand und durch seine kritischen Fragen immer auf das Wesentliche der Arbeit aufmerksam machen konnte.
- Professor Herrmann, der bereitwillig meine Arbeit vor der Fakultät für Biologie vertreten hat und mir bei der Organisation der Prüfung sehr geholfen hat.
- Kai Hell, der es mir sowohl als Kollege als auch als Gruppenleiter immer für Diskussionen zur Verfügung stand, und es mir ermöglicht hat, auf einem vielversprechenden wissenschaftlichen Projekt zu arbeiten.
- Holger Prokisch, der mich bei den Arbeiten mit *N. crassa* unterwiesen hat, und auch nach seinem Ausscheiden aus unserer Arbeitsgruppe weiterhin Interesse an meiner Arbeit und meinem erfolgreichen Abschließen gezeigt hat.
- Meine Arbeitsgruppe: Alex A., Alex S., Andreja, Annette, Dusan, Heiko, Nadia, Martin, Ulrike und Stefan, die mir immer ein menschliches Umfeld in unserer Arbeitsgruppe geboten haben und stets helfend zur Seite standen.
- Dejana Mokranjac, die mir als Kollegin und Freundin zur gesamten Zeit der Arbeit wertvolle Unterstützung geboten hat. Ich habe sie sowohl menschlich, als auch als exzellente Wissenschaftlerin mit großem Ideenreichtum schätzen gelernt.
- Professor Rigaud und seiner Arbeitsgruppe in Paris, wo ich eine sehr lehrreiche, stimulierende und erfolgreiche Woche verbringen durfte.
- Dr. Mohammed Chamy für das Durchführen der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie.
- Frau Braun, die ich als gute Seele in der Neurosporazucht vermissen werde.
- Kiki, der immer da war, wenn akute Computerprobleme zu lösen waren.
- Frau Farsen, Frau Hauck und Frau Döge, die bei der oft nicht einfachen Überwindung bürokratischer Hindernisse sehr geholfen haben.
- Marica und Zdenka für ihre Hilfe bei der Präparation von Mitochondrien.
- Unserer Werkstatt: Hr. Bender, Hr. Friedt, Hr. Reiser und Hr. Schallweg deren Arbeit in diesem Institut Gold wert ist.
- Frau Köber, Frau Labschansky und Frau Reisenauer, die immer für die Bereitstellung unseres Arbeitsmaterials gesorgt haben und immer gerne für ein auflockerndes Gespräch zur Verfügung standen.
- Nicht zuletzt möchte ich den Freunden danken, die ich in diesem Institut finden durfte: Ana, meiner ersten Kollegin in diesem Institut, die mir trotz nur kurzer gemeinsamer Arbeitszeit nach wie vor als gute Freundin erhalten blieb. Nicole, die stets ein offenes Ohr für kleine und größere Problemchen hatte. Simone, die mich mit gemeinsamen Ausflügen nicht das Leben neben dem Labor vergessen ließ. Florian, mit dem ich so manches Gefecht auf dem Badminton-Court bestreiten durfte und Uwe, der mich stets auf wichtige kulturelle Ereignisse in München aufmerksam machte.



## **Lebenslauf**

04.02.1972	Geboren in München
1978-1982	Grundschule an der Zielstattstrasse München
1982-1991	Thomas-Mann-Gymnasium in München
1991	Abitur
10/1991-02/1998	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
02/1998	Diplom
04/1997-02/1998	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E. Weiss an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema:	Regulation der Expression von HLA-G in Keratinocyten und Synthese einer löslichen HLA-G G3 Isoform
05/1998-12/1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Michael Meisterernst am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 01/1999	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Ehrenwörtliche Versicherung:**

Ich, Christian Kozany, versichere, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

München, den 1.12.04