Aus dem Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer.-nat. W. Neupert

Tim8 und Tim9, neue Komponenten der TIM22 Präproteintranslokase von Mitochondrien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander C. Adam
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer.-nat. W. Neupert
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Ebel
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Noessner
Prof. Dr. A. Konnerth

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 2004

Meinen Eltern
Meinen Großeltern
Meinem Bruder

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Walter Neupert. Seine freundliche Betreuung seit Beginn meiner Forschungsarbeit an ließen mich schnell großes Interesse und Freude in der Wissenschaft finden. Sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, verbunden mit allzeit Bereitschaft zur Diskussion von Ergebnissen und Ideen, trugen wesentlich zu meinem wissenschaftlichem Fortkommen bei.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Michael Brunner, der mein Projekt von Anfang an mit großer Energie und steter Hilfsbereitschaft betreut hat. Von seinen Kenntnissen und seinem Ideenreichtum durfte ich in vieler Hinsicht profitieren.

Bei Dr. Kai Hell, meinem späteren Gruppenleiter, bedanke ich mich sehr für die wertvollen Vorschläge und Diskussionen bei den schriftlichen Versionen meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt Christiane Kotthoff, die mir seit meinen ersten experimentellen Arbeiten jederzeit in einem äußerst angenehmen Arbeitsklima mit Rat und Tat zu Hilfe stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Stefan Paschen, besonders für seine konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft beim Abfassen meiner Arbeit.

Für die Unterstützung während des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit möchte ich mich vor allem bei Maxi Endres und Christian Sirrenberg bedanken, die viel zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den erfindungsreichen Männern unserer Wekstatt: Willi Bender, Peter Reiser und Gerd Fried, ebenso wie Frau Braun, Frau Reisenauer, Frau Köber und Frau Lapschansky die unermüdliche für unsere Versorgung mit frischen Arbeitsmitteln gesorgt haben.

Meinen Eltern gebührt meine größte Dankbarkeit für die stetige Unterstützung in meinem Studium und der Doktorarbeit. Ein großer Verdienst war das Lesen der ersten Rohfassungen meiner Arbeit und damit das Entknoten der „ragged red fibers“ – des verwickelten roten Fadens.

Den vielen Freunden die ich nun nicht alle persönlich nenne, die mir aber auf ihre unterschiedlichsten Weisen sehr viel Motivation geschenkt haben, möchte ich dafür sehr herzlich danken – mit ihnen wird für mich diese Arbeit immer verbunden bleiben.

Nihil est in intellectu quod non antea fuerit in sensu
- John Locke 1632-1704

1 EINLEITUNG 1

1.1 Mitochondriale Erkrankungen 1

1.2 Der mitochondriale Proteinimport 3
1.2.1 Überblick 3
1.2.2 Der TOM-Komplex 5
1.2.3 Import über die mitochondriale Innenmembran 5

1.3 Zielsetzung der Arbeit 7

2 MATERIAL UND METHODEN 9

2.1 Methoden der Molekularbiologie 9
2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNS 9
2.1.2 Aufreinigung von DNS 9
2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E.coli* 11
2.1.4 Enzymatische Behandlung von DNS 12
2.1.5 Methoden mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 13
2.1.6 Transformation von Bakterien und Hefen 14
2.1.7 Disruptionsstrategien 17
2.1.8 Klonierung von pVT51-Tim9 20

2.2 Methoden der Hefegenetik 21
2.2.1 Kultivierung von Hefezellen 21
2.2.2 Sporulation diploider Hefestämme 21
2.2.3 Tetradenanalyse 22
2.2.4 Abschätzung der Zellzahl in Kulturen 22
2.2.5 Bestimmung des mating-types 22

2.3 Methoden der Zellbiologie 22
2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*-Zellen 22
2.3.2 Präparation von ^{35}S-markierten Hefemitochondrien 23
2.3.3 Präparation von Mitoplasten durch osmotische Schwellung 23
2.3.4 Proteasebehandlung von Mitoplasten 24
2.3.5 Gewinnung des Gesamtproteins aus Hefe 24
2.3.6 Herstellung mitochondrialer Detergenzextrakte 24
2.3.7 Carbonatextraktion 25
2.3.8 *In vitro* Proteinimport in isolierte Mitochondrien 25
2.3.9 ATP-Depletion 26
2.3.10 Steigerung des Membranpotentials 27
2.3.11 Depletion des Membranpotentials 27

2.4 Proteinchemische Methoden 27
2.4.1 Proteinsynthetische Methoden 27
2.4.2 Proteinreaktive Methoden 29
2.4.3 Proteinanalytische Methoden 30

2.5 Immunologische Methoden 33
2.5.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren aus Kaninchen 33
2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern 33
2.5.3 Immunfällungen 34
2.5.4 Immuno-Blot-Verfahren 36

2.6 Datenverarbeitungstechnische Methoden 36
2.6.1 Anlegen einer lokalen Genom-Datenbank 36
2.6.2 Entwicklung des Suchprogramms 38
2.6.3 XREF-Datenbank 47

2.7 Materialien 48
2.7.1 Verwendete Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae (Bäckerhefe)* 48
2.7.2 Verwendete Stämme von *E. coli* 49
2.7.3 Medien 49
2.7.4 Puffer 52
2.7.5 Chemikalien und Enzyme 52
2.7.6 Laborgeräte 53

3 ERGEBNISSE 54

3.1 Suche nach neuen Komponenten des Importweges über Tim22 54
3.1.1 Sequenzvergleich und Ermittlung der Suchkriterien 54
3.1.2 Mustersuche im Hefegenom 55
3.1.3 Bewertung und Auswahl der Ergebnisse 56

3.2 Analyse der Gene TIM8 und TIM9 63
3.2.1 Das *TIM8*-Gen ist nicht essentiell für *S.c.* 63
3.2.2 Das *TIM9*-Gen ist essentiell für *S.c.* 64

3.3 Mitochondriale Lokalisation von Tim8 und Tim9 65

3.4 Charakterisierung von Tim9 66
3.4.1 Tim9 interagiert mit Tim10 und Tim12 66
3.4.2 Herstellung spezifischer Antiseren gegen Tim9 67
3.4.3 Auswirkungen der verminderten Tim9-Expression 69
3.4.4 Organisation von Tim9, Tim10, Tim12 74

4 DISKUSSION 79

4.1 Entwicklung des Suchalgorithmus 79

4.2 Die gefundenen offenen Leserahmen kodieren für mitochondriale Proteine 80

4.3 Tim 9 ist eine essentielle, neue Komponente der Tim22-Translokase 80

4.4 Verwandtschaft von Tim9 mit Tim10 und Tim12 81

4.5 Struktur und Stöchiometrie der Tim9-Komplexe 82

4.6 Funktion der Tim9-Komplexe 83
4.6.1 TIM9-10-Komplex 84
4.6.2 TIM9-10-12 Komplex 85

4.7 Weitere kleine Tim-Proteine: Tim8, Tim13 85
4.7.1 Der TIM8-13-Komplex 85
4.7.2 Humane Homologe: Deafness Dystonia Proteine 86

4.8 Ein aktualisiertes Modell des mitochondrialen Proteinimports 88

5 ZUSAMMENFASSUNG 90

6 LITERATUR 91

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
A	Absorptionskoeffizient
A	Ampère
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ci	Curie
cm	Zentimeter
c-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Faraday
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung m/s^2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IM	Innenmembran
IMS	Intermembranraum
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

l	Liter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
m/v	Masse pro Volumen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
N. crassa	*Neurospora crasse*
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran
OPA	Optische Atrophie
o-Phe	o-Phenantrolin
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SC-Medium	Synthetisches Vollmedium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STI	Sojabohnen Trypsin Hemmer
T	Thymin

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3,-propandiol
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Mitochondrien sind einzigartige Zellorganellen im Menschen: Sie besitzen ihr eigenes Genom mit Replikations-, Transkriptions- und Translationsapparat. Vor etwa 1-2 Milliarden Jahren entstanden sie aus Endosymbionten [20, 58, 97, 99, 115, 116], deren Vorläufer als α-Protobakterien in die spätere eukaryontische Zelle einwanderten. Sie ergänzten den Stoffwechsel des Wirtes mit wertvollen Funktionen, die lebensnotwendig für die spätere eukaryontische Zelle wurden. So sind Mitochondrien verantwortlich für die oxidative Phosphorylierung zur Synthese von ATP und für die Biogenese von Fe-S-Clustern der Zelle. In Mitochondrien findet außerdem β-Oxidation der Fettsäuren statt und sie sind am Harnstoffzyklus der Zellen beteiligt. Über die Mitochondrien laufen auch interne Kontrollmechanismen der Zelle, die scheinbar auch den Alterungsprozeß steuern [158] oder bei Funktionsstörungen verschiedenster Art die Apoptose der Zelle initiieren können [36].
Mit dieser evolutionär sehr vorteilhaften Symbiose hat sich die eukaryontische Zelle jedoch auch empfindliche Schwachstellen erkauft. Defekte in der mitochondrialen Funktion sind oft mit dem Leben nicht vereinbar oder führen zu schwerwiegenden Erkrankungen, häufig mit Ausprägung neurodegenerativer oder myopathischer Symptome.

1.1 Mitochondriale Erkrankungen

Erkrankungen, die aufgrund mitochondrialer Defekte entstehen, zeigen Symptome in zahlreichen unterschiedlichen Facetten - ein typisches, pathognomonisches Syndrom ist dabei praktisch nicht auszumachen. So können in vielen Gebieten der Medizin mitochondriale Erkrankungen Ursache für bekannte Symptome sein: z.B. können mitochondriale Störungen neurologische Erkrankungen verursachen wie Epilepsie (zur Übersicht siehe [23, 39, 94]), Blindheit (z.B. MTS [184], LHON [100, 168], OPA [35]), Taubheit und Schwerhörigkeit (z.B. MTS [184]), Dystonie (z.B. bei LHON), Ataxie (bei Friedreichs Ataxie [34]). In der Inneren Medizin können mitochondriale Defekte ganz andere Symptome bedingen: Leberversagen (bei M. Wilson [22, 178]), Diabetes mellitus [114], Fettstoffwechselstörungen [45], Leukopenie und Cardiomyopathie (BARTH-Syndrom [131]), Antiphospholipid-Antikörpersyndrom bei Integritätsverlust der Mitochondrien.
Aufgrund dieser Vielgestaltigkeit der Mitochondriopathien hat es lange gedauert, bis die ersten Hinweise auf eine Beteiligung dieser Organelle am Krankheitsgeschehen erkannt wurden.
Eines der ersten Anzeichen, daß Mitochondrien eine Rolle in der Pathogenese von Krankheiten spielen könnten, wurde vor etwa 40 Jahren von Luft *et al.* [107] bei einem Patienten berichtet. Bei diesem fanden sich in den Skelettmuskelfasern eine große Anzahl abnormal großer Mitochondrien, ein Befund der jetzt als „Mitochondriale Myopathie“ bekannt ist. Seit dieser Zeit wurden über 100 erbliche Erkrankungen Defekten zugeschrieben, in denen menschlichen Gene verändert sind, die für mitochondriale Proteine kodieren [41]. Dabei sind nicht nur die humanen 13 mitochondrial kodierten und maternal vererbten Proteine betroffen (Abbildung 1),

sondern zum größten Teil die etwa 1000 nukleär kodierten Proteine, die autosomal oder X-/Y-chromosomal vererbt werden. Die genetische und molekulare Vielgestaltigkeit dieser Erkrankungen führt zu einem sehr komplexen Vererbungsmuster, das in den letzten Jahrzehnten intensiv zu verstehen versucht wurde [41, 42, 167, 190].

Aber warum sind die mitochondrialen Erkrankungen so vielgestaltig?

Als wichtigster Energielieferant der Zelle sind Mitochondrien für die volle Funktionsfähigkeit der Zelle unabdingbar. Ist die mitochondriale Funktion gestört, kommt es, je nach Energiebedarf der Zelle, zum Ausfall der Zellfunktion oder zum Absterben der Zelle. Symptomatisch wird der Zelluntergang in Geweben nur dann, wenn die Regeneration des entsprechenden Zellverbandes zu gering oder gar nicht möglich ist. So ist z.B. Nervengewebe praktisch nicht regenerationsfähig, weshalb bei fortschreitendem Neuronenuntergang es hier frühzeitig zur Manifestation eines Schadens kommt. Viele Neuropathien haben ihre Ursache im neuronalen Zelltod: Apoplex, ALS, M. Huntington, M. Alzheimer und Parkinson [198]. Der hohe Energiebedarf und die geringe Regenerationsfähigkeit von Nervengewebe könnte auch der Grund sein, weshalb bei mitochondrialen Erkrankungen oft neurologische Syndrome auftreten.

Keine der mitochondrialen Aufgaben kann durch eine andere Organelle ersetzt oder auf andere Weise vollständig kompensiert werden. Fast alle der vielen Aufgaben, die die Mitochondrien in der eukaryontischen Zelle übernehmen, führen im Falle einer Störung zum Defizit an notwendiger mitochondrialer Leistung. Je nach Bedeutung der betroffenen Funktion können Symptome entweder kaum merklich, nur bei vermehrtem Energiebedarf oder schon so gravierend nach Einsetzen der Störung auftreten, daß das Fortbestehen des Organismus unmöglich wird. Dementsprechend ist auch die Ausprägung mitochondrialer Defekte sehr unterschiedlich: Manche beginnen erst im Erwachsenenalter, andere manifestieren sich in der Jugend oder bestehen kongenital. Bei schwere Defekten kann sich der Organismus erst gar nicht entwickeln.

So unterschiedlich die Stoffwechselfunktionen der Mitochondrien auch sind, sie alle besitzen einen gemeinsamen Schritt in ihrem Aufbau: für alle mitochondrialen Funktionen müssen Proteine aus dem Cytosol in die Organelle transportiert werden, um dort dann die Stoffwechselaufgaben zu erfüllen. Dieser Transportvorgang, der mitochondriale Proteinimport, stellt einen empfindlichen Knotenpunkt für beinahe alle Funktionen der Organelle dar. Die Funktion dieses Proteinimports wird im Folgenden vorgestellt.

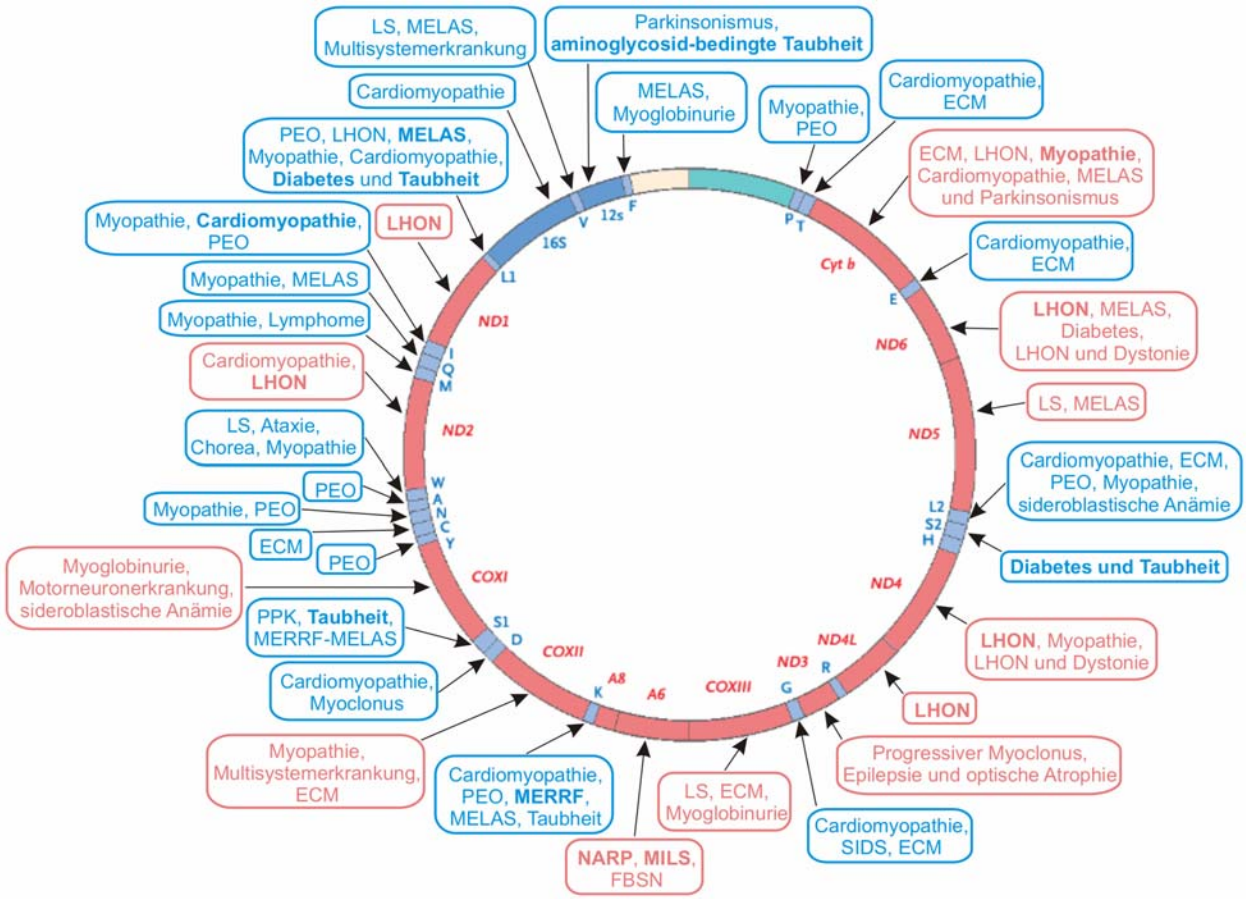


Abb. 1: **Krankheiten die durch Mutationen in der menschlichen mtDNS verursacht sind (aus [40])**
Erkrankungen, die häufig mit Mutationen in einem bestimmten Bereich assoziiert sind, werden in Fettdruck dargestellt. Erkrankungen, die aufgrund Mutationen entstehen welche die mitochondriale Proteinsynthese beeinflussen, sind in blauer Schrift. Mutationen in Protein-kodierenden Bereichen sind in roter Schrift.
ECN: Encephalomyopathie; FBSN: familiäre bilaterale Struatumnekrose; LHON: Leber's hereditary optic neuropathy; LS: Leigh-Syndrom; MELAS: mitochondriale Encephalomyopathie, Lactatacidose und apoplexiforme Episoden; MERRF: Myoklonische Epilepsie mit Ragged-Red-Fibers; MILS: maternal-vererbtes Leigh-Syndrom; NARP: Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa; PEO: Progressive externe Ophthalmoplegie; PPK: Palmo-plantare Keratodermie; SIDS: Syndrom des plötzlichen Kindstods

1.2 Der mitochondriale Proteinimport

1.2.1 Überblick

Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben, der inneren mitochondrialen Membran (inner membrane, IM) und der äußeren mitochondrialen Membran (outer membrane, OM). Die OM ist für kleinere Moleküle bis ca. 2-3 kDa leicht passierbar, da sie Porine, Proteine die eine große Pore (etwa 1.7 nm Durchmesser) ausbilden, enthält. Die IM dagegen ist praktisch nur für O_2, CO_2 und H_2O frei permeabel. Zur Funktion der Mitochondrien ist es aber erforderlich, daß

mitochondriale Proteine, deren Gene während der Evolution in den Zellkern überführt wurden, wieder in die Organelle und damit auch über deren Membranen gelangen können. Für diesen Transport größere Proteine über beide mitochondrialen Membranen entwickelten sich Proteintranslokasen, auch als Translokationskomplexe bezeichnet: in der OM der TOM- (**T**ranslocase of the **O**uter mitochondrial **M**embrane) und TOB-Komplex (**T**ranslocase of the **O**uter mitochondrial Membrane for **B**eta-barrel proteins), und in der IM zwei unterschiedliche TIM-Komplexe (**T**ranslocase of the **I**nner mitochondrial **M**embrane). Diese Komplexe bestehen aus funktionell kooperierenden Untereinheiten. TOB vermittelt die Insertion von Proteinen mit einer bestimmten (*ß-barrel*) Sekundärstruktur [138]. Die Namen der Komplexkomponenten ergeben sich, entsprechend der Konvention zur Namensgebung mitochondrialer Proteine, aufgrund des berechneten Molekulargewichts [140].

Es gibt zwei Quellen für mitochondriale Proteine: Mitochondrien besitzen eigene mtDNS und ein eigenes genetisches System mit speziellem Translationscode für einige Aminosäuren, RNS und Ribosomen. Die Gene der humanen mtDNS kodieren für nur 13 Proteine, zwei rRNS und 22 tRNS. Die Proteine sind Komponenten der Atmungskette in der Innenmembran. Alle anderen Proteine die in den Mitochondrien zu finden sind, etwa 99%, sind im Zellkern codiert und werden an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert.

Die Translokationsprodukte werden als sogenannte mitochondriale Vorstufenproteine bezeichnet, da sie meist erst im Mitochondrium zum reifen Protein umgewandelt werden. Die Vorstufenproteine liegen in der Regel gebunden an Chaperone vor. Zu diesen Chaperonen gehört das Hitzeschockprotein Hsp70 [25, 37], das Ydj-Protein [6, 24] und MFS [122]. Sie halten das transportierte Molekül in einem importkompetenten Zustand, während es zu den Mitochondrien transportiert wird.

Die Vorstufenproteine enthalten eine Signalsequenz (auch als Sortierungssequenz bezeichnet), die deren Erkennung an dem mitochondrialen TOM-Komplex ermöglicht. Proteine, die zum Beispiel in die Mitochondrien-Matrix sortiert werden müssen, besitzen ein sogenanntes Matrixsortierungssignal am N-Terminus. Es enthält einen hohe Anteil an positiv geladenen Aminosäureresten, kaum negative Ladungen und bildet eine amphipathische α-Helix aus [187]. Die weiteren Sortierungssignale für die Außen- und Innenmembran oder den Intermembranraum sind bisher nur wenig charakterisiert. Prinzipiell geht man davon aus, daß diese Proteine eine interne Importkennung (bestimmte Aminosäuresequenz) für die Mitochondrien enthalten.

Die Aufnahme in die Mitochondrien erfolgt hier nach Abschluß der Synthese (posttranslationaler Import). Ein geringerer Teil der kernkodierten mitochondrialen Proteine wird auch direkt an der äußeren Mitochondrienmembran translatiert und noch während der Synthese in die Mitochondrien aufgenommen (cotranslationaler Import, [50]).

1.2.2 Der TOM-Komplex

Der in die mitochondriale Außenmembran integrierte TOM-Komplex [84, 173] besteht in *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.,* Bäckerhefe) und *Neurospora crassa* (*N.c.*, roter Brotschimmel) aus neun Membranproteinen (Übersicht: [130, 136, 146]). Er dient der Erkennung und der anschließenden Translokation mitochondrialer Proteine in den, zwischen OM und IM gelegenen, Intermembranraum (IMS) oder in die OM [91, 103, 119]. Hierbei sind die Untereinheiten Tom20 und Tom22, die auf der cytosolischen (cis-) Seite des Komplexes liegen, Rezeptoren für die Vorstufenproteine. Sie sind insbesondere am Import von Proteinen mit einer N-terminalen Signalsequenz beteiligt [60, 118] (Abbildung 2). Tom70, ein weiterer Rezeptor des TOM-Komplexes, trägt eine Bindungsstelle für hauptsächlich die Proteine, die zur Familie der Transporter (Carrier) gehören [19, 57, 67, 162, 175].
Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 bilden den sogenannten TOM-Kernkomplex [3, 33, 93], in dem Tom40 den proteinleitenden Kanal ausbildet und in direkten Kontakt mit den importierten Proteinen steht [147, 185]. Tom40 ist die einzige essentielle Komponente des TOM-Komplexes [38, 105, 185]. Die Funktion der kleinen TOM-Untereinheiten Tom5, Tom6, Tom7 ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise, daß Tom6 an der Assemblierung des TOM-Komplexes beteiligt ist [4], Tom7 hingegen an dessen Dissoziation [70]. Tim5 übernimmt möglicherweise die Vorstufenproteine von den Rezeptoren und leitet sie in den Kanal weiter [38, 173]. Vorstufenproteine werden ohne Beteiligung weiterer Proteinkomplexe allein durch die Funktion des TOM-Komplexes in die Außenmembran oder den Intermembranraum transportiert [117, 119].

1.2.3 Import über die mitochondriale Innenmembran

In der IM existieren zwei Proteintranslokasen: der TIM23-Komplex und der TIM22-Komplex. Sie übernehmen Vorstufenproteine vom TOM-Komplex und importieren sie weiter in die Innenmembran oder die mitochondriale Matrix. Beide Komplexe kooperieren mit dem TOM-Komplex, unterscheiden sich aber in ihrer Substratspezifität.

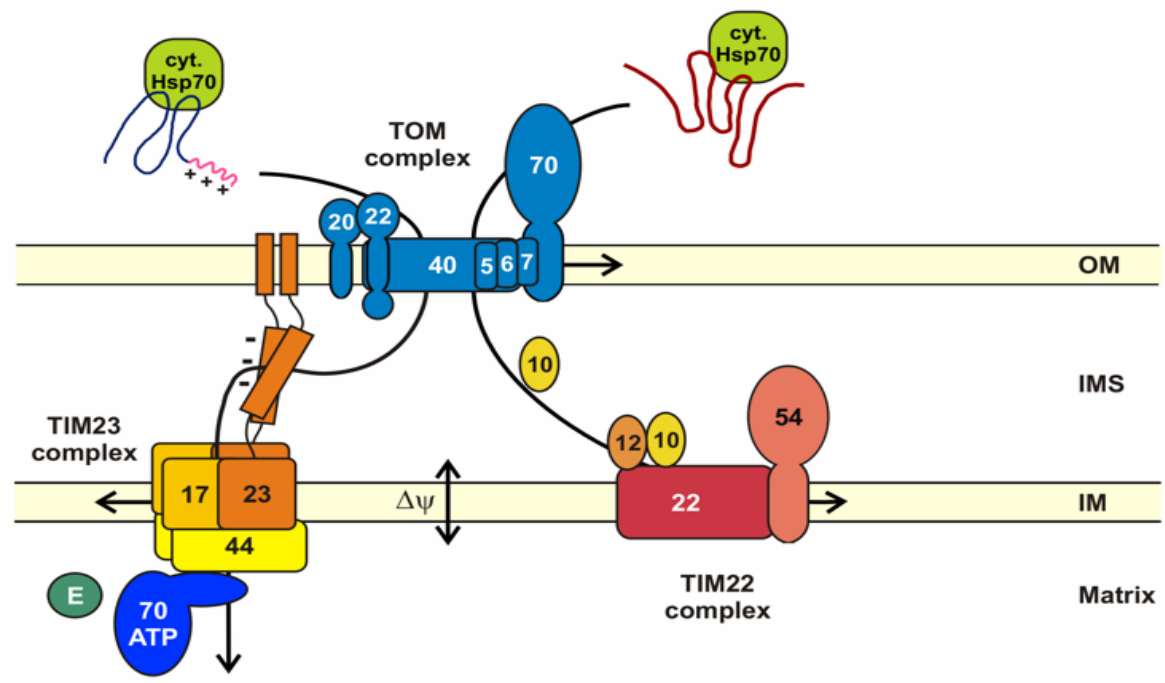


Abb. 2: **Der mitochondriale Proteinimport**
Kernkodierte und cytosolisch synthetisierte Proteine werden durch Chaperone (z.B. Hsp70) stabilisiert und binden an die Rezeptoren des TOM-Komplexes an der äußeren mitochondrialen Membran. Nach diesem gemeinsamen Weg trennen sich die Importwege für zwei Klassen von Proteinen. Diejenigen Proteine mit einer abspaltbaren positiv geladenen Präsequenz werden weiter über den TIM23-Komplex importiert. In der Matrix gelegenes mtHsp70 sorgt dabei für den gerichteten Import unter Spaltung von ATP. Proteine mit einem internen Importsignal werden über den TIM22-Komplex zur Innenmembran transportiert. Im Intermembranraum lokalisierte Chaperone (Tim10, Tim12) vermitteln hierfür die Weiterleitung des Vorstufenproteins an den TIM22-Komplex.

1.2.3.1 TIM23-Komplex

Der TIM23-Komplex ist integraler Bestandteil der IM. Er besteht aus den essentiellen Proteinen Tim23 [32, 46], Tim17 [112, 152], Tim44 [13, 71, 111, 159], mt-Hsp70 und Mge1 [16] (zur Übersicht siehe [21]). Vor kurzem wurden zum Teil bereits länger vermutete [10, 12] weitere essentielle Komponenten des Komplexes gefunden: Tim50 [52, 124, 196], das direkt an der Weitergabe der Vorstufenproteine vom TOM-Komplex an den TIM23-Komplex beteiligt ist, Tim16 [90] und Tim14 [125], die an der Matrixseite des Komplexes mit mtHsp70 und Tim44 interagieren. Tim23 ist mit dem C-Terminus in der IM und mit dem N-Terminus in der OM verankert, durchspannt somit den Intermembranraum [43]. An diesen Stellen wird eine effektives Zusammenwirken des TOM-Komplexes mit dem TIM23-Komplex bei der Proteintranslokation erreicht.

Über den TIM23-Komplex werden Vorstufenproteine importiert, die eine positiv geladene N-terminale Signalsequenz aufweisen. Für den Importvorgang der Vorstufenproteine in die Innenmembran oder die Matrix, durch den wahrscheinlich von mehreren Tim23 und Tim17 gebildeten Kanal, ist ein Membranpotential $\Delta\psi$ zwischen Matrix und Intermembranraum erforderlich [161]. Am matrixseitigen Ausgang dieses Kanals ist Tim44 an den TIM23-

Komplex assoziiert. Tim 44 und Tim14 rekrutieren jeweils ein mitochondriales mtHsp70-Moleküle zum Importkanal [92, 126], wo diese dann unter Hydrolyse von ATP an das Vorstufenprotein binden [163, 164]. Die weitere Translokation des Vorstufenproteins wird durch gerichtete thermische Bewegung des Moleküls in die Matrix fortgesetzt [132]. Dabei verhindert die Bindung des mtHsp70 an die Polypeptidkette das Zurückgleiten des Proteins im Importkanal. Das Cochaperon Mge1, ein lösliches Matrixprotein, tritt als Nukleotidaustausch-faktor spezifisch mit mtHsp70 in Wechselwirkung [16], um gebundene mtHsp70-Moleküle vom Vorstufenprotein zu lösen. In der Matrix wird dann die N-terminale Signalsequenz der importierten Vorstufenproteine durch die Matrixprozessierungspeptidase (MPP) abgespalten [194, 197]. Einige Vorstufenproteine werden zusätzlich durch die mitochondriale Intermediat-Peptidase (MIP) in der Matrix weiter prozessiert [76, 81], wobei N-terminal ein Octapeptid abgespalten wird. Die Faltung der neu importierten und prozessierten Proteine wird durch das Chaperonsystem mtHsp70/Mdj1p/Mge1p [151, 191] und Hsp60/Cpn10 [63, 69] vermittelt.

1.2.3.2 TIM22-Komplex

Über den TIM22-Komplex werden integrale Proteine der Innenmembran, wie etwa die Familie der Transporterproteine (z. B. ADP/ATP-Carrier, Phosphat-Carrier) importiert. Diese Proteine besitzen interne Importsignale und werden ohne eine klassische N-terminale Signalsequenz im Cytosol synthetisiert. Zentrale Komponenten dieses Komplexes sind die essentiellen Proteine Tim22 und Tim54 [82, 169]. Tim18, eine weitere Komponente, wurde kürzlich beschrieben [83]. Weitere Proteine die in diesem Importweg arbeiten, sind Tim10 und Tim12 [171]. Beide sind im Intermembranraum lokalisiert, wobei Tim12 fest mit Tim22 assoziiert ist. Importierte Proteine interagieren während des Transfers sequentiell mit Tim10/Tim12 und dem TIM22-Komplex. Die letztendliche Insertion der Vorstufenproteine in die Innenmembran wird durch die Funktion von Tim22 vermittelt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Mitochondrien sind die wichtigsten Energielieferanten für die Körperzellen und übernehmen verschiedenste Aufgaben des Stoffwechsels. Damit ist ihre uneingeschränkte Funktion für das Leben einzelner Zellen und damit für das korrekte Funktionieren des Körpers unentbehrlich. Eine Schlüsselposition in der Funktion der Mitochondrien hat der Proteinimport. Durch eine Störung in diesem Bereich fällt nicht nur eine Funktion des Mitochondriums aus, sondern es sind alle Reaktionen betroffen, da nahezu alle Proteine importiert werden müssen.
Trotz der bisherigen Erkenntnisse ist über die Funktion der Translokationsmaschinerie TIM22 noch nicht viel bekannt. Für den Importvorgang von Proteinen mit einer internen Leitsequenz sind mögliche Interaktionspartner des Komplexes von besonderem Interesse.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Proteinimport über den neu entdeckten TIM22-Komplex zu verfolgen, nach weiteren an diesem Importweg beteiligten Proteinen zu suchen und diese zu charakterisieren.
Ein bioinformatischer Ansatz sollte dazu dienen, im Genom der Hefe nach möglichen neuen Komponenten zu suchen. Gefundene Proteine sollten dann weiter charakterisiert werden. Folgende Ansätze sollte dabei verfolgt werden: Untersuchung der Essentialität durch Deletion im Hefegenom, Nachweis von Interaktionspartnern mittels chemischer Quervernetzung und Immunpräzipitation, Quantifizierung mit Bestimmung der Mengenrelation zu Interaktionspartnern durch Phosphorimaging, Analyse der evolutionären Konservierung in verschiedenen Organismen und *in vitro*-Importuntersuchungen zur Bestimmung der Stufe des Imports, auf dem die Komponente wirksam ist.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden der Molekularbiologie

2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Eine Einheit der OD_{260} entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNS bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNS (linearer Bereich: 0,1-1 OD) [156].

2.1.2 Aufreinigung von DNS

2.1.2.1 Gelelektrophorese

Die DNS-Lösungen wurden, je nach Volumen, mit 2x bis 10x DNS-Auftragspuffer (in der Endkonzentration: 5 mM EDTA, 15% (w/v) Ficoll400, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylenxylanol, 0.5% SDS, 0.2 M Tris/HCl, pH 7.5) versetzt und auf das entsprechende Gel geladen. DNS-Fragmente mit einer Größe von mehr als 200 bp wurden in Agarosegelen aufgetragen. Bei kleineren DNS-Fragmenten wurden Polyacrylamidgele verwendet. Zum Längenvergleich der Fragmente diente DNS mit bekanntem Restriktionsmuster oder DNALadder™. Die DNS wurde im Gel mit interkalierendem, bei Anregung mit UV-Licht (366 nm / 254 nm) fluoreszierendem, Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht konnten dann die DNA-Banden abgelesen, photographiert und ausgeschnitten werden.

a) Agarosegele

Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 7.5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) in einem Mikrowellenherd gelöst und bei 65 °C aufbewahrt. Die Konzentration der Agarose betrug, je nach Größe der zu analysierenden Fragmente, 0.8-2% (w/v). Beim Gießen wurde der Gellösung 0.25 mg/l Ethidiumbromid zugesetzt. Als Elektrodenpuffer diente TAE. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung bis zu 13 V/cm durchgeführt (entsprechend der Länge des Gels zwischen 60V und 160V).

b) Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele enthielten 6% (w/v) Acrylamid und 0.2% (w/v) Bisacrylamid in TAE. Durch die Zugabe von 0.05% (v/v) TEMED und 0.05% (w/v) APS wurde die Polymerisation gestartet und ein Gel mit den Abmessungen 12 cm x 14 cm x 1 cm gegossen. Die Laufzeit der Gele betrug 1-2 h im Elektrodenpuffer TAE bei einer konstanten Spannung von 200 V. Die Acrylamidgele wurden nach dem Lauf mit 1 mg/l Ethidiumbromid in TAE für 10 min gefärbt.

2.1.2.2 Extraktion der DNS aus Gelen

Aus den Agarose-/Polyacrylamidgelen wurde unter UV-Kontrolle die gewünschte fluoreszierende DNS-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gel vorher und nachher zur Dokumentation photographiert. Aus den entnommenen Gelfragmenten wurde dann die DNA wie folgt isoliert:

a) Agarosegele

Zur Isolierung von DNS aus Agarosegelen kam das QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT™ (Quiagen) zur Anwendung. Dazu wurde zu dem ausgeschnittenem Gelfragment das dreifache Volumen des Puffers QG gegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Nachdem das Gel aufgelöst war, wurde der Ansatz über eine Silicagel-Säule des Kits für 1 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (13.000 rpm, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene DNA zuerst mit 500 µl Puffer QG, dann mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die gereinigte DNA wurde dann mit 30 µl Elutionspuffer bzw. 30 µl H_2O für 1 min inkubiert und anschließend eluiert.

b) Polyacrylamidgele

Die Isolierung der DNS aus dem Polyacrylamidgel erfolgte durch Elektrophorese in ein Hochsalzkissen. Dazu wurden 80 µl 3 M Kaliumacetat (pH 7.5, 0.25% Bromphenolblau) in das Elutionsknie einer Hochsalzfalle gegeben. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h in 0.5x TAE-Puffer bei einer Spannung von 150 V. Dann wurde die Elution unterbrochen und 160 µl des angefärbten Salzpuffers mit einer Hamilton-Spritze entnommen. Nach Zugabe von 80 µl frischem 3 M Kaliumacetat wurde erneut für 1 h elektroeluiert und erneut 160 µl des angefärbten Salzpuffers entnommen. Die beiden Eluate wurden vereint und die DNS mit dem 2.5fachen Volumen eiskalten Ethanols ausgefällt und durch Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, Sigma 12154 Rotor) pelletiert. Die DNS wurde anschließend an der Luft getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

2.1.2.3 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Mit Hilfe der Phenolextraktion wurden Proteinverunreinigungen entfernt. Zwischen der Grenzschicht der phenolischen und der wäßrigen Phase sammelten sich Proteinverunreinigungen an, die von der DNS-haltigen Lösung getrennt wurden. Die DNS-Lösung wurde dazu mit 1/50 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (14.000 rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 1/50 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und wie zuvor abzentrifugiert.

Mit Hilfe der Ethanolfällung wurde die wäßrige DNS-Lösung konzentriert und von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNS-Lösung auf 300 mM Natriumacetat (pH 5.8) eingestellt und mit 2.5-fachen Volumen Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C

ausgefällt. Die DNS wurde für 20 min bei 4°C sedimentiert (15000 g, Sigma 12154-Rotor), mit 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E.coli*

a) Minipräparationen von DNS

Die Präparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNS erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse [11]. Dazu wurde der plasmidtragende *E. coli*-Klon in 2-5 ml LB_{amp}-Medium (Luria Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 mg/ml Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.4; supplementiert mit 100 mg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C kultiviert.

Die Bakterien in 1.5 ml dieser Über-Nacht-Kultur wurden durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, Tischzentrifuge) zur Sedimentation gebracht und der Überstand verworfen. Resuspendiert wurde mit 250 µl Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) und anschließend Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach max. 5 min Inkubation bei RT und mehrmaligem Invertieren des Ansatzes wurde dann das Zell-Lysat mit 350 µl Neutralisationspuffer N3 (3 M KAc, pH 5.5) neutralisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei RT (13.000 rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand auf die mitgelieferte Silicagel-Säule gegeben und bei RT für 1 min erneut zentrifugiert (13.000 rpm, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl H_2O eluiert. Zur Kontrolle wurde 2 µl der DNA-Lösung auf einem Agarosegel analysiert (2.1.2.1)

b) Midipräparationen von DNS

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNS (bis 0.2 mg) wurde der JETSTAR-KIT™ der Firma Genomed verwendet. Eine Anionen-Austauschsäule wurde mit 10 ml Lösung E4 (0.6 M NaCl, 0.1 M Na-Acetat, pH 5.0, 0.15% Triton X-100) äquilibriert. Die Bakterien wurden über Nacht in 50 ml LB_{amp}-Medium kultiviert und anschließend durch 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur (4.400 g, Beckman JA10-Rotor) gesammelt. Das Zellpellet wurde in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% SDS) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Zelllysat wurde durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 (3.2 M Kaliumacetat, pH 5.5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation (15.000 g, Beckman JA20-Rotor, RT) wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2x 10 ml Lösung E5 (0.8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5.0) gewaschen und mit 5 ml Lösung E6 (1.25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5) eluiert. Die DNS wurde durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol und 30 min Zentrifugation bei 4°C (15.000 g, Beckman JA20-Rotor) aus dem Eluat gefällt. Die DNS wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in zwei Schritten mit je 60 µl H_2O resuspendiert. 1 µl des isolierten Plasmids wurde auf einem Agarosegel analysiert (2.1.2.1).

2.1.4 Enzymatische Behandlung von DNS

2.1.4.1 Restriktionsverdau von DNS

Der Restriktionsverdau diente dazu, an enzymspezifischen Schnittstellen der DNS, einen Strangbruch einzufügen, um so bestimmte Fragmente der DNS zu erhalten. Die DNS wurde mit Restriktionsendonukleasen in den von den Herstellern Gibco/BRL und Boehringer Mannheim mitgelieferten Puffern verdaut. Es wurden etwa 2-3 U Enzym für 1 µg DNS eingesetzt. Um einen möglichst vollständigen Verdau zu erzielen, wurde für 2-12 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Der Restriktionsvorgang wurde bei thermosensitiven Enzymen durch Erhitzen des Ansatzes auf 72°C für 10 min beendet. Die gebildeten Fragmente wurden dann durch Elektrophorese in einem Agarosegel (2.1.2.1) und anschließender DNA-Isolierung (2.1.2.2) oder mit dem QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT™ (Quiagen) (2.1.2.2a) gereinigt.

2.1.4.2 Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase (AP)

Die Dephosphorylierung mittels der AP wurde bei linearisierter Vektor-DNS verwendet um die 5'-Phosphatgruppe abzuspalten und so eine Ligase-katalysierte Rezirkularisierung zu verhindern. Es wurde die AP aus Krabben (Shrimp Phosphatase, SAP) verwendet, die sich bei 65°C hitzeinaktivieren läßt. Für die Dephosphorylierung 5'-überhängender Enden wurde 1 U Enzym auf 30 µg linearisierte Vektor-DNS in 100 µl SAP-Puffer (1 mM $ZnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 10 mM Spermidin) eingesetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und nochmals wie zuvor inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Inkubation bei 65°C beendet. Die dephosphorylierten Vektoren wurden durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und anschließend aus dem Gel isoliert (2.1.2.2).

2.1.4.3 Ligation von DNS-Fragmenten

In der Ligationsreaktion werden zwei DNS-Fragmente durch die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (Gibco/BRL) verbunden.
In 20 µl Ligationspuffer (in der Endkonzentration: 50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% PEG 8000) wurden 100 ng Plasmid-DNS mit einem ein- bis fünffachen molaren Überschuß an DNS-Fragmenten und mit 1 U Enzym zuerst bei Raumtemperatur für 2h inkubiert. Es wurden davon 10 µl zur ersten Transformation abgenommen und der Rest weiter über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend konnte eine zweite Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* erfolgen.

2.1.5 Methoden mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.1.5.1 Templatesynthese für Rekombination

Die Methode der PCR [154, 155] erlaubt die selektive Amplifizierung von DNS-Bereichen bestimmter Länge und Sequenz. Man benutzt hierzu die Eigenschaft der DNS-Polymerase, zu einzelsträngigen DNS-Moleküle einen komplementären Strang zu synthetisieren, wenn kurze doppelsträngige Bereiche als Startbereiche vorliegen.
Die zu amplifizierende DNS (Template) wird mit Oligonukleotiden (Primer) im Überschuß versetzt, wobei jeweils ein Primer dem 5'-Startbereich der Sequenz entspricht und der andere Primer komplementär zum 3'-Endbereich der Sequenz ist. Bei der Konstruktion der Primer wurde darauf geachtet, daß sich bei der Auswahl der Sequenz eine Annealingtemperatur von etwa 50°C-60°C ergibt. Die Abschätzung der Temperatur erfolgt mittels der Formel:

$$T_m = n(A,T)*2 + n(G,C)*4 \ [°C]$$

Abb. 3: **Temperaturabschätzung für PCR**
T_m: abgeschätzte Schmelztemperatur des Primers; n(A,T): Anzahl der hybridisierenden Adenine und Thymidine; n(G, C): Anzahl der hybridisierenden Guanine und Cytidine

Eine Primer-Primer-Hybridisierung, die durch komplementäre Bereiche entstehen kann (z.B. auch durch palindrome Sequenz innerhalb eines Primers) muß durch entsprechende Auswahl der Sequenz vermieden werden. Zur Verlängerung der freien 3'-Enden der Primer zu zwei neuen, komplementären DNS-Strängen wurde eine thermostabile DNS-Polymerase (*Taq*- oder *Pfu*-Polymerase) verwendet.
Die ungefähr benötigte Synthesezeit wurde mit der Formel errechnet:

$$T_{syn} = l * k + 1 \text{ min}$$

Abb. 4: **Synthesezeit in Abhängigkeit der Fragmentlänge**
T_{sny}: geschätzte benötigte Synthesezeit der Polymerase; l: Länge des amplifizierten Fragmentes in 1000 bp; k: von Polymerase abhängige Zeitkonstante, wobei k=1 min für *Taq*-Polymerase und k=2 min für *Pfu*-Polymerase

Für den PCR-Ansatz wurde der PRIMEZYME™-Kit der Firma Biometra verwendet. Jeder Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 1-2 U *Taq*- bzw. 2.5 U *Pfu*-DNS-Polymerase, je 25 µM dNTPs und je 200 µM Oligonukleotid in dem von Biometra gelieferten PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100). Als Template wurde 100 ng genomischer DNS oder Plasmid-DNS verwendet. Bei Klonierungskontrollen wurden Hefe- oder *E. coli*-Zellen direkt in den Reaktionsansatz gegeben. Alle Proben wurden bei PCR-Cyclern ohne beheizbaren Deckel mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Konzentrationsveränderung der Reaktionslösung durch Verdampfen im Heizblock zu

verhindern. Als Standard wurden folgende PCR-Schritte verwendet (wenn im Text nicht anders beschrieben):

1. Hitzedenaturierung der DNS und Inaktivierung ggf. vorhandener Nukleasen
   94°C, 3 min
2. 30 Zyklen zur Amplifikation
   I. Denaturierung der DNS
      94°C, 1min
   II. Annealing
      T_m, 1 min
   III. Polymerase-Reaktion
      72°C, t_{syn} min
3. Abschließende Polymerase-Reaktion
   72°C, 10 min
4. Kühlen auf 4°C

Aus dem PCR-Ansatz wurden 5 µl zur Kontrolle des Amplifizierungsprodukts durch Gelelektrophorese analysiert (2.1.2.1). Zeigte sich in der Kontrolle ein Fragment der erwarteten Länge, wurde die Probe gereinigt (2.1.2.2).

2.1.5.2 Nachweis von Genmanipulationen in *S. cerevisiae* nach Huxley

Chromosomale Genmanipulationen wurden mittels PCR kontrolliert [75]. Dabei ermöglichten Primer, die strangaufwärts und strangabwärts des zu untersuchenden Gens hybridisieren, die Synthese eines Fragmentes, über dessen Größe die korrekte Integration der Markerkassette erkannt werden konnte.
Von der zu untersuchenden Kultur wurde eine Probe (Pipettenspitze oder etwa 10 µl) in ein Reaktionsgefäß übertragen. Es wurden 50 µl einer Zymolyase-Lösung (1 mg/ml H_2O) zugefügt und für 10 min bei RT inkubiert, um die Zellwand der Hefezellen abzubauen. Nach Isolierung der Sphäroplasten durch Zentrifugation wurden sie für 5 min bei 95°C inkubiert, auf Eis rasch abgekühlt, in 40 µl PCR-Mix resuspendiert und eine Standard-PCR ausgeführt. Anschließend wurden Zelltrümmer in dem PCR-Ansatz durch Zentrifugation (15 sec, 6000 rpm, RT, Tischzentrifuge) abgetrennt und 10 µl des Überstandes auf einem Agarosegel analysiert (2.1.2.1).

2.1.6 Transformation von Bakterien und Hefen

Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen wurde mittels Elektroporation [44] oder Hitzeschock [95], Transformation von Hefezellen mittels Lithiumacetat [53-55, 160] oder DMSO [66] durchgeführt.

2.1.6.1 Elektroporation kompetenter *E.coli*-Zellen

Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

5 ml *E.coli*-Zellen wurden über Nacht kultiviert und anschließend in 500 ml LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bis zu einer OD_{578} von 0.5 angezogen. Nach 30 min Inkubation auf Eis, wurden die Zellen in sterile JA10-Zentrifugationsbecher überführt und sedimentiert (4400 g, 15 min, Beckman-JA10-Rotor, 4 °C). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit einer eiskalten 10%igen (v/v) Glycerinlösung (je 500 ml, 250 ml und 50 ml) wurde das Zellpellet in 500 µl 10% Glycerin aufgenommen und zur Lagerung in 40 µl-Portionen bei -80°C eingefroren.

Elektrotransformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetente *E.coli*-Zellen wurden nach dem Protokoll der Firma Bio-Rad durch Elektroporation im Gerät "GENEPULSER" transformiert. Dazu wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Transformationsansatzes gemischt und in die eisgekühlten Elektroporationsküvetten (0.2 cm Elektrodenabstand) überführt. Anschließend wurden die Zellen durch einen elektrischen Impuls (2.5 kV, 400 Ω, 25 mF, Zeitkonstante 8-9 ms) für DNS aufnahmefähig gemacht. Die Empfängerzellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation mit einer Eppendorfzentrifuge (3 min, 5.000 rpm) wurden die Zellen sedimentiert und in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Die Suspension konnte dann auf einer entsprechenden Selektionsplatte (z.B. LB_{amp}-Platte) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Wachsende Kolonien wurden über eine DNS-Minipräparation (2.1.3) und spezifischen Restriktionsverdau (2.1.4.1) auf eine erfolgreiche Transformation hin getestet.

2.1.6.2 Hitzeschocktransformation chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen

Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Von einer Einzelkolonie *E. coli* wurde eine Übernachtkultur mit 5 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert. Sie wurde am nächsten Tag 1:20 verdünnt und bis zu einer OD_{578} von 0.5 angezogen. Die Zellen wurden steril sedimentiert (4400 g, 15 min, Beckman-JA10-Rotor, 4 °C), der Überstand abgegossen und mit 40 ml sterilfiltriertem Puffer 1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% Glycerin auf pH 5.8 mit 100 mM Essigsäure eingestellt, 4°C) auf Eis resuspendiert und für 15 min inkubiert. Nach erneuter Pelletierung der Zellen (4400 g, 15 min, Beckman-JA10-Rotor, 4 °C) wurde mit sterilfiltriertem Puffer 2 (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6.5 mit KOH einstellen, 4°C) resuspendiert und erneut auf Eis 15 min inkubiert. Die dann chemisch kompetenten Zellen wurden in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C zur Lagerung rasch eingefroren.

Hitzeschocktransformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden in je 200 µl Aliquots von -80°C auf Eis aufgetaut und in 100 µl Ansätze geteilt. Jeder Ansatz wurde mit bis zu 10 µl DNS (0.1 – 0.5 µg/µl) bzw. Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzschock für 45 sec bei 42°C. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 min, wurde der Ansatz auf einer vorgewärmten (37°C) selektiven LB-Platte ausgestrichen bzw. in ein selektives LB-Flüssigmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37°C übernacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten dann auf erfolgreiche Transformation hin untersucht werden (2.1.5.2). Direkt in Flüssigmedium angeimpfte Transformationsansätze wurden zur Midi-Präparation verwendet (2.1.3).

2.1.6.3 DMSO-Transformation von *S. cerevisiae*

Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen mit DMSO

Hefezellen wurden von einer dicht bewachsenen YPD-Platte in 1 ml TES-Puffer (1 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 8.35, 3% (v/v) Ethylenglykol) überführt. Die Hefezellen wurden 30 sec bei Raumtemperatur sedimentiert (14000 rpm, Eppendorfzentrifuge), dreimal mit 1 ml sterilem TES-Puffer gewaschen und in 750 µl TES resuspendiert. Nach der Zugabe von 45 µl DMSO wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und in 100 µl-Portionen bei -80 °C zur Lagerung eingefroren.

Transformation der kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Transformation wurden 1-5 µg DNS auf 100 µl der tiefgefrorenen Hefezellen gegeben. Unter ständigem Schütteln wurden die Proben für 5 min bei 37 °C inkubiert, mit 1 ml TPEG-Puffer (1 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 8.35, 3% (v/v) Ethylenglykol) versetzt und für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert (14000 rpm, 30 sec, Eppendorfzentrifuge, RT), in 200 µl TN-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.35, 0.15 M NaCl) resuspendiert und auf selektive SC-Platten ausplattiert. Die Hefen wurden für 2-4 Tagen bei 30°C inkubiert. Dann wurden 6-12 Einzelkolonien aufgenommen, erneut auf einer selektiven SC-Platte ausgestrichen und wiederum für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien durch Insertionskontrolle (2.1.5.2) auf die erfolgreiche Transformation hin getestet.

2.1.6.4 Lithiumtransformation von *S. cerevisiae*

Eine 50 ml Hefekultur in YPD-Medium wurde bei 30°C bis zu einer OD_{578} von 0.5 geschüttelt. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 min, 3000 rpm, JA20-Rotor) geerntet, mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach Überführung in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und das Zellpellet in 500 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. 50 µl dieser Suspension

wurden erneut sedimentiert und das Zellpellet mit 240 µl 50% (w/v) PEG-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl beschallter, denaturierter Lachsspermien-DNS (5 mg/ml) und 70 µl (0.1 – 10 µg) zu transformierender DNS versetzt und gemischt. Dann wurde die Probe für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert und anschließend für 20 – 25 min einem Hitzeschock mit 42°C unterzogen. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (15 sec, 6000 rpm, RT, Tischzentrifuge) pelletiert, in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Einzelkolonien wurden nochmals aufgenommen und auf eine Selektivplatte übertragen. Nach weiteten 2-3 Tagen wurden die Kolonien durch Insertionskontrolle (2.1.5.2) auf die erfolgreiche Transformation hin getestet.

2.1.7 Disruptionsstrategien

Um ein Gen und/oder dessen Promotor vollständig zu inaktivieren bzw. zu ersetzen, wurde die Methode der homologen Rekombination artefizieller DNS-Fragmente in das Organismen-Genom angewandt. Dazu wurden DNS-Fragmente konstruiert, deren 3'- und 5'-Ende jeweils einen kurzen Bereich von etwa 50-60 bp, der komplementär zur flankierenden Region des Gens war. Zwischen diesen komplementären Bereichen, die zur Hybridisierung der Enden des Fragments an dem gewünschten genomischen Bereichen führen, liegt der zu inserierende Bereich.

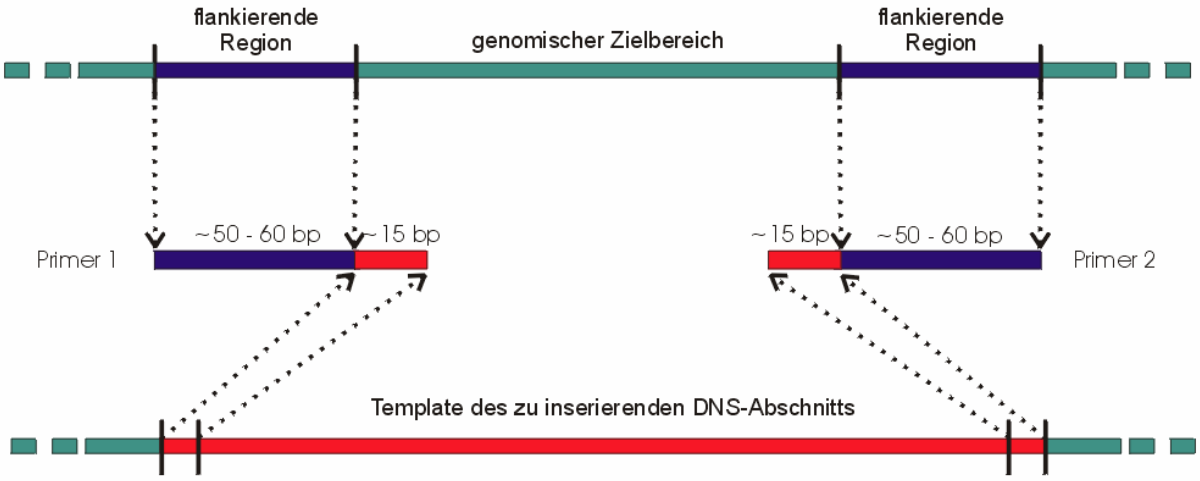


Abb. 5: **Konstruktion der Primer für das DNS-Fragment der homologen Rekombination**
Zur Amplifikation des DNS-Fragmentes für die homologe Rekombination werden Oligonukleotide (Primer 1 und 2) konstruiert, die einen etwa 50-60 bp langen Bereich (violett) enthalten, der homolog zu den flankierenden Abschnitten des genomischen Zielbereiches ist. Über diesen Bereich erfolgt die Hybridisierung an die genomische DNS. In 3'-Richtung davon schließt sich jeweils ein Abschnitt von etwa 15 bp aus dem Anfang bzw. Ende der zu inserierenden DNS an (rot). Dieser Bereich hybridisiert in der folgenden PCR auf dem Template des zu inserierenden DNS-Abschnitts.

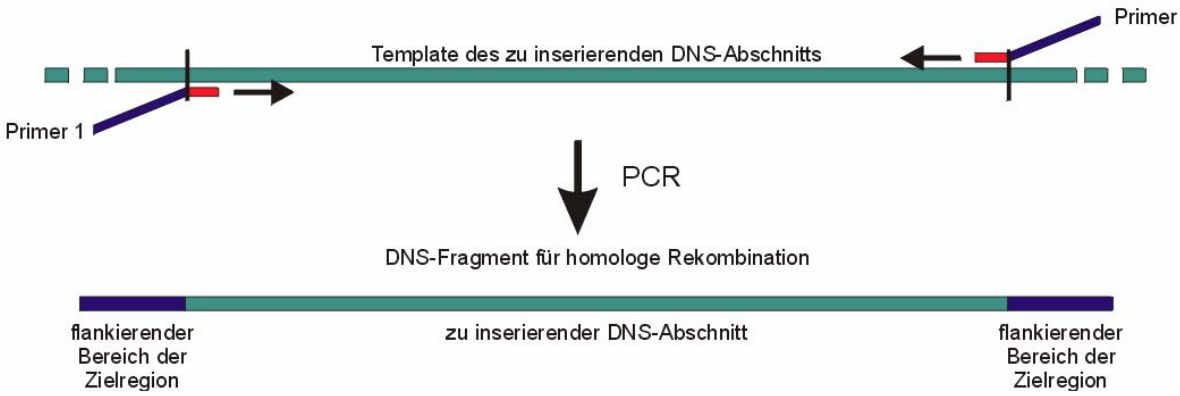


Abb. 6: **Amplifikation des DNS-Fragmentes der homologen Rekombination**
Mit den konstruierten Primern (siehe obere Abbildung) wird durch die Polymerasekettenreaktion das zur Rekombination benötigte DNS-Fragment hergestellt. Dabei sind am 3'- und 5'-Ende des Fragments homologe Bereiche enthalten, die den zu ersetzenden genomischen Bereich flankieren.

Das Rekombinations-Fragment wurde mittels PCR (2.1.5.1) aus einem, das Markergen enthaltende Plasmid, mit den 3'- und 5'-Primern, die den homologen Bereich des Zielgens enthielten, amplifiziert. Zur Amplifikation wurde, um eine möglichst geringe Mutationsrate zu gewährleisten, eine Proofreading-Polymerase (z.B. *Pfu*) verwendet. Das PCR-Produkt wurde dann über ein Agarosegel gereinigt (2.1.2), aus dem Agarosegel eluiert und zur Transformation (2.1.6.4) verwendet.

2.1.7.1 Replacementkassette

2.1.7.1.1 *tim9*::*HIS3* Disruption

Um zu untersuchen, ob Tim9 essentiell für Hefe ist, wurde ein *TIM9*-Allel in einem diploiden Hefestamm durch ein Markergen ersetzt. Zur Disruption des *TIM9*-Gens wurde das zum *HIS3*-Gen aus *S. cerevisiae* heterologe *HIS5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* [48] als Marker verwendet. Das zur Rekombination hergestellte DNS-Fragment trug, zur Hybridisierung auf der genomischen DNS, einen 55 bp langen Bereich von Position –200 vor dem *TIM9*-Startcodon sowie einen 55 bp langen Bereich ab *TIM9*-Stoppcodon vor bzw. nach dem Markergen. Der endogene Promotor des *TIM9*-Gens wurde durch die Rekombination ebenfalls entfernt. Als neuer Promotor wurde die 5'- und 3'-TEF (**T**ranslation **E**longation **F**actor 1 alpha)-Region aus dem Fadenpilz *Ashbya gossypii* eingeführt, die in *S. c.* zu einer hohen Expression des entsprechenden Gens führen [176]. Das eingeführte *HIS5*-Gen wurde mit der TEF-Promotor-/-Terminator-Region aus dem Vektor pFA6a-HIS3MX6 [188, 189] durch PCR amplifiziert. Auf dem Vektor hybridisierende Bereiche sind in Fettdruck.

5'-Primer (Rekombinationskassette; Fragment 1)

3'-CAAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAATCTCGGTCGTAA
TGAT**CGTACGCTGCAGGTCGAC**-5'

3'-Primer (Rekombinationskassette; Fragment 1)

3'-CTAAAAATGGGCTACACCAGAGATACATAATTAGATATATATACGCCAGTACACCA
TCGATGAATTCGAGCTCG-5'

3'-Primer (zur Insertionskontrolle, Fragment 2)

3'-CCATCATCGTGCTGAAAGCG-5'

5'-Primer (zur Insertionskontrolle, Fragment 2)

3'-TACAAAAGCCCTCCTACCCA-5'

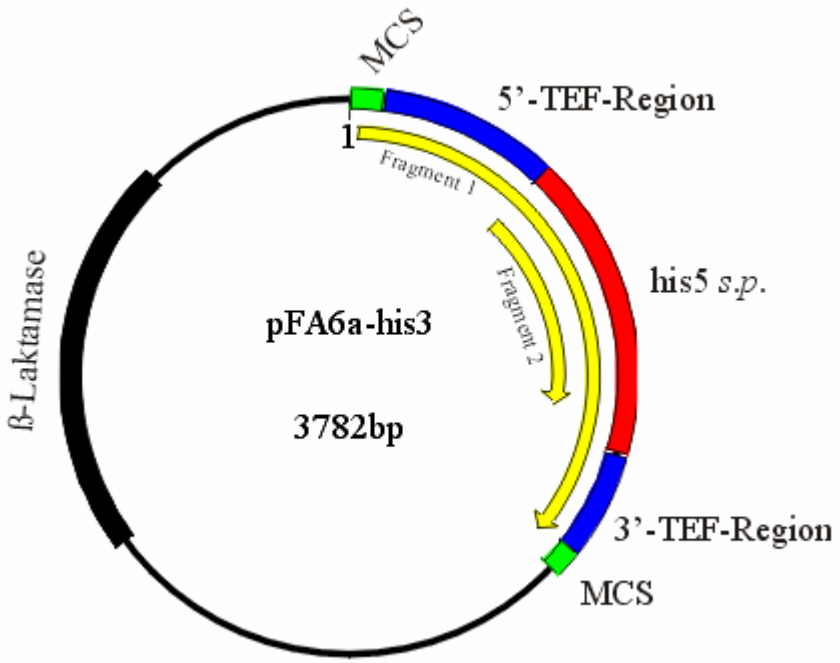


Abb. 7: **Vektor pFA6a-his3**
Der Vektor wurde als PCR-Template für Synthese der Rekombinationskassette (*Fragment 1*) verwendet. In dieser Kassette ist der TEF-Promotor, der eine hohe Expression des *HIS5 S.p.* gewährleistet, enthalten. Das *HIS5 s.p.* ist homolog zu *HIS3 s.c.* und dient als Selekionsmarker für die erfolgreiche Rekombination in einem *Δhis3* Stamm von *S.c.*

2.1.7.1.2 *tim8*::*HIS3* Disruption

Zur Disruption des *TIM8*-Gens wurde ebenfalls die oben (2.1.7.1.1) beschriebene Methode verwendet.

Das zur Rekombination hergestellte DNS-Fragment trug zur Hybridisierung auf der genomischen DNS einen komplementären Bereich von 60 bp ab Position –137 relativ zum *TIM8*-Startcodon sowie einem 55 bp langen Bereich ab dem *TIM8*-Stoppcodon. Die

Rekombinationskassette wurde ebenfalls aus dem Vektor pFA6a-his3 MX6 [188, 189] durch PCR amplifiziert.
Auf dem Vektor hybridisierende Bereiche sind in Fettdruck.

5'-Primer (Rekombinationskassette; Fragment 1)

3'-GCGTCTTGTTTGTTGTTACGCTGCATATCAAAGCGAACGGTTAGTTATTAACTAA
CGTAACGTACGCTGCAGGTCGAC-5'

3'-Primer (Rekombinationskassette; Fragment 1)

3'-TATTTACAGATATATTAAGGTAAAGAGAATAATGACTCGGAGAGATAAATCGGTTT
CATA**ATCGATGAATTCGAGCTCG**-5'

2.1.7.2 Herstellung des *TIM9*(*gal10*)-Konstruktes

Das zur Rekombination verwendete DNS-Fragment enthielt das *LEU2*-Gen und den gal10-Promotor aus *Schizosaccharomyces pombe*. Die 3'- bzw. 5'-Extension bestand aus dem komplementären nicht-codierenden 50 bp langen Bereich ab Position –137 vor dem *TIM9*-Startcodon bzw. dem nicht-codierenden 49 bp langen Bereich ab *TIM9*-Startcodon. Das *LEU2*-gal10-Konstrukt wurde mittels PCR aus dem Vektor Yep51vk amplifiziert. Die auf dem Vektor hybridisierenden Bereiche sind in Fettdruck.

5'-Primer

3'-CAAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAATCTCGG**TGTGGG
AATACTCAGGTATC**-5'

3'-Primer

3'-CCACTACTTTTTGGAACTCTTGTTGTTCTTTGGAGTTCAATGCGTCCAT**TGAATTT
TCAAAAATTCTTACTTTT**-5'

2.1.8 Klonierung von pVT51-Tim9

Mit der Standard-PCR (2.1.5) und folgenden Primern

5'-Primer

3'-CCCCGGATCCACC**ATGGACGCATTGAACTCCAA**-5'

3'-Primer

3'-CCCCAAGCTT**ATCGGCCCAAGCCTTGT**-5'

wurde aus dem Hefestamm w303a das *TIM9*-Gen mit flankierenden Schnittstellen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (2.1.2) und mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut (2.1.4.1). Das erhaltenen Fragment wurde dann in den mit den selben Enzymen verdauten und gereinigten (2.1.4.1) Vektor pVT51 kloniert (2.1.8).

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Kultivierung von Hefezellen

Die Anzucht von Hefezellen erfolgte in YPD- oder Laktat-Medium bei 30°C [59, 109]. Wildtyp-Stämme wurden in Laktat-Vollmedium kultiviert. Hefemutanten, die mit Hilfe eines Auxotrophie-Markers selektiert werden sollten, wurden in SD-Laktat-Medium angezogen, das entsprechend der gewünschten Selektionsbedingungen mit Aminosäuren, sowie mit Glucose (0.1%) versetzt war. Für die Expression der gal10-regulierten [73] *TIM*-Gene im Hefestamm w334a wurden dem Medium außerdem 0.5% Galaktose zugesetzt. Isogene Wildtyp- und Mutantenstämme, die in einem Experiment direkt verglichen werden sollten, wurden unter gleichen Bedingungen angezogen.
Die Hefezellen wurden in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert und bei Bedarf auf Platten mit Vollmedium (YPD-Platten) oder Selektionsmedium (SD-Laktat-Platten mit essentiellen Aminosäuren) ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen konnten die Hefen dann in Flüssigkultur überführt werden, wobei zu einer OD_{578} von 0.1 angeimpft wurde. Als Standardmedium diente dabei YPD. Bei der Selektion auf bestimmte Markergene wurde ein SC-Medium verwendet (2.7.3), dem die entsprechenden Markeraminosäuren oder Markerbasen fehlten. Die Kultur wurde auf eine OD_{578} von 0.2 verdünnt und bei 30 °C geschüttelt, bis sie eine OD_{578} von 1.0-1.5 erreicht hatte. Zur Präparation von Mitochondrien wurden die Hefezellen in Flüssigkultur aufgezogen, das Laktat als Kohlenstoffquelle enthielt (2.7.3).

2.2.2 Sporulation diploider Hefestämme

Die Sporulation von diploiden Hefestämmen erzeugt durch mitotische und anschließend meiotische Teilung vier haploide Hefesporen. Dabei werden Allele des diploiden Stammes getrennt und somit versteckte rezessive Merkmale erkennbar.
Zunächst wurden die diploiden Hefestämme auf einer YPD-Platte mit Vollmedium herangezogen (2.7.3). Die Hefezellen wurden dann dünn auf einer Sporulationsplatte (1% Kalium-Acetat) ausgestrichen und für 5-10 Tage bei 30°C inkubiert. Nachdem mehr als die Hälfte der Hefezellen Asci gebildet hatten [150], wurde eine Tetradenanalyse (2.2.3) durchgeführt.

2.2.3 Tetradenanalyse

Nach der Sporulation wurden die Hefezellen in H_2O aufgenommen und mit 1 mg/ml Zymolyase versetzt, um die Sporen aus den Asci freizusetzen. Sofort wurden die Zellen auf eine YPD-Platte überführt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Sporen eines Asci getrennt und einzeln an definierten Stellen der Platte abgelegt [150]. Dabei wurden die vier Sporen einer Tetrade in einer Reihe angeordnet. Die YPD-Platte wurde für mehrere Tage bei 30°C inkubiert und die Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, wurden auf ihren Phänotyp bzw. Genotyp hin untersucht.

2.2.4 Abschätzung der Zellzahl in Kulturen

Eine Abschätzung der Zellzahl erfolgte spektrometrisch durch Messung der OD bei 578 nm. Dazu wurde die Kultur soweit verdünnt, bis die OD kleiner als 1 war. Innerhalb dieses Bereichs entsprach eine OD_{578} von 0.1 etwa 3 x 10^6 Zellen/ml. Der gemessene Wert wurde entsprechend dem Verdünnungsfaktor korrigiert.

2.2.5 Bestimmung des mating-types

Genetische Analysen der Hefen erfordern die Kenntnis des mating-Types der Zellen. Zu dessen Bestimmung wurde die Fähigkeit haploider Hefezellen ausgenutzt, die Auxotrophiebedürfnisse von Zellen des entgegengesetzten mating-Types durch ihre eigenen zu komplettieren. Verwendet wurden dazu zwei Test-Stämme, die entgegengesetzte mating-Types hatten und deren einziger Auxotrophiemarker nicht im zu testen Stamm deletär war. Die Test-Stämme wurden in je einer 1 ml-Übernachtkultur gezogen und anschließend 200 µl davon auf jeweils einer YPD-Platte ausgestrichen und bei 30°C erneut kultiviert. Der zu testende Stamm wurde auf zwei YPD-Böden ausplattiert und mit jeweils einem der Test-Stämme überstempelt. Nach Inkubation bei 30°C für 10h erfolgte das Replicastempeln der Zellen auf Minimalmedium. Nach Bebrütung der Zellen bei 30°C in Übernachtkultur, konnte der mating-Types des Hefestammes am Wachstum auf der Platte des im mating-Types komplementären Test-Stammes erkannt werden.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*-Zellen

2.3.1.1 Standard

Hefezellen wurden wie oben (2.2.1) beschrieben bis zu einer OD_{578} von 1-1.5 kultiviert. Die anschließende Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Daum [29]. Dazu wurden die Hefezellen sedimentiert (4400 g, 5 min, Beckman JA10-Rotor, RT) und mit H_2O gewaschen. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 0.5 g/ml in DTT-Puffer (100 mM Tris/SO_4, pH 9.4, 10

mM DTT) resuspendiert und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (4400 g, 5 min, Beckman-JA10-Rotor) und mit 1.2 M Sorbitol gewaschen. Pro 0.15 g Feuchtgewicht der Zellen wurde 1 ml Zymolyase-Puffer (1.2 M Sorbitol, 20 mM K-Phosphat, pH 7.4) und 0.3 mg Zymolyase zugegeben. Unter leichtem Schütteln wurde die Zellsuspension bei 30 °C inkubiert. Die Bildung von Sphäroplasten wurde durch osmotische Lyse getestet. Dazu wurden je 25 µl der Zellsuspension mit 1 ml Wasser oder 1 ml 1.2 M Sorbitol vermischt. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD_{578} der ersten Lösung 10-20% von der OD_{578} der Sorbitol-Lösung betrug. Alle darauffolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die lysierten Zellen wurden erneut abzentrifugiert (4400 g, 5 min, Beckman-JA10-Rotor) und mit 1.2 M Sorbitol gewaschen. Die Hefezellen wurden pro 0.15g Feuchtgewicht in 1 ml kalten Homogenisierungspuffer (0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.2% (w/v) BSA, 1 mM PMSF) resuspendiert und anschließend mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Große Zelltrümmer und ganze Zellen wurden durch zweimalige Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, Beckman-JA20-Rotor) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien geerntet (17400 g, 12 min, Beckman-JA20-Rotor, 4 °C). Das Sediment wurde in HS-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, Beckman-JA20-Rotor). Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand erneut isoliert (17400 g, 12 min, Beckman-JA20-Rotor, 4 °C) und in HS-Puffer aufgenommen. Nach der Proteinbestimmung (2.4.3.1) wurden die isolierten Mitochondrien auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, in kleineren Mengen rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C zum späteren Gebrauch aufbewahrt.

2.3.2 Präparation von ^{35}S-markierten Hefemitochondrien

Um die Hefeproteine mit [^{35}S]-Sulfat zu markieren, wurden die Hefezellen zuerst auf einem sulfatarmen Minimalmedium kultiviert. Dazu wurden die zu markierenden Hefestämme zunächst in einem S-Laktatmedium angezogen, das durch die Markersubstanzen und Glucose/Galaktose komplettiert wurden. Anschließend wurden die Hefezellen in ein sulfatarmes Minimalmedium (2.7.3) überführt. Nach drei Passagen wurde eine 2.5 l Hauptkultur auf eine OD_{578} von 0.1 angeimpft und mit 7.5 mCi/l [^{35}S]-Na_2SO_4 versetzt. Diese Kultur wurde über Nacht unter Rühren und ständiger Luftzufuhr bei 30°C inkubiert. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte wie unter (2.3.1.1) beschrieben.

2.3.3 Präparation von Mitoplasten durch osmotische Schwellung

Mitoplasten sind Mitochondrien, deren äußere Membran geöffnet wurde. Dabei bleibt die Innenmembran intakt und wird von außen zugänglich. Zur Präparation von Mitoplasten wurden Mitochondrien in HS-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.6 M Sorbitol, 4°C) mit einer Endkonzentration von 50 µg/100 ml resuspendiert und anschließend 1:10 mit einem hypotonen

Puffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 4°C) verdünnt. Zur Kontrolle wurden Mitochondrien 1:10 in eiskaltem, isotonem HS-Puffer verdünnt.

2.3.4 Proteasebehandlung von Mitoplasten

Diese Methode diente der Lokalisation importierter Proteine innerhalb der mitochondrialen Kompartimente: Mitochondrien wurden geschwollen und die entstandenen Mitoplasten mit Proteinase behandelt. Die zugesetzte Proteinase verdaute dann die Proteine, die außerhalb der Matrix und der Innenmembran lokalisiert waren.
Aus Mitochondrien wurden durch osmotisches Schwellen (2.3.3) Mitoplasten hergestellt. Während des Schwellvorganges wurde Proteinase K, eine unspezifische Serinprotease aus dem Pilz *Tritirachium album limber*, in der gewünschten Konzentration (normalerweise 100 µg/ml) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden den Proben 1 mM PMSF (Stammlösung: 200 mM in EtOH) zugesetzt und für weitere 5 min bei 4°C inkubiert. Die Mitoplasten wurden durch eine Zentrifugation (20000 g, 10 min, Sigma, 12153-Rotor, 4°C) in HS-Puffer mit 0.2 mM PMSF reisoliert.

2.3.5 Gewinnung des Gesamtproteins aus Hefe

In der Hefezelle häufig vorkommende Proteine konnten rasch und wenig aufwendig mit diesem schnellen Aufschluß der Hefe gewonnen werden. Die Präparation des Gesamtproteins aus Hefezellen erfolgte durch das Verfahren der alkalische Lyse [72]. Dazu wurden 250 µl einer Hefekultur (OD_{578} von 1-3) mit 50 µl einer Lösung aus 1.85 M NaOH, 2 mM PMSF, 7% ß-Mercaptoethanol vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 0°C wurden die Proben mit 220 µl 72% TCA-Lösung versetzt und für weitere 30 min bei 0°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 15'000 rpm, 4°C, Beckmann JA18.1 Rotor) wurde das Pellet mit 6% TCA und anschließend mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proben wurden für 5 min bei 56°C getrocknet, in 100 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und davon 20 µl mittels SDS-PAGE analysiert (2.4.3.3).

2.3.6 Herstellung mitochondrialer Detergenzextrakte

Zur Untersuchung bestimmter Proteinkomplexe, z.B. des TIM22-Komplexes, die durch starke Detergenzien leicht zerstörbar sind, wurden mitochondriale Detergenzextrakte mit schwächeren Detergenzien hergestellt. Dazu wurden Mitochondrien in Solubilisierungspuffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 150 mM Kaliumacetat, 1 mM PMSF) mit 1% Digitonin resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurde die Proben für 30 min (45000 rpm, Beckmann TLA45-Rotor, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand enthielt dann den intakten Proteinkomplex und wurde als Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen verwendet.

2.3.7 Carbonatextraktion

Mit Hilfe der Carbonatextraktion wurden lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abgetrennt [51]. Dies kam hauptsächlich dann zur Anwendung, wenn untersucht werden mußte, ob ein Protein durch z.B. eine Transmembrandomäne oder eine stabile Interaktion mit einem Membranprotein fest mit der Membran verbunden war, oder ob es sich nur um eine lösbare Assoziation mit der Membran handelt.

Dazu wurden Mitochondrien in einer 0.1 M Na_2CO_3-Lösung (pH 11.5) zu einer Proteinkonzentration von 0.1 mg/ml suspendiert und im Überkopfmischer für 30 min bei 4°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation (45000 rpm, 30 min, Beckmann TLA45-Rotor, 4°C) wurden die integralen Membranproteine sedimentiert. Der Überstand enthielt die löslichen und peripher mit der Membran assoziierten Proteine, die mit TCA gefällt (2.4.3.2) und in Laemmli-Puffer zum Laden auf SDS-PAGE (2.4.3.3) resuspendiert werden konnten. Das Pellet wurde ebenfalls, zur weiteren Untersuchung auf SDS-PAGE, in Auftragspuffer resuspendiert.

2.3.8 *In vitro* Proteinimport in isolierte Mitochondrien

2.3.8.1 Import von radioaktiv markierten Proteinen aus Retikulozytenlysat

Der *in vitro* Import radioaktiv markierter Proteine erlaubte die qualitative als auch die quantitiative Bestimmung des Importverhaltens verschiedener Mitochondrienstämme gegenüber der verwendeten Vorstufenproteinen.

Dazu wurden *in vitro* synthetisierte Vorstufenproteine mit isolierten Mitochondrien verwendet. Die Vorstufenproteine wurden in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin synthetisiert (2.4.1.1) um sie radioaktiv zu markieren. Sie konnten damit nach dem Import in die Mitochondrien und Trennung auf SDS-PAGE mit Autoradiographie analysiert werden. Ein Standard-Importansatz enthielt 50-100 µg Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (50 mM HEPES/KOH pH 7.2, 600 mM Sorbitol, 1 mg/ml fettsäurefreies BSA, 80 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $MnCl_2$, 2.5 mM EDTA, 2 mM KH_2PO_4). Das für den Importvorgang nötige Membranpotential $\Delta\psi$ wurde durch entsprechende Vorinkubation hergestellt (2.3.10). Die Importreaktion wurde durch die Zugabe von 1-10 µl des Retikulozytenlysats zu dem Importansatz gestartet. Der Import wurde normalerweise bei 25°C durchgeführt und durch die Abkühlung der Proben auf 4°C und gegebenenfalls durch Zerstörung des Membranpotentials (2.3.11) gestoppt. Nach Zentrifugation (9000 g, 10 min, Sigma 12154-Rotor, 4°C) wurden die Proben in HS-Puffer gewaschen.

2.3.8.2 Submitochondriale Lokalisierung von importierten Proteinen

Um festzustellen welche Importstufe oder Lokalisierung importierte Proteine erreicht haben oder um zwischen importierten und nichtimportierten Vorstufenproteinen unterscheiden zu können, wurden Mitochondrien nach erfolgtem Import unter isotonischen und hypotonen

Bedingungen einer Proteasebehandlung unterzogen (2.3.3, 2.3.4). Nicht vollständig importierte Vorstufenproteine, die entweder an der Außenmembran haften oder nur partiell importiert werden konnten, wurden unter beiden Bedingungen durch die Proteasebehandlung verdaut. Proteine bzw. Proteindomänen in der Innenmembran und der Matrix bleiben dagegen vor der Protease geschützt und können über SDS-PAGE (2.4.3.3) und Autoradiographie (2.4.3.6) oder Immundekoration (2.5.4) detektiert werden.
Zur Durchführung der Lokalisation wurde der Importansatz nach Beendigung der Importreaktion in drei je 50 µl Aliquots geteilt. Ein Teil der Proben wurde 1:10 in HS-Puffer aufgenommen. Ein zweiter Teil wurde 1:10 mit HS-Puffer verdünnt und mit 50-500 µg/ml Proteinase K oder 0.5-200 µg/ml Trypsin versetzt. Der dritte Teil der Proben wurde zum Schwellen 1:10 in 20 mM HEPES/KOH pH 7.4 verdünnt und mit 50-500 µg/ml Proteinase K oder 0.5-200 µg/ml Trypsin behandelt. Alle Proben wurden für 5-20 min bei 4°C inkubiert. Der Proteaseverdau wurde danach durch die Zugabe von 2 mM PMSF (bei PK-Verdau) bzw. 0.5-2 mg/ml STI (bei Trypsin-Verdau) gestoppt. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentation der Mitochondrien durch Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, Sigma-Rotor 12154, 4°C). Die Proben wurden in HS-Puffer, der 0.1 mM PMSF enthielt, reisoliert. Danach erfolgt durch Zugabe von 20 µl Auftragspuffer die Lyse der Mitochondrien bzw. Mitoplasten und Denaturierung der Proteine. Mit SDS-PAGE (2.4.3.3) und anschließender Autoradiographie (2.4.3.6) oder Westernblotting (2.5.4) wurden die importierten Proteine analysiert. Als Referenz wurden 10% des verwendeten Lysates auf das Gel mit aufgetragen. Zur Effizienzprüfung des hypotonen Schwellvorgangs, wurden endogene Markerproteine für den Intermembranraum (Cyt *c*-Peroxidase) und die Matrix (Mge1) auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen.

2.3.9 ATP-Depletion

Um gezielt ATP in der mitochondrialen Matrix, nicht jedoch externes ATP, irreversibel zu depletieren, wurden die Mitochondrien zunächst in Importpuffer (2.3.8) verdünnt (0.25 mg/ml) und 3 min bei 25°C inkubiert, damit bereits vorhandenes ATP hydrolysiert bzw. aus der Matrix exportiert werden konnte. Danach wurde der Probe 20 µg Oligomycin (Stammlösung: 4mM in EtOH) und, nach einer weiteren Inkubation von 3 min bei 25°C, 5 µM CAT (Carboxy-atractalysid) zugesetzt. Oligomycin hemmt die mitochondriale ATPase, CAT hemmt irreversibel den ADP/ATP-Carrier. Nach erneuter Inkubation von 3 min bei 25°C wurden 2 mM NADH zugegeben, nach weiteren 3 min bei 25°C 1 mM ATP. Die Probe wurde nochmals 3 min bei 25°C, dann 2 min auf Eis inkubiert.

2.3.10 Steigerung des Membranpotentials

Um $\Delta\psi$ z.B. für den Import von Präproteinen zu erhöhen, wurde zu dem entsprechenden Ansatz 5 mM NADH, 2.5 mM ATP, 10 mM Creatinphosphat und 10 mg/ml Creatinkinase hinzugefügt und für 1-3 min bei 25 °C inkubiert.

2.3.11 Depletion des Membranpotentials

Um die Auswirkungen der Depletion des Membranpotentials ($\Delta\psi$) auf den Proteinimport zu untersuchen, wurde $\Delta\psi$ durch Vorbehandlung der Mitochondrien mit einer einzelnen oder einer Kombination der folgenden Substanzen [65] in irreversibler Weise zerstört:

- Valinomycin:
  Kalionophor (Abbildung 8) 1 µM Endkonzentration
- FCCP:
  (Carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon), Protonophor, 25 µM Endkonzentration
- CCCP:
  (Carbonylcyanid–m–Chlorophenylhydrazon), Protonophor, 50 µM Endkonzentration

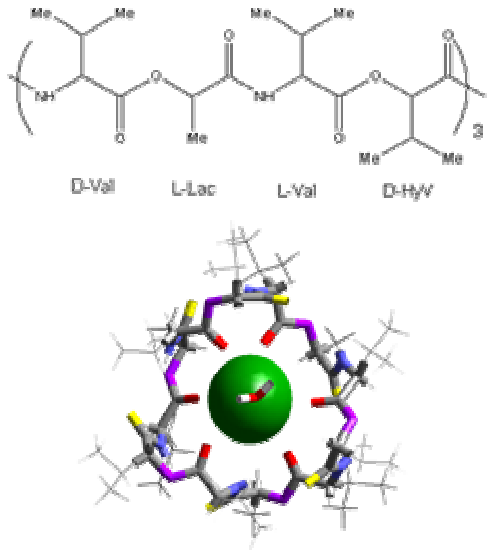


Abb. 8: **Valinomycin** aus *Streptomyces fulvissimus*
Valinomycin ist ein Dodecadepsipeptid aus zwölf sich abwechselnden Aminosäuren und Hydroxysäuren, das ein makrozyklisches Molekül formt, in dessen Mitte ein K^+ eingeschlossen werden kann (grün). Es weist Kalium gegenüber eine deutlich höhere Spezifität auf als gegenüber Natrium. Durch seine Fähigkeit in geschlossenem Zustand die Innenmembran ungehindert zu durchqueren ist es als Entkoppler für das mitochondriale Membranpotential einsetzbar. (D-Val/L-Val: Enantiomere des Valins; D-HyV: D-Hydroxyvalerinsäure; L-Lac: L-Buttersäure)

Dazu wurden der Reaktionsansatz für Proteinimport (2.3.8) mit 50-100 µg Mitochondrien, der jedoch kein NADH enthielt, mit den Substanzen entsprechend der Endkonzentration und 80 mM KCl für 5 min bei 4°C vorinkubiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Proteinsynthetische Methoden

2.4.1.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Radioaktiv markierter Vorstufenproteinen wurden durch *in vitro* Transkription ihrer klonierten Gene und anschließender Translation hergestellt. Die Transkription folgte im wesentlichen der Beschreibung von Melton [121], modifiziert wurde die Methode nach Stueber [177] und Sambrook [156].

Für die *in vitro* Transkription wurden pGem4-Plasmide verwendet, die die kodierende Sequenz des jeweiligen Vorstufenproteins unter Kontrolle des SP6-Promotors enthielten. Die Plasmide wurden durch Maxi- oder Minipräparation aus *E. coli* gewonnen (2.1.3). Der Transkriptionsansatz bestand aus 120 µl Prämix (40 mM HEPES/KOH pH 7.4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 100 µM GTP, je 500 µM ATP, CTP, UTP), 10-20 µg Plasmid, 250 µM 7mG(5')ppp(5')G, 200 U RNAsin, 50 U SP6 Polymerase und ad 200 µl H_20. Der Transkriptionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend die synthetisierte RNS durch die Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl und 3 Volumen Ethanol für mindestens 30 min bei -20 °C ausgefällt. Die RNS wurde für 15 min abzentrifugiert (15000 rpm, Sigma-Rotor 12154, 4°C) und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die RNS in 100 µl Wasser aufgenommen, mit 0.5 U/µl RNAsin versetzt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung in der Translationsreaktion aufbewahrt.

Die Translation der *in vitro* synthetisierten RNS folgte im wesentlichen der Beschreibung von Pelham und Jackson [139]. RNS wurde dabei unter Verwendung von [^{35}S]-Methionin in Retikulozytenlysat aus Kaninchen (Promega) translatiert. Der Reaktionsansatz (150 µl) enthielt 100 µl Lysat, 25 µl RNS, 3 µl Aminosäuremischung (je 1 mM proteinogene Aminosäure ohne Methionin; Promega), 40 U RNAsin, 12 µl [^{35}S]-Methionin (14.2 µCi/µl). Die Translation erfolgte für 1 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Ansätze mit 12 µl nicht-radioaktivem Methionin (60 mM) und 24 µl Saccharose (1.5 M) versetzt und für weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. In einem Reinigungsschritt wurde der Ansatz zentrifugiert (45000 rpm, Rotor TLA 45, 4°C). Der Überstand des Translationsansatzes wurde anschließend zu je 10 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.1.2 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Dazu wurden die entsprechenden Plasmide in den *E.coli*-Stamm XL1-blue transformiert (2.1.6.1) und jeweils ein positiver Klon über Nacht in LB_{amp}-Medium bei 37 °C aufgezogen. Die Vorkultur wurde mit frischem LB_{amp}-Medium auf eine OD_{578} von 0.05 verdünnt und 400 ml der *E.coli*-Kultur bei 24 °C bis zu einer OD_{578} von 0.5 inkubiert. Durch die Zugabe von 2 mM IPTG zu dem Medium wurde die Expression der Fusionsproteine induziert, die unter der Kontrolle des lac-Promotors standen. Nach einer Inkubation für 2 h bei 24 °C wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (4000 rpm, Beckmann JA10-Rotor) und bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Proteinreaktive Methoden

2.4.2.1 Kovalente Kopplung von Proteinen an BrCN-aktivierter Sepharose

Zur Herstellung einer Antigensäule für Affinitätsreinigung von Immunseren wurden Proteine oder Peptide an BrCN-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gebunden [61]. Die Proteine wurden aus *E.coli*-Einschlußkörperchen gewonnen und harnstoffdenaturiert oder es wurden synthetische Peptide verwendet. Zur Kopplung harnstoffdenaturierter Proteine, wurden 15 mg des Proteins mit TCA gefällt (2.4.3.2). Das Proteinpellet wurde 5 mal mit 6% TCA-Lösung versetzt und für jeweils 15 min abzentrifugiert (15000 rpm, Beckmann JA18.1-Rotor, 4°C). Anschließend wurde das Proteinpellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, in 2 ml 10% SDS resuspendiert und mit 2 ml 200 mM $NaHCO_3$, pH 8.3, versetzt.
Für die Kopplung von synthetischen Peptiden wurde 1 mg des Peptids in 2 ml 10% SDS gelöst und mit 2 ml 200 mM $NaHCO_3$, pH 8.3, verdünnt.
Zur Vorbereitung wurde die BrCN-Sepharose durch 15 min Quellen in 1 mM HCl und anschließendem Waschen mit 1 mM HCl und zweimaligem Waschen mit 2% SDS, 100 mM $NaHCO_3$, pH 8.3 aktiviert. Anschließend wurde die Protein- oder Peptidlösung zu der aktivierten Sepharose zugegeben, mit 4 ml 2% SDS, 100 mM $NaHCO_3$, pH 8.3, versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplung wurde durch 2 h Inkubation mit 100 mM Glycin, pH 8.0, beendet. Das nicht kovalent an die Sepharose gebundene Antigen wurde durch viermaliges Waschen mit 15 ml 500 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 4.0, und durch viermaliges Waschen mit 15 ml 500 mM NaCl, 100 mM $NaHCO_3$ pH 8.3, entfernt. Die Sepharose wurde in eine Säule überführt und unter TBS/0.02% NaN_3 bei 4°C gelagert.

2.4.2.2 Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Quervernetzungsreaktionen verbinden benachbarte Proteine kovalent über spezifische Seitenketten oder Gruppen. Mit dieser Methode ließen sich native Proteininteraktionen nachweisen. Es wurden DSG (Disuccimidylglutarat; Pierce), MBS (m-Maleimidobenzyl-N-Hydroxysuccinimidester; Pierce) und DPDPB (1,4-di(3´-2´-pyridyldithio-(propionamido)-butane; Pierce) als Quervernetzungsreagenz verwendet. Die Substanzen können durch die mitochondrialen Membranen diffundieren. DSG erlaubt eine Vernetzung benachbarter Proteine über freie Aminogruppen und DPDPB bewirkt eine kovalente Verknüpfung benachbarter Proteine über Cysteinreste. Das bifunktionelle Quervernetzungsreagenz MBS bewirkt die Verknüpfung von Cysteinresten mit Lysinresten benachbarter Proteine. Zur Durchführung wurde das Quervernetzungsreagenz aus einer 20mM Stammlösung in DMSO zu einer Endkonzentration von 200µM dem Reaktionsansatz zugegeben. Nach Inkubation bei 4°C für 1h wurde die Vernetzungsreaktion durch die Zugabe von Glycin 0.1M (pH 8.0) beendet. Die Proben wurden für 10 min zentrifugiert (15000 rpm, Beckmann JA18.1-Rotor, 4°C) und mit HS/Glycin (5 µM)-Puffer gewaschen. Anschließend konnte das Pellet zur Analyse über SDS-PAGE (2.4.3.3), Transferierung auf Nitrocellulose (2.4.3.5) und Westerblot (2.5.4) in 15 µl Auftragspuffer aufgenommen werden.

2.4.2.3 Kopplung synthetischer Peptide an Ovalbumin

Um Antiseren gegen synthetische Oligopeptide zu gewinnen, mußten diese an ein Trägerprotein gekoppelt werden [123]. Die Peptidsequenz aus dem zu untersuchenden Proteine enthielt am N-Terminus ein zusätzliches Cystein. Die Sulfhydrylgruppe dieses Cysteins ermöglichte die Kopplung an das Trägerprotein. Als Trägerprotein wurde maleimid-aktiviertes Ovalbumin (Pierce) verwendet.

Zur Durchführung wurden 2 mg des jeweiligen Peptids in 200 µl einer 50 mM K-Phosphat-Pufferlösung, pH 7.2, gelöst. 2 mg maleimid-aktiviertes Ovalbumin wurden in 200 µl Wasser aufgenommen und mit der Peptidlösung für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Konjugat auf eine PD10-Gelfiltrationssäule aufgetragen, mit einem 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2, 100 mM NaCl eluiert und 10 Fraktionen mit je 0.5 ml gesammelt. Die Fraktionen, die das Konjugat enthielten, wurden durch photometrische Proteinbestimmung (2.4.3.1) ermittelt, vereinigt und in 200 µg Portionen bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Proteinanalytische Methoden

2.4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford [17] beschriebenen Methode mit dem Proteinassay der Firma BioRad durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 an Proteine, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Das Farbstoff-Konzentrat wurde 1:5 verdünnt und mit den Proben vermischt. Nach einer Inkubation für 5-10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration erstellt. Als Proteinstandard wurde IgG aus Rind (Biorad) verwendet.

2.4.3.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Um Proteine aus einem größeren Volumen auszufällen, wurde 12% (w/v) TCA zu den Proben gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die denaturierten Proteine für 10 min abzentrifugiert (15000 rpm, Sigma 12154-Rotor, 4°C). Nach Waschen des Pellets mit -20°C kaltem Aceton, wurde es bei 37 °C getrocknet und in Auftragspuffer aufgenommen.

2.4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt [98]. Es wurden zwei verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet. Bei Minigelapparaturen der Firma Biorad hatten die Sammelgele eine Abmessung von 5 x 72 x 0,75 mm und das Trenngel von 55 x 72 x 0,75 mm. Bei den Standardgelen hatten das Sammelgel eine Größe von

10 x 150 x 0,8 mm, das Trenngel 90 x 150 x 0,8 mm und das Sammelgel 10 x 150 x 0,8 mm. Um Gele mit unterschiedlichen Trennungseigenschaften zu erhalten, wurden je nach Größe der zu trennenden Proteine verschiedene Konzentrationen von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid verwendet.

Die Gellösungen hatten folgende Zusammensetzung :

Zur Trennung von Proteinen mit mehr als 14 kDa:

Sammelgel: 5% (w/v) Acrylamid, 0.09% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED

Trenngel: 10-16% (w/v) Acrylamid, 0.2% bzw. 0.6% (w/v) Bisacrylamid, 380 mM Tris/HCl, pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED

Bodengel: 2% Agar

Zur Trennung von Proteinen mit weniger als 14 kDa:

Sammelgel: 6.6% (w/v) Acrylamid, 0.09% (w/v) Bisacrylamid, 50% (w/v) Harnstoff, 160 mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.14% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED

Trenngel: 27% (w/v) Acrylamid, 0.35% (w/v) Bisacrylamid, 50% (w/v) Harnstoff, 1 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.14% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED

Bodengel: 2% Agar

Die Proben wurden in Auftragspuffer gelöst (2 % SDS, 5 % (v/v) ß-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0.02 % Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl, pH 6.8), für 3 min auf 95°C erhitzt und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Elektrophoresepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 384 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS) in vertikalen Kammern durchgeführt. Standardgele liefen mit konstant 27 mA und die Minigele mit konstant 25 mA. Als Größenreferenz dienten Proteinstandards (MMW, LMW, HMW) der Firma Boehringer. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose transferiert (2.4.3.5) oder mit Coomassie Blau (2.4.3.4) angefärbt.

2.4.3.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um getrennte Proteine nach der SDS-PAGE durch Anfärben sichtbar zu machen, wurde das Gel mit 0.1% Coomassie-Brilliant-Blue R-250 in 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure für 30 min bewegt. Der Farbhintergrund wurde anschließend im Entfärbungsbad (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) für 1h herausgewaschen. Die Trocknung der

Gele erfolgte entweder unter Vakuum für 2-3h bei 80°C auf Whatman-Papier oder über Nacht bei RT zwischen zwei Trockenfolien.

2.4.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (2.4.3.3) wurden die Proteine nach der Methode von Towbin [183] und Kyhse-Anderson [96] auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer Nitrozellulosemembran zwischen mehrere mit Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0.08% SDS) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und diese zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet (Semi-dry-Methode). Die Proteine wurden für 1.5 h bei 200 mA auf die Nitrozellulose übertragen. Die Proteine wurden mit Ponceau S (0.2% (w/v) in 3% (w/v) TCA) angefärbt und die Membran unter Rotlicht getrocknet. Nach anschießendem Waschen wurden bestimmte Proteine durch Immundekoration (2.5.4) nachgewiesen.

2.4.3.6 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Fuji New RX, Kodak BioMax MR, Kodak XR5) dem entfärbten und getrocknetem Polyacrylamidgel oder der getrocknet Nitrocellulosemembran direkt exponiert.

2.4.3.7 Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine

Zur Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wurden diese mittels SDS-PAGE (2.4.3.3) aufgetrennt. Nach der Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau (2.4.3.4) und anschießendem Trocknen wurden diese mit Hilfe eines Phosphorimaging-Systems (Fuji) analysiert. Dabei wird eine Imageplate mit einer Strahlungssensitiven Phosphorbeschichtung dem Gel für 24h exponiert. Danach erfolgt in das Auslesen der Platte im Phosphorimager. Mit einer spezialisierten Software kann dann die Quantifizierung der markierten Proteine erfolgen.

2.4.3.8 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration wurde das apparente Molekulargewicht von Proteinen und Proteinkomplexen analysiert. Dabei werden Mitochondrien solubilisiert um die Membranen zu eröffnen. Die löslichen Proteinkomplexe werden dann über eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (25 ml Säulenvolumen; Pharmacia) aufgetrennt. Zunächst wurde die Filtrationssäule mit 150 ml Laufpuffer (2.5% Glycerin, 150 mM KCl, 1% Triton, 30 mM HEPES pH 7.2) äquilibriert. Dann erfolgte die Solubilisierung der Mitochondrien (2.5 mg) in 520 µl Lysepuffer (2.5% Glycerin, 150 mM KCl, 3% Digitonin, 30 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 10 µM Zinkacetat, 1 mM PMSF, 52 µg α_2MG, 0.5 µg Aprotinin, 0.5 µg Leupeptin). Nach Inkubation für 10 min bei 4°C

wurde der Ansatz 30 min zentrifugiert (45000 rpm, Beckman TLA45-Rotor, 4°C). Das Solubilisat konnte dann auf die Filtrationssäule aufgetragen werden. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flußrate des Laufpuffers von 0.2 ml/min. Die gesammelten Fraktionen (je 0.5 ml) wurden mit TCA präzipitiert (2.4.3.2), durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3.3) und nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose mittels Immundekoration (2.5.4) oder Autoradiographie (2.4.3.6) analysiert.
Die Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte mit den Markerproteinen Thyroglobulin (66.9 kDa), ß-Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase aus *S.c.* (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und der Carboanhydrase aus Rindererythrozyten (29 kDa), die in einem separaten Säulenlauf untersucht wurden.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren aus Kaninchen

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen mit Antigenen immunisiert. Nach 10-14 Tagen konnten aus dem Serum Antikörper gegen das Hapten gewonnen werden. Als Antigene wurden entweder synthetische Oligopeptide verwendet, die zuvor an Trägerproteine gekoppelt wurden (2.4.2.3), oder es wurden rekombinante Proteine verwendet, die in *E.coli* exprimiert wurden (2.4.1.2). 200 µl der Antigenlösung (Peptide gekoppelt an Trägerproteine oder rekombinante Proteine) wurden für die Erstinjektion mit 200 µl TITERMAX™ versetzt. Für die nachfolgenden Injektionen, die jeweils im Abstand von 4-6 Wochen erfolgten, wurde 200 µl Antigenlösung mit 200 µl Freundschen Adjuvans (inkomplett) vermischt. Die Injektion des Antigens erfolgte subkutan nahe der Lymphknoten in der Achselregion der Kaninchen. Das Kaninchen wurde zunächst zweimal in Folge immunisiert. 10 Tage nach der Zweitinjektion bzw. nach jeder Folgeinjektion wurden aus der Ohrvene des Kaninchens 20-30 ml Blut entnommen und zur Gerinnung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Serum durch zwei Zentrifugationsschritte (3500 g, 5 min, Heraeus Bactifuge und 12000 g, 15 min, Beckmann JA20-Rotor) von Erythrocyten und vom Blutkuchen gereinigt. Das Komplementsystem wurde durch Inkubation bei 56°C für 20 min inaktiviert. Abschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Aus Seren, deren Antigenerkennung zu unspezifisch oder zu schwach war, konnten antigenspezifischen Antikörper mit Hilfe der Affinitätsreinigung angereichert werden. Dazu wurde das Serum über eine Antigensäule aufgereinigt. Zur Herstellung der Affinitätssäule wurde das synthetische Peptid, gegen das die Antikörper gerichtet sind, an BrCN-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt (2.4.2.1). Die Affinitätsreinigung erfolgte nach der modifizierten Methode von Harlow und Lane (1988) [61].

Als ersten Schritt wurde die Affinitätssäule mit folgenden Puffern gewaschen:

10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7.5
10 Säulenvolumen 100 mM Glycin/HCl, pH 2.5
10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 8.8
10 Säulenvolumen 100 mM Natriumphosphat, pH 11.5
10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7.5

Dann wurden 6 ml des Antiserums mit 25 ml TBS (0.9 % (w/v) NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) verdünnt und mit Proteaseinhibitoren versetzt (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5 mM *o*-Phenanthrolin, 1 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Aprotinin). Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wurde das verdünnte Serum dreimal mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Affinitätssäule wieder gewaschen:

20 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7.5
20 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl
10 Säulenvolumen 100 mM Zitronensäure/NaOH, pH 4.0

Für die Elution erfolgten zuerst 10 Schritte mit Zugabe von jeweils 1 ml 100 mM Glycin/HCl, pH 2.5. Anschließend 10 Schritte mit Zugabe von 1 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11.5. Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen in vorbereitete Reaktionsgefäßen aufgefangen, die 120 µl 1M Tris (Base) für die Glycinelution bzw. 100 µl 1 M Glycin, pH 2.5 für die Phosphatelution enthielten. Dieses Vorgehen erleichterte die anschließende Neutralisation der Eluate. Mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.3.3) und anschließender Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie (2.4.3.4) wurden die antikörperhaltigen Fraktionen ermittelten, vereinigt und direkt für Immunfällungen (2.5.3) oder Immundekorationen (2.5.4) verwendet.
Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, gewaschen und unter TBS/ und 0.02% Na-Azid bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Immunfällungen

2.5.3.1 Prinzip und Durchführung

Immunfällungen wurden mit Protein A-Sepharose Beads (PAS-Beads; Pharmacia) durchgeführt, da sie eine hohe Affinität für IgG besitzen und sich leicht sedimentieren lassen. Alle Schritte wurden bei Kühlung auf 4°C vorgenommen. Zur Vorbereitung der PAS-Beads wurden 30 µl Beads dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 15 µl Serum bzw. 100 µl affinitätsgereinigter Antikörper (2.5.2) in 1 ml TBS verdünnt. Die Bindung der Antikörper an die Beads erfolgte durch Versetzten mit der Antikörperlösung und Inkubation im Überkopfschüttler für 60 min bei 4°C. Durch zwei Waschschritte mit je 1 ml TBS wurden die IgGs entfernten, die nicht an die PAS gebunden waren. Ein dritter Waschschritt erfolgte mit der gleichen Pufferlösung, die auch bei der anschließenden Immunfällung verwendet wurde. Die gewaschenen PAS-Beads wurden mit 1 ml der Probe zur Coimmunfällungen (2.5.3.2),

Immunfällung von Quervernetzungsprodukten (2.5.3.3) oder Immunfällungen für Quantifizierungsexperimente (2.5.3.4) versetzt und für 2 h bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (14000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, 4°C) und dreimal mit Pufferlösung gewaschen. Nach dem zweiten Waschschritt wurde das Reaktionsgefäß gewechselt, um unspezifisch an das Eppendorfgefäß haftendes Probenmaterial abzutrennen. Zur Elution der Proteine wurden die Proben mit 20-30 µl Auftragspuffer versetzt, 5-15 min bei 4°C geschüttelt und für 3 min bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden mit SDS-PAGE (2.4.3.3) weiter untersucht.

2.5.3.2 Coimmunfällungen

Bei Coimmunfällungen wird die Interaktion von Proteinkomplexen untersucht. An PAS-Beads gekoppelte Antikörper binden einen der Interaktionspartner des Komplexes. Durch die Bindung der Komplexkomponenten untereinander werden auch die weitern interagierenden Proteine an den Beads gebunden. In der Durchführung wurden Mitochondrien mit Solubilisierungspuffer (30 mM HEPES/KOH pH 7.4, 150 mM Kaliumacetat, pH 7.4, 1 mM PMSF) auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt und mit 3% Digitonin für 30 min bei 4°C solubilisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation zur Abtrennung des nicht solubilisierten Materials (45000 rpm, 30 min, Beckman-TLA45-Rotor, 4°C). Der Überstand enthielt das Solubilisat und wurde zu den gewaschenen, mit Antikörpern beladenen PAS-Beads gegeben.

2.5.3.3 Immunfällung von Quervernetzungsprodukten

Die Isolierung mitochondrialer Quervernetzungsprodukte erfolgte durch Immunfällung. Nach der Quervernetzungsreaktion (2.5.3.3) wurde das Mitochondrienpellet in 60 µl SDS-Puffer (1% SDS, 0.1 M Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM PMSF, 1/20 Volumen Auftragspuffer) aufgenommen, 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt und für 3 min bei 95 °C aufgekocht. Das Solubilisat wurde anschließend mit dem 20fachen Volumen TBS/0.5% Triton X-100 verdünnt und für 30 min zentrifugiert (45000 rpm, Beckmann TLA45-Rotor, 4°C). 10% des Überstands wurden mit TCA gefällt und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Der restliche Überstand wurde auf die vorbereitete Antikörpergebundene Protein A-Sepharose gegeben.

2.5.3.4 Immunfällungen für Quantifizierungsexperimente

Für die Quantifizierung einzelner mitochondrialer Proteine wurden [^{35}S]-markierte Mitochondrien (2.3.2) verwendet. Die Lyse der Mitochondrien erfolgte mit Solubilisierungspuffer (3% Digitonin, 30 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 150 mM Kaliumacetat, pH 7.4, 1 mM PMSF) auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation (45000 rpm, 30 min, Beckman-TLA45-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde mit den vorbereiteten PAS-Beads gemischt.

2.5.4 Immuno-Blot-Verfahren

Der immunologische Nachweis von Proteinen, die unter Verwendung der SDS-PAGE (2.4.3.3) aufgetrennt und mit Western-Blotting (2.5.4) auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert wurden, erfolgte durch Immundekoration. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran mit den darauf übertragenen Proteinen für 30 min bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Immundekoration erfolgte für 1-24 h mit spezifischen Antiseren, die je nach Affinität des Antikörpers 1:100 bis 1:5000 mit 5% (w/v) Milchpulver/TBS, pH 7.4 verdünnt wurden. Die Membran wurde dann für je 5 min mit TBS, TBS/0.05% Triton-X-100 und TBS gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der in einer Verdünnung von 1:10000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBS eingesetzt wurde. Dieser Antikörper war ein Konjugat aus Meerrettich-Peroxidase und anti-Kaninchen-IgG aus Ziege. Nach 30 min Inkubation wurde die Nitrocellulose-Membran wiederum gewaschen (TBS, TBS/0.05% Triton-X-100 und TBS) und mit den Luminol-Reagenzien (ECL, Amersham) versetzt. Zur Fixierung der Chemolumineszenzreaktion wurden ein Röntgenfilm (Fuji NewRX) der Membran exponiert.

Für die Immundekoration von Tim9, Tim10 und Tim13 wurde die Nitrocellulosemembran in einer TBS/0.05% Tween 20-Lösung geschüttelt, die 2% BSA enthielt. Für die Immundekoration und die nachfolgenden Waschschritte wurden eine TBS/0.05% Tween 20-Lösung verwendet.

2.6 Datenverarbeitungstechnische Methoden

2.6.1 Anlegen einer lokalen Genom-Datenbank

2.6.1.1 Lokale Genom Datenbank

Die Suche nach neuen Sequenzen erfolgte im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae.* Dazu wurden bestimmte Bereiche des Genoms auf neue offene Leserahmen (open reading frame; ORF) hin überprüft. Einige Datenbankenserver (z.B. MIPS, Sanger-Center, NCBI), die die vollständigen Sequenzen des Hefegenoms enthielten, boten Dienste über das Internet an, die es erlaubten spezifizierte Genomfragmente abzufragen. Aufträge für diese Dienste setzten eine funktionierende Internetanbindung voraus und waren oft langsam durch eine zu hohe Netzwerkauslastung. Deshalb war es nötig eine lokale Datenbank mit den chromosomalen Sequenzen der Hefe anzulegen. Die Daten konnten dann auch in dem für den Suchalgorithmus optimierten Format gespeichert werden. Dazu wurden die vollständigen chromosomalen Sequenzen (contig-Sequenzen) aller 16 Chromosome über den FTP-Server aus der MIPS-Datenbank (Martinsried Institute for Protein Sequences, url: ftp://ftp.mips.embnet.org/pub/yeast/) geladen und als ASCII-plain-text in 16 Dateien („`CHR1.DAT`“ – „`CHR16.DAT`“) gespeichert. Jede dieser Dateien enthielt die Basensequenz eines Chromatids der Hefe, der im

folgenden als der w-Strand bezeichnet wird. Innerhalb dieser lokalen Dateien wird die Suche durchgeführt. Um während der Suchprozedur die Rechenzeit zu reduzieren, sollte der komplementäre Strang (c-Strand) nicht zur Laufzeit gebildet werden müssen. Deshalb wurde von jeder der 16 w-Strang-Dateien der zugehörige revers-komplementäre Strang gebildet und in einer zusätzlichen Datei („CHR17.DAT“ – „CHR32.DAT“), als virtuelles Chromatid, abgelegt. Damit wurde innerhalb dieser 32 Dateien in Standard-Leserichtung nach passenden Sequenzen gesucht und eine aufwendige ständige Neubildung des c-Stranges zur Zeit der Programmausführung vermieden.

w-Strand	
Dateiname	**Größe (bp)**
CHR1.DAT	230.203
CHR2.DAT	813.139
CHR3.DAT	315.350
CHR4.DAT	1.531.929
CHR5.DAT	576.870
CHR6.DAT	270.148
CHR7.DAT	1.090.936
CHR8.DAT	562.638
CHR9.DAT	439.885
CHR10.DAT	745.440
CHR11.DAT	666.445
CHR12.DAT	1.078.173
CHR13.DAT	924.430
CHR14.DAT	784.328
CHR15.DAT	1.091.284
CHR16.DAT	948.061

c-Strand	
Dateiname	**Größe (bp)**
CHR17.DAT	230.203
CHR18.DAT	813.139
CHR19.DAT	315.350
CHR20.DAT	1.531.929
CHR21.DAT	576.870
CHR22.DAT	270.148
CHR23.DAT	1.090.936
CHR24.DAT	562.638
CHR25.DAT	439.885
CHR26.DAT	745.440
CHR27.DAT	666.445
CHR28.DAT	1.078.173
CHR29.DAT	924.430
CHR30.DAT	784.328
CHR31.DAT	1.091.284
CHR32.DAT	948.061

Abb. 9: **Sequenzdateien für 16 Chromosome in jeweils zwei Leserichtungen**

2.6.1.2 Lokale brief-ID Datenbank

Jeder neu gefundene ORF sollte mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken verglichen werden, um Informationen über ihn und seine Funktion zu erhalten oder um bisher unbekannte ORFs als solche zu erkennen. Damit auch erst kürzlich erkannte Gene berücksichtigt werden konnten, mußte die Datenbank möglichst aktuell sein. Die MIPS-Datenbank wird regelmäßig aktualisiert und bietet zuverlässige Informationen, weshalb über sie die lokale Datenbank erstellt wurde. Die Datensätze der MIPS-Datenbank enthalten zu jedem bekannten ORF, unter anderen Informationen, die benötigten Kerndaten zu einem ORF: chromosomale Position, Länge und brief-ID mit Funktion des Gens, strukturelle Auffälligkeiten, Verwandtschaft zu anderen Genen, usw. Um die lokale Datenbank zu erstellen, wurden zuerst die vollständigen Daten für jedes Chromosom aus der MIPS-Datenbank abgerufen. Diese Rohdaten wurden dann in einem Prozessierungsschritt (parse) weiter aufbereitet. Dabei wurden aus den Rohdaten die einzelnen Datensätze der ORFs gesucht und nach Feldern differenziert. Die gewünschten Felder (brief-ID, Länge, Position) wurden dann lokal in Listendateien gespeichert („EXTR01.TXT“ – „EXTR32.TXT“). Alle übrigen Felder und nicht benötigen Informationen,

wie z.B. datenbankspezifische Links oder statistische Angaben, wurden verworfen. Um einen schnellen Zugriff des Suchprogramms auf die Daten zu ermöglichen, wurden die Listedateien entsprechend der Position der ORFs auf dem Chromosom indiziert. Die dadurch erzeugten Indexdateien („`EXTR01.IND`“ – „`EXTR32.IND`“) enthielten die ORF-Position und den Verweis auf den zugehörigen Datensatz in der Listendatei. Sie wurden zur Zeit der Programmausführung für jedes durchsuchte Chromosom vollständig in den Speicher geladen und ermöglichten so einen schnelleren Zugriff auf die Daten über den ORF, als es über eine online-Abfrage einer Datenbank möglich gewesen wäre.

Dateiname	Größe (bytes)	Dateiname	Größe (bytes)	Dateiname	Größe (bytes)	Dateiname	Größe (bytes)
EXTR01.TXT	12.505	EXTR17.TXT	10.736	EXTR01.IND	1.144	EXTR17.IND	884
EXTR02.TXT	39.406	EXTR18.TXT	42.090	EXTR02.IND	3.744	EXTR18.IND	3.484
EXTR03.TXT	14.762	EXTR19.TXT	18.361	EXTR03.IND	1.482	EXTR19.IND	1.625
EXTR04.TXT	80.154	EXTR20.TXT	76.616	EXTR04.IND	7.306	EXTR20.IND	6.864
EXTR05.TXT	30.500	EXTR21.TXT	29.951	EXTR05.IND	2.691	EXTR21.IND	2.600
EXTR06.TXT	13.298	EXTR22.TXT	12.749	EXTR06.IND	1.274	EXTR22.IND	1.170
EXTR07.TXT	60.207	EXTR23.TXT	51.362	EXTR07.IND	5.772	EXTR23.IND	4.654
EXTR08.TXT	27.633	EXTR24.TXT	25.681	EXTR08.IND	2.561	EXTR24.IND	2.301
EXTR09.TXT	20.801	EXTR25.TXT	20.557	EXTR09.IND	1.950	EXTR25.IND	1.807
EXTR10.TXT	38.369	EXTR26.TXT	35.685	EXTR10.IND	3.380	EXTR26.IND	3.133
EXTR11.TXT	31.720	EXTR27.TXT	28.914	EXTR11.IND	2.626	EXTR27.IND	2.405
EXTR12.TXT	49.166	EXTR28.TXT	53.436	EXTR12.IND	4.511	EXTR28.IND	5.083
EXTR13.TXT	44.591	EXTR29.TXT	45.384	EXTR13.IND	3.835	EXTR29.IND	3.887
EXTR14.TXT	41.236	EXTR30.TXT	36.417	EXTR14.IND	3.627	EXTR30.IND	3.172
EXTR15.TXT	55.632	EXTR31.TXT	50.874	EXTR15.IND	5.096	EXTR31.IND	4.407
EXTR16.TXT	47.580	EXTR32.TXT	44.713	EXTR16.IND	4.134	EXTR32.IND	4.017

Abb. 10**: Bief-ID Datenbank**
In den Listendateien (EXTR*xx*.TXT) sind Beschreibungen (z.B. Genposition, Länge und brief-ID mit Funktion des Gens, strukturelle Auffälligkeiten, Verwandtschaft zu anderen Genen) für bekannte ORFs gespeichert. Die Index-Dateien (EXTR*xx*.IND) ermöglichen das schnelle Auffinden der Informationen über die Position des Gens auf dem Chromosom.

2.6.2 Entwicklung des Suchprogramms

Für die Suche nach neuen Sequenzen wurde ein Computerprogramm eingesetzt, das den sequenzierten Chromosomensatz der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auch auf Sequenzen hin überprüft, die trotz zahlreicher bereits durchgeführter Suchen nach neuen ORFs noch nicht erkannt worden sind.
Viele Datenbanken bieten bereits Suchoptionen für das Hefegenom an. Jedoch kann in den meisten Fällen nicht eindeutig erkannt werden, nach welchen Kriterien ein potentieller ORF als solcher erkannt und durchsucht wurde. Manche Suchalgorithmen erkennen kleine ORFs mit unter 150 bp nicht als potentielle Gene und überspringen diese.

2.6.2.1 Anforderungen an das Programm

Zur Entwicklung des Suchalgorithmus mußten zuerst die Leistung des Programms definiert werden. Notwendig waren folgende Anforderungen:

1. *Suche im gesamten Hefegenom*
2. *Berücksichtigung überlappender Gene in allen Leserahmen und beiden Leserichtungen*
3. *Basen- und Aminosäure-Sequenz-Erkennung mit variabler Toleranz*
4. *Erkennung von Charakteristika einzelner Domänen (Ladungen, Teilladungen, Musterwiederholungen, Hydropathie)*
5. *Eingeschobene Spacerregionen variabler Breite*
6. *Abschließender Vergleich der Ergebnisse mit öffentlichen Datenbanken*
7. *Optimierung für hohe Ausführungsgeschwindigkeit*

2.6.2.2 Umsetzung der Anforderungen

2.6.2.2.1 Das Hefegenom

Die Hefe *S.c.* ist für molekularbiologische Untersuchungen in Mitochondrien sehr gut geeignet. Zum einen ist die Kultivierung der Hefe relativ unaufwendig und die Isolierung von Mitochondrien rasch möglich. Weiterhin findet kein posttranskriptionales Splicing statt und damit ist auf genomischer Ebene keine Unterscheidung zwischen Intron und Exon erforderlich. Ein bedeutender Vorteil dieser Hefe war, daß das vollständige Genom in Datenbanken zur allgemeinen Verfügung steht. Die Daten waren entweder vororganisiert als Zusammenstellung bisher identifizierter und prognostizierter Gene oder als reine chromosomale Sequenzen verfügbar. Die Verwendung von breites vororganisierten Datenbanken hatte gegenüber den vollständigen chromosomalen Sequenzen den Nachteil, daß sich in ihnen unerkannte ORFs der Suche entzogen. Die vollständige, zusammenhängende Sequenz der einzelnen Hefechromosomen, wie sie in der contig-Datenbank vorliegt, war damit notwendig um eine Suche im kompletten Chromosomensatz der Hefe zu ermöglichen.

2.6.2.2.2 Berücksichtigung überlappender Gene in allen Leserahmen und beiden Leserichtungen

Um die Sequenz eines Chromosoms nach offenen Leserahmen (ORF) zu durchsuchen, mußte der entwickelte Suchalgorithmus auf beiden DNS-Strängen lesen können und auch die Möglichkeit haben, verschachtelte und in verschiedenen Leserahmen liegende ORFs zu erkennen. Bei der Verschachtelung von ORFs liegt das Start-Codon des zweiten ORFs noch vor dem Stopp-Codon des ersten ORFs (Abbildung 11). Dabei kann der zweite ORF auch einen verschobenen Leserahmen in Bezug zum ersten ORF aufweisen.

Abb. 11: **Verschachtelte offene Leserahmen**
Innerhalb des ersten ORFs (Start-Codon grün) liegen drei weitere ORFs (rot und blau) im Leserahmen 2 und 3. Das Stopp-Codon des ersten ORFs ist mit "!!!" gekennzeichnet.

Ein erkannter ORF wurde, damit ein verschachtelt liegender zweiter ORF nicht übergangen werden konnte, ebenfalls in allen drei Leserahmen nach neuen Start-Codons durchsucht. Dazu durchsuchte der Algorithmus das Genom mit der Schrittweite einer Base.

2.6.2.2.3 Eingeschobene Spacerregionen variabler Breite

Die gesuchten Motive innerhalb einer Aminosäuresequenz konnten von Protein zu Protein in verschiedenen Abständen zueinander auftreten. Im Algorithmus wurde das mit der Einführung von Spacerregionen variabler Breite berücksichtigt. Erkennt die Suchroutine ein erfülltes Suchkriterium, dann versucht die Folgeroutine innerhalb des angegebenen Lückenbereichs alle weiteren Kriterien wiederum innerhalb deren Bereiche zu erfüllen. Dieses iterative Vorgehen ermöglichte die flexible Suche mit verschiedenen regionalen Charakteristika.

2.6.2.2.4 Vergleich der Ergebnisse mit öffentlichen Datenbanken

Die MIPS-Datenbank enthält über alle dort bekannten Gene und offenen Leserahmen Informationen, wie zum Beispiel Position auf dem Chromosom, Synonyme des ORFs, Literaturhinweise, Zugehörigkeit zu verwandten Proteinen und weitere Beschreibungen (brief-ID) usw. Um die neu gefundenen ORFs mit bekannten vergleichen zu können, wurde die Beschreibung aller in der MIPS-Datenbank enthaltenen Einträge zu ORFs und Genen von der Datenbank bezogen und in die lokale Datenbank importiert (2.6.1.2). Es wurde versucht alle Suchergebnisse über diese Datenbank zu identifizieren. Die Identifizierungsroutine verglich die aus der Suchroutine bekannte Position des ORFs auf dem Chromosom mit den Einträgen in der lokalen Datenbank. Stimmten die Längen- und Größenangaben überein, so war der ORF bereits in der MIPS-Datenbank registriert. Lag der gefundene ORF innerhalb eines anderen ORFs, oder stimmten die Länge nicht überein, so war der neu gefundenen ORF noch nicht identifiziert. Der Abschlußbericht des Programms enthielt die entsprechenden Informationen.

2.6.2.2.5 Optimierung für hohe Ausführungsgeschwindigkeit

Da für die Anwendung des Suchprogramms ein 200 MHz-Intel Pentium-Computer zur Verfügung stand, war bei der Wahl der Programmiersprache und der Prozedurarchitektur die

Optimierung der Ausführungsgeschwindigkeit wichtig. Bei der Auswahl der Programmiersprache wurde TurboPascal als eine Compilersprache, den Interpretersprachen, wie z.B. VisualBasic, vorgezogen. Compilersprachen übersetzten den Quellcode bereits vor der Laufzeit in den Maschinencode und zeigen dadurch eine deutlich höhere Ausführungsgeschwindigkeit als Interpretersprachen, die erst während der Laufzeit die Übersetzung vornehmen. TurboPascal bietet zudem noch eine bessere Strukturierbarkeit des Datenbereichs, die zusätzlich den Speicherbedarf reduziert.

2.6.2.3 Programm-Algorithmus

Der erstellte Algorithmus schloß alle gestellten Anforderungen (2.6.2.1) ein, insbesondere wurde er für die iterative Suchen bei variablen Spacerregionen optimiert.
Der Ablauf des Programms beginnt mit Definition der Suchanweisungen in Form eines Strings. Jede Suchanweisung besteht aus dem Funktionskürzel und nachfolgend den zugehörigen Parametern (Abbildung 12).

Funktion	Parameter	Beschreibung
f	(Teil-)Ladungsmuster	besondere Merkmale z.B. hydrophil, hydrophob, neg., pos. Ladung, Hydropathie innerhalb eines Bereiches
s	Basen-/Aminosäure-Sequenz (mit Platzhaltern, Multi-Basen/ -Aminosäuren)	Sequenz
h	min. Hydropathie-Grenze max. Hydropathie-Grenze Bereichsgrenzen	Hydropathie
r	min. erlaubte Wiederholungen max. erlaubte Wiederholungen Sub-Suchstring	repetitiver Bereich

Abb. 12: **Suchfunktionen mit Parametern**

Die gewünschten Sequenzdaten des Genoms werden dann in den Programmpuffer übernommen. Es wurde jeweils eines der 32 Chromatide (16 Chromosome in zwei Leserichtungen) als Dateneinheit geladen und durchsucht. Der Datenbereich wird basenweise, und damit in allen drei Leserahmen, geprüft. An jeder Stelle wird eine Suchprozedur initiiert, die versucht, ausgehend von der aktuellen Basenposition, alle nachfolgenden Kriterien des Suchstrings zu erfüllen. Ist die Prozedur erfolglos, wird an die nächste Basenposition vorgerückt und eine neue Suche gestartet.

Jede Suchprozedur testet die nachfolgende Sequenz auf das erste im Suchstring angegebene Kriterium. Wird es gefunden, versucht die Prozedur das zweite zu erfüllen usw. Sind alle Kriterien erfüllt, wird die Position und die gefundene Sequenz ausgegeben. Es erfolgt ein Vergleich mit der importierten öffentlichen Datenbank, ob ein Eintrag für diesen Gen-Locus besteht.
Kommt im Suchstring ein variabler Bereich vor, wird für jede Position dieses Bereichs eine eigene, untergeordnete Prozedur initiiert und die aktuellen Parameter zwischengespeichert. Es werden dann alle nachfolgenden Suchanweisungen in einen eigenen Suchstring übertragen und an die Subprozedur übergeben. Eine weitere Schachtelung durch nachfolgende variable Bereiche ist nach dem gleichen Prinzip möglich. Dabei wird die jeweils aktuelle Suche unterbrochen und auf dem Haldenspeicher abgelegt, bis die untergeordneten Suche beendet ist und die Ausführung wieder an die übergeordnete Ebene abgegeben wird. Bei Beendigung der Subprozedur kann dann an der gespeicherten Stelle fortgesetzt werden.
Mit der Sequenzsuche kann eine beliebige Abfolge von Basen- und Aminosäuren gefunden werden. Es ist möglich Basen und Aminosäuren kombiniert anzugeben, unterschiedliche genetische Codes zu verwenden oder nur bestimmte Kombinationen von Basen oder Aminosäuren zu erlauben. Es können Platzhalter und multiple Basen oder Aminosäuren angegeben werden. Bei der Überprüfung des Sequenzbereichs wird versucht, eine möglichst hohe Übereinstimmung der Sequenzen zu erreichen. Ist keine vollständige Übereinstimmung möglich, entscheidet ein angegebener Grenzwert der Ähnlichkeit über den Erfolg der Suche.
Die Suchfunktion nach Bereichen definierter Hydropathie errechnet einen gleitenden Durchschnitt über die Hydropathiewerte der Aminosäuren eines Leserahmens und sucht im erlaubten Bereich nach Stellen mit Hydropathiedurchschnittswerten, die in den definierten Grenzen liegen.
Eine Erweiterung der Hydropathiesuche ist die Anweisung zur Suche nach multiplen Sequenzeigenschaften. Diese Funktion prüft einen Sequenzbereich auf mögliche positive und negative Ladungen, Teilladungen und bestimmte Hydropathiewerte. Damit können Proteine mit charakteristischen Ladungsmustern oder Hydrophilizität/-phobizität erkannt werden. Auch diese Funktion arbeitet zur Berechnung der Hydropathie mit einem gleitenden Durchschnitt über eine definierte Anzahl von Aminosäuren.
Ein Schema des Suchalgorithmus und der Suchanweisungen ist in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Der bei allen durchgeführten Suchen verwendete universelle genetische Code, sowie die Tabelle der Hydropathiewerte und die Einteilung der Aminosäuren in hydrophil, hydrophob, positive Restladung und negative Restladung ist in den Abbildungen 15 und 16 angegeben.

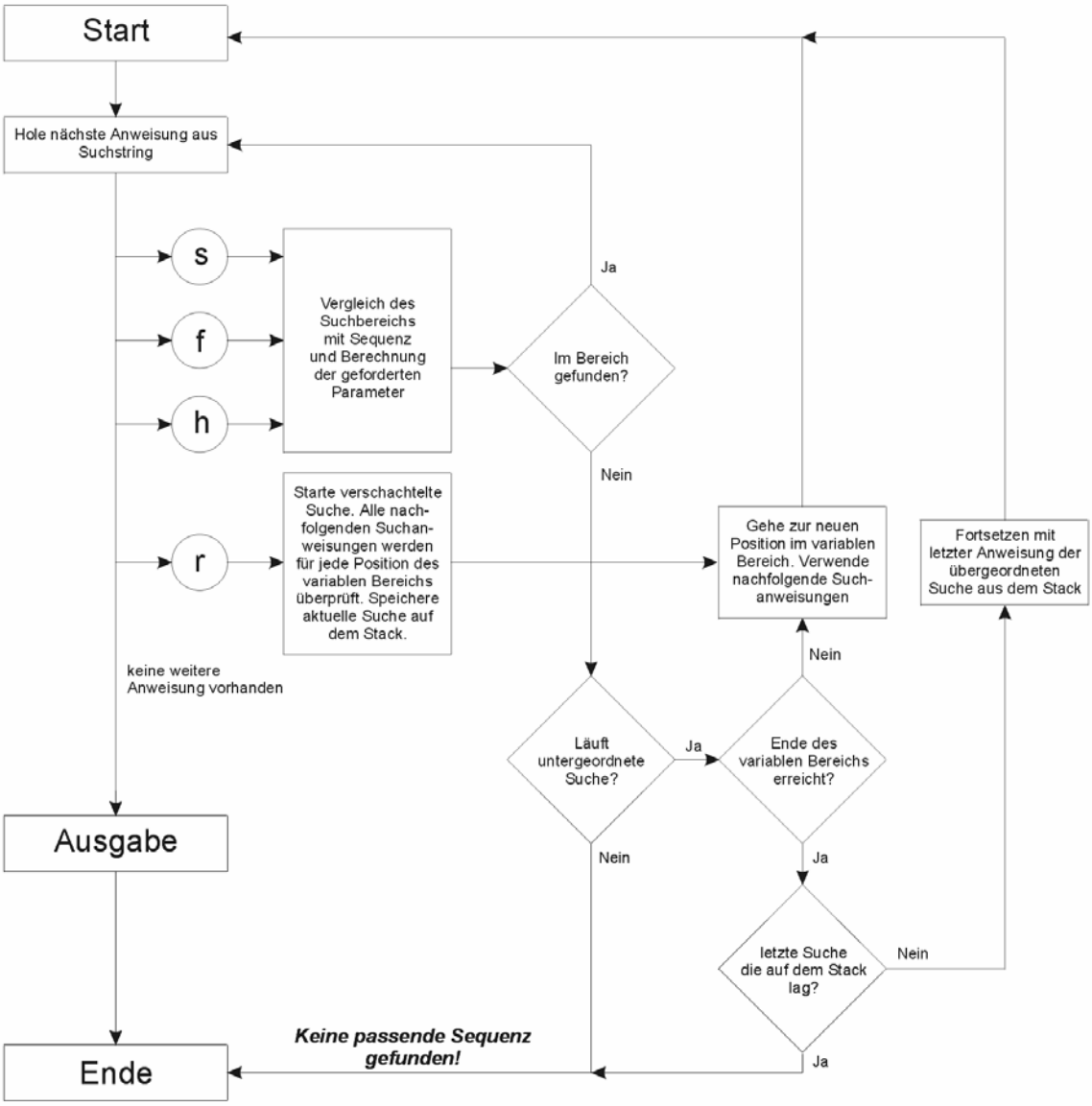


Abb. 13: **Algorithmus des Suchprogrammes**
Nach Laden der Gen- bzw. Aminosäuresequenzen aus der Datenbank in den Datenpuffer, wird für den ersten Schritt der Suche, ebenso wie bei jeder untergeordneten Suche, die erste Anweisung aus dem Suchstring gelesen. Diese Anweisungen können eine der folgenden Funktionen sein (siehe auch 2.6.2.3, Abbildung 14): **s** – Sequenzsuche, **f** – Suche nach Ladungen und Hydropathie, **h** – Suche nach Bereichen bestimmter Hydropathie und **r** – repetitive Bereiche. Der angegeben Datenbereich wird nach dem ersten Vorkommen der ersten Anweisung geprüft. Ist der Vorgang erfolgreich, wird mit der nächsten Anweisung, im direkten Anschluß an die gefundene Sequenz, fortgesetzt. Können alle Anweisungen erfolgreich abgearbeitet werden, wird die Sequenz mit Lokalisation in der Datenbank überprüft und, falls vorhanden, mit den zugehörigen Beschreibungen ausgegeben. Kann eine Anweisung innerhalb einer Suche nicht erfüllt werden, bricht die Suche erfolglos ab.
Bei Verwendung von variablen Bereichen (Anweisung **r** im Suchstring), wird für jede Position im variablen Bereich eine eigene (untergeordnete) Suche initialisiert und ein neuer, untergeordneter, Suchstring erzeugt. Alle Daten der übergeordneten Suche werden in einem Haldenspeicher (Stack) gesichert. Ist eine solche untergeordnete Suche erfolglos, kehrt die Ausführung zuerst an die übergeordnete Suche zurück und eine neue untergeodnete Suche wird an der nächsten Position des variablen Bereichs initialisiert. Erst wenn im gesamten Bereich keine gültige Sequenz gefunden wurde, wird die Suche an die nächsthöhere Ebene zurückgegeben bzw. erfolglos abgebrochen. Mit der Verwendung von Suchebenen ist eine mehrfache Verschachtelung von Ausführungen möglich und erlaubt eine hohe Variabilität der Zielsequenz.

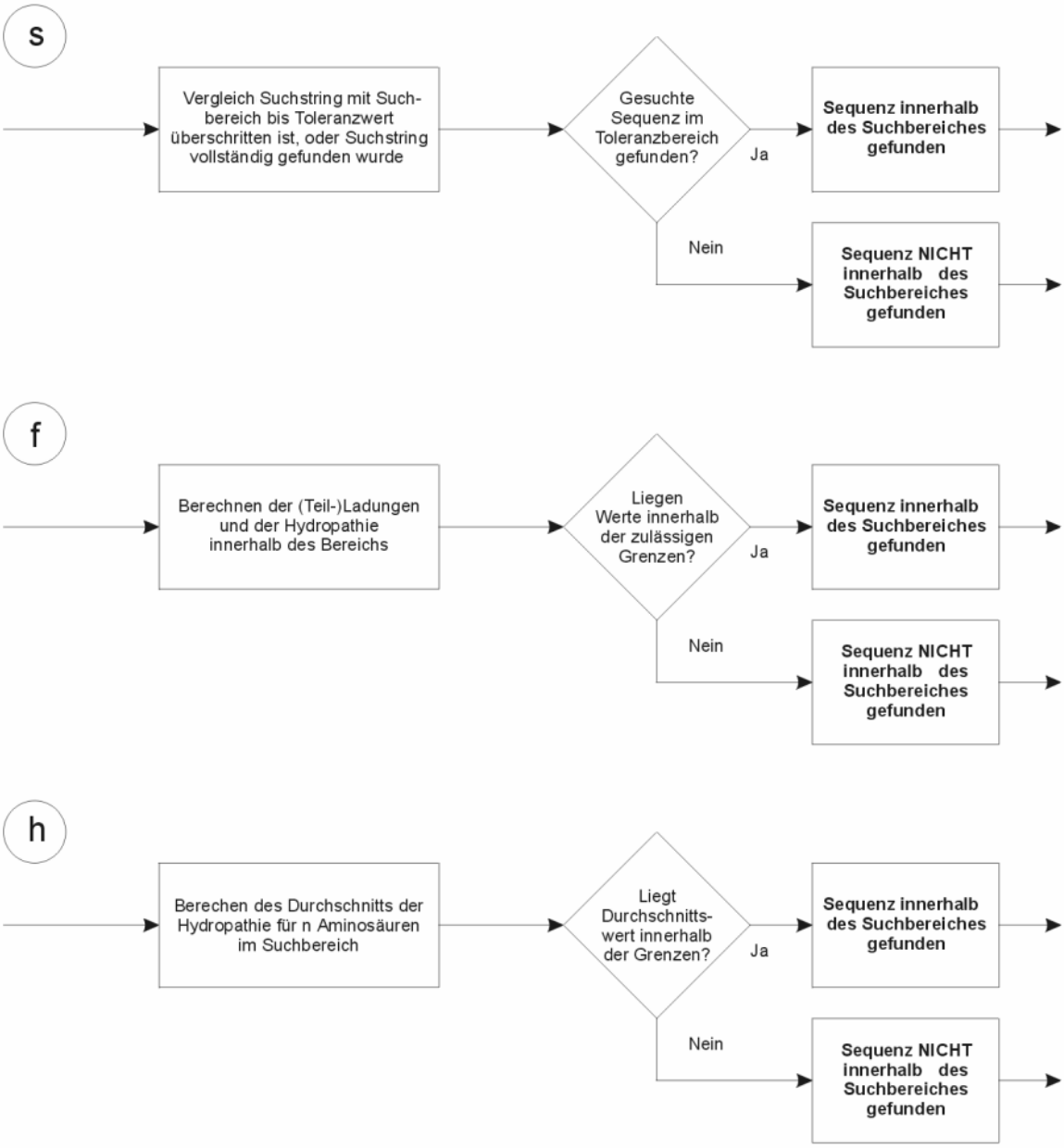


Abb. 14: **Die Suchfunktionen**
s – Sequenzsuche (Basen- oder AS-Sequenz mit wählbarem Genauigkeitsgrad, Platzhalten und Multi-Basen/-Aminosäuren)
f – Suche nach (Teil-)Ladungen und Bereichen bestimmter Hydropathie
h – Suche nach Bereichen bestimmter Hydropathie
r – repetitive Bereiche, die durch eine der vorangehenden Funktionen beschrieben werden und eine variable Größe besitzen können.

erste Stelle	dritte Stelle				zweite Stelle
	T	C	A	G	
T	TTT (F)	TTC (F)	TTA (L)	TTG (L)	T
	TCT (S)	TCC (S)	TCA (S)	TCG (S)	C
	TAT (Y)	TAC (Y)	TAA (!)	TAG (!)	A
	TGT (C)	TGC (C)	TGA (!)	TGG (W)	G
C	CTT (L)	CTC (L)	CTA (L)	CTG (L)	T
	CCT (P)	CCC (P)	CCA (P)	CCG (P)	C
	CAT (H)	CAC (H)	CAA (Q)	CAG (Q)	A
	CGT (R)	CGC (R)	CGA (R)	CGG (R)	G
A	ATT (I)	ATC (I)	ATA (I)	ATG (M)	T
	ACT (T)	ACC (T)	ACA (T)	ACG (T)	C
	AAT (N)	AAC (N)	AAA (K)	AAG (K)	A
	AGT (S)	AGC (S)	AGA (R)	AGG (R)	G
G	GTT (V)	GTC (V)	GTA (V)	GTG (V)	T
	GCT (A)	GCC (A)	GCA (A)	GCG (A)	C
	GAT (D)	GAC (D)	GAA (E)	GAG (E)	A
	GGT (G)	GGC (G)	GGA (G)	GGG (G)	G

Abb. 15: **Genetischer Code**
Die verwendete Übersetzungstabelle für Basentripletts entspricht dem universellen genetischen Code.

Aminosäure	Hydro-pathie	polar (P) / unpolar (U)	Ladung
Ile	4.5	U	0
Val	4.2	U	0
Leu	3.8	U	0
Phe	2.8	U	0
Cys	2.5	P	0
Met	1.9	U	0
Ala	1.8	U	0
Gly	-0.4	U	0
Thr	-0.7	P	0
Ser	-0.8	P	0
Trp	-0.9	U	0
Tyr	-1.3	P	0
Pro	-1.6	U	0
His	-3.2	P	0
Glu	-3.5	P	-
Gln	-3.5	P	0
Asp	-3.5	P	-
Asn	-3.5	P	0
Lys	-3.9	P	+
Arg	-4.5	P	+

Abb. 16: **Tabelle der verwendeten Hydropathie-Werte**
Die Einzelwerte zur Berechnung der Hydropathie von Peptidbereichen [97]. Die Einteilung in polare/unpolare (P/U) und ungeladene/geladene (0/+,-) Aminosäuren ist daneben angegeben.

2.6.3 XREF-Datenbank

Zwei übliche Methoden in cDNS-Bibliotheken die Expression bestimmter Gene nachzuweisen ist die Hybridisierung bei geringer Annealing-Genauigkeit und die RT-PCR mit degenerierten Primern. Beide Methoden sind zeitlich und technisch sehr aufwendig. Im Rahmen der Genom- und cDNS-Bibliotheken verschiedener Organismen besteht durch die Verfügbarkeit von expressed sequence tags (EST) über Internet BLAST-Server [1, 113, 133, 179, 199] ein deutlich schnellerer, sensitiverer und günstigerer Weg [74] um Informationen über die Expression von ORFs zu erhalten.

ESTs sind Sequenzen von ein paar hundert Basenpaaren Länge, die durch teilstückweise single-pass Sequenzierung von cDNS-Klonen verschiedener Organismen hergestellt wurden [2, 14]. Ein hoher Prozentsatz der ESTs stammt von bisher nicht charakterisierten Genen [62]. Die Verwendung von ESTs kann somit bei der Identifikation neuer Gene eine wichtige Grundlage bieten [7, 18, 128, 195]. Es wurde die XRef-Datenbank (XREFdb) des NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) über das Internet benutzt. Die Datenbank ist angelegt worden um die Genetik von Modell-Organismen, wie der Bäckerhefe, mit Phänotypen von Säugetieren zu verbinden und die Identifikation neuer mutierter Gene des Menschen zu beschleunigen. XREFdb ist über das World-Wide-Web verfügbar und ermöglicht die Suche nach homologen Sequenzen, deren Mapping und Informationen über Phänotypen.

2.6.3.1 BLAST - Basic local alignment search tool

Die XREFdb benutzt zur Suche nach homologen Sequenzen die BLAST-Einrichtung des NCBI. Das Prinzip des Vergleichs einer beliebigen Sequenz der Datenbank mit der Vorlage, ist das Aufsuchen bestimmter Bereiche der Sequenzen, die einander ähnlicher sind als eine zufällige Sequenz (Alignment). Das Suchprogramm verwendet eine Modifikation des Smith-Waterman [172] oder Sellers [166] Algorithmus um Bereiche zu finden, deren Ähnlichkeit weder durch Erweiterung noch Verkleinerung des Bereichs verbessert werden kann. Wie stark die Ähnlichkeit dieser Bereichs (sog. “high-scoring segment pairs”, HSPs) ist, wird über die Maßzahl *S* ausgedrückt. Da *S* die Ähnlichkeit beider Aminosäurefolgen angibt, ist *S* abhängig von der Mutationswahrscheinlichkeit der einzelnen Aminosäuren zu anderen. Es sind viele solche Mutations- oder Ersetzungstabellen (substitution matrices) für Aminosäuren beschrieben [5, 31, 49, 56, 64, 80, 120, 134, 145, 148, 165, 174, 180, 193]. Die erste Matrix dieser Art, das PAM (point accepted mutation)-Modell, wurde von Dayhoff [31, 165] erstellt. Ein alternatives Modell, die BLOSUM-Matrix, wurde später von Henikoff und Henikoff [64] vorgestellt und ist das zur Zeit allgemein verwendete Modell zur Untersuchung biologischer Verwandtschaften.

Die wahrscheinliche Anzahl *E* von HSPs, mit einem Ähnlichkeitswert von *S*, innerhalb zweier Sequenzen kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = Kmn \cdot e^{-\lambda S}$$

Dabei ist *m* bzw. *n* die Länge der beiden Sequenzen, λ und *K* sind spezifische Konstanten für die untersuchten Sequenzen und *S* der Ähnlichkeitswert, der sich unter anderem durch die Mutationswahrscheinlichkeit der einzelnen Aminosäuren ergibt.
Die Wahrscheinlichkeit *P* mindestens ein HSP innerhalb der Sequenzen zu finden ist:

$$P = 1 - e^{-E}$$

Ein sehr kleiner P-Wert einer gefundenen Sequenz bedeutet also eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, eine *zufällige* Sequenz zu finden, die einen gleichen Ähnlichkeitswert zur Suchsequenz hat, wie die aktuell gefundene. Umgekehrt heiß das, es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die beiden Sequenzen einander ähnlich sind.

2.6.3.2 Anwendung der XRef-Datenbank

Die Suchen mit dem BLAST des NCBI wurde mit den cDNS-Datenbanken der Organismen *C. elegans, Drosophila melanogaster, Escherichia coli, Mus musculus, Rattus norvegicus, Schizosaccharomyces pombe* and *Xenopus laevis* durchgeführt.

2.7 Materialien

2.7.1 Verwendete Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae (Bäckerhefe)*

D273-10B	Amerikanisches Hefestockcenter, ATCC#24657
w334 haploid	Hovland et al., 1989 [73]
	MATα
	gal1 (galactokinase)
	reg1-501 (Glc7p, regulatorische Untereinheit)
	ura3-52 (Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase)
	leu2-3,112 (3-Isopropylmalatdehydrogenase)
	pep4-3 (vakuolare Protease A, Gluc-Depletionssignalt)
	prb1-1122 (vakuolare Protease B, Gluc-Depletionssignal)
MB2 diploid	Maarse et al,. 1992 [110]
	MAT **a**/α
	ura3-52/ura3-52 (Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase)
	leu2/leu2Δ1 (3-Isopropylmalatdehydrogenase)
	trp1-289/TRP1 (N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat isomerase)
	his3/his3-Δ200 (Imidazolglycerolphosphatdehydratase)
	ADE2/ade2-101 ^{ochre} (PhosphoribosylaminoImidazol-carboxylase)

	lys2-801^{amber}/lys2-801^{ambe} (L-Aminoadipat-semialdehyd-Dehydrogenase)	
w303 diploid	Thomas and Rothstein, 1989 [181]	
	MAT **a**/α *ura3-1/ura3-1 (Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase)* *leu2-3,112/leu2-3,112 (3-Isopropylmalatdehydrogenase)* *trp1-1/trp1-1 (N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat isomerase)* *his3-11,15/his3-11,15 (Imidazolglycerol-phosphatdehydratase)* *ade 2-1/ade2-1 (PhosphoribosylaminoImidazol-carboxylase)* *can1-100/can1-100 (Argininpermease)*	
MB2 ΔTim8	*tim8::HIS3*	diese Arbeit
MB2 ΔTim8/ΔTim13	*tim8::HIS3 tim13::URA3*	diese Arbeit
w334 ΔTim8/Tim9(Gal10)	*tim8::HIS3 Tim9(gal10)*	diese Arbeit

Für die Präparation von Hefemitochondrien wurde der Wildtypstamm D273-10B (Amerikanisches Hefestockcenter, ATCC#24657) oder der haploide Hefestamm w334 [73] verwendet. Ebenso wurde der haploide Hefestamm w334 für die Expression von *TIM9* unter der Kontrolle des gal10-Promotors benutzt. Die Disruption eines Allels von *TIM9* und von *TIM8* wurde im diploiden Hefestammes MB2 durchgeführt [110].

2.7.2 Verwendete Stämme von *E. coli*

DH5α**:** *(F' endA1 hsdR17(r_k^- m_k^+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15))*

XL1-Blue**:** *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi-1 ($r_k^-m_k^+$) relA1 lac (F´::Tn10 proA$^+$B$^+$ lac^q Δ(lacZ)M15)*

2.7.3 Medien

LB-Medium:

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10g/l NaCl

LB-Amp-Medium:

zusätzlich 100 mg/l Ampicillin (sterilfiltriert)

LB-Amp-Platten:

zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar

SOC-Medium:

0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose

Lactatmedium (1 l):

3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Glucose, 1 g/l KH_2PO_4, 1 g/l NH_4Cl, 0.5 g/l $CaCl_2$ x 2 H_2O, 0.5 g/l NaCl, 1.1 g/l $MgSO_4$ x 6 H_2O, 0.3 ml/l 1% $FeCl_3$-Lösung, 22 ml/l 90% Milchsäure.

H_2O dest. ad 1 l

pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen

YPD-Platten (1 l):

10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Bacto-Agar

H_2O dest. ad 930 ml

pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen

Nach dem Autoklavieren: +70 ml 30% Glucose

YPG-Platten (1 l):

10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Bacto-Agar

H_2O dest. ad 900 ml

pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen

Nach dem Autoklavieren: +100 ml 30% Glycerin

SD-Medium (*synthetic dextrose minimal medium*) (1 l):

6.7 g/l Stickstoffbasis für Hefe (ohne Aminosäuren)

20 g/l Glukose (2%)

20 g/l Bacto-Agar (2%)

H_2O dest. ad 1000 ml

pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen

SD-Laktat-Platten (1 l):

6.7 g/l Stickstoffbasis für Hefe (ohne Aminosäuren)

20 g/l Bacto-Agar (2%)

23 ml/l 90% Milchsäure

H_2O dest. ad (1000 ml-$V_{Auxotrophiemarker}$)

pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen

Nach dem Autoklavieren:

Zugabe der benötigten Auxotrophiemarker

je 2 ml/l Arg, His, Leu, Lys, Trp (10 mg/ml)

je 5 ml/l Ade, Ura (2 mg/ml)

SC-Platten (*synthetic complete medium*):

zusätzlich zum SD-Medium noch 2 g/l Drop-Out-Mix (s.u.)

Drop-Out-Mix (34,2 g):

je 2 g Glycin, Inositol, Isoleucin, Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin und 0,2 g p-Aminobenzoesäure

Sporulationsplatten:

10 g/l Kaliumacetat, 20 g/l Bacto-Agar

Sulfatarmes Minimalmedium:

(alle Lösungen sterilfiltriert oder autoklaviert)

10x Salzlösung: 60 g $(NH_4)_2HPO_4$, 8.1 g NH_4Cl, 10 g KH_2PO_4, 1 g NaCl
mit H_2O auf 1 l auffüllen

100x Ca/Mg-Salze: 1,3 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 4.1 g $MgCl_2$ x 6 H_2O
mit H_2O auf 1l auffüllen

Grundmedium: 100 ml 10x Salzlösung
10 ml 100x Ca/Mg-Salze
1 g Glucose
22 ml 90% (v/v) Milchsäure

Das Medium wurde mit KOH auf pH 5.5 eingestellt und mit H_2O auf ein Volumen von 870 ml aufgefüllt. Dann wurden 5 ml Vitaminlösung, 5 ml Inositollösung, 10 ml Spurenelement-Lösung, 1 ml Fe_3Cl-Lösung, 4 ml Uracil-Lösung, 100 ml Aminosäuremix und 5 ml Na_2SO_4-Lösung zugesetzt. Die Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Vitaminlösung: je 40 mg Ca-Pantothenat, Thiaminhydrochlorid, Pyridoxinhydrochlorid und 10 mg Nicotinsäure in 99 ml H_2O plus 1 ml Biotin (40 mg/100 ml in 50 mM $NaHCO_3$)

Inositollösung: 400 mg Inositol in 100 ml H_2O

Spurenelemente: 50 mg H_3BO_3, 10 mg KI, 4 mg $CuCl_2$ x 2 H_2O, 47 mg $MnCl_2$ x 4 H_2O, 19 mg $ZnCl_2$, 20 mg Na_2MoO_4 x 2 H_2O
in 1 l Wasser lösen

$FeCl_3$-Lösung: 33 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O in 100 ml H_2O

Uracil-Lösung: 250 mg Uracil in 100 ml H_2O

Aminosäuremix: 0,2 mg jeder Aminosäure (außer Met und Cys)
pro ml H_2O

Na_2SO_4-Lösung: 85 mg Na_2SO_4 in 100 ml H_2O

Alle Medien wurden für 20 min bei 120°C autoklaviert.

2.7.4 Puffer

HS-Puffer: 0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
TBS: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl
TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetat, pH 7,4
PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,9 mM KH_2PO_4, 8,2 mM Na_2HPO_4, pH 7,4
SEM-Puffer:
Laemmli-Puffer: 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau

2.7.5 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:
Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Buchler, Braunschweig: ECL Reagens für Western Blots, Taq-DNS-Polymerase, ^{35}S-Methionin (1100-1400 Ci/mmol), ^{35}S-Sulfat (800-1300 Ci/mmol)
Behringwerke, Marburg: Freunds inkomplettes Adjuvans
Biolabs: Amylosesäulen
BioRad, München: Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG oder HRP-gekoppelte Anti-MausIgG (aus Ziege)
Boehringer, Mannheim: Nukleotide, NADH, NADPH, Proteinase K, DTT, Lysozym, RNase A, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, Oligomycin, Restriktionsenzyme, Tris
QIAGEN, Hilden: pQE-Vektoren, Ni-NTA-Agarose
DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt, "Yeast Nitrogen Base" (ohne Aminosäuren), "Nutrient Broth"
Fluka, Buchs, CH: Trichloressigsäure
Fuji: Röntgenfilme
Genomed, Bad Oeyenhausen: "Jetstar"-Kit
Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT, IPTG, NADH,
GIBCO-BRL, Karlsruhe: Agarose ("ultra pure, low endoosmosis"), T4-DNS-Ligase, Restriktionsenzyme
Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat XR
Merck, Darmstadt: Digitonin
Nestlé-Alete, München: Magermilchpulver
New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme
Pharmacia, Freiburg: 7-Methyl-Guanosintriphosphat (7mGpppG), Protein A-Sepharose CL4B, Superose 6, BrCN-Sepharose 4B, Sephadex G25
Pierce, Rochester, USA: DSG, MBS, DPDPB
Promega, Heidelberg: RNAsin, Kaninchenretikulocytenlysat, pGEM-Vektoren, SP6-Polymerase
Riedel de Haen, Seelze: Kaliumacetat

Schleicher & Schüll, Dassel: Nitrozellulosemembran (0,2 µm), Faltenfilter, Filterpapiere
Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Siliconlösung, Spermidin, TEMED
Sigma, München: Ammoniumperoxodisulfat, Apyrase Grade VIII, BSA (fettsäurefrei), Glycerin, β-Mercaptoethanol, Molekulargewichtstandards für SDS-PAGE, Oligomycin, PMSF, Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI), Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A
Whatman, Maidstone, England: DE52-Cellulose

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

2.7.6 Laborgeräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevamatic 60
Beckman Instruments, München: Kühlzentrifugen J2-21, Ultrazentrifugen (L8-Serie), Tischultrazentrifuge TL-100 einschließlich der Rotoren und Zentrifugenröhrchen
Bender und Hobein, München: Mixer zum Vortexen
Branson, Heusenstamm: Ultraschallgerät Sonifier 250
Braun, Melsungen: Schüttelwasserbäder, "Certomat"-Schüttler
Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße
Fuji: “Phosphorimager”
Genser, Rothenburg: Geltrockner Jet1
Heraeus Christ, Osterode: Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge
Ika, Staufen: Magnetrührer
Memmert, Hannover. Wärmeschränke
Perkin Elmer Cetus, Überlingen: PCR-Maschine
Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte, Laserdensitometer, FPLC, Chromatographiesäulen, Durchflußmonitore, Fraktionssammler, Gradientenmischer, Peristaltikpumpen
Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Semi-Dry-Blotkammern, Filtrationsapparatur
Schütt, Göttingen: "Bioclav"-Autoklav
Shiadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-240 und UV-120-02
Sigma, München: Tisch-Kühlzentrifugen

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach neuen Komponenten des Importweges über Tim22

Nach der Translokation über den TOM-Komplex der Außenmembran wird ein Gruppe von mitochondrialen Vorstufenproteinen, die ein oder mehrere interne Sortierungssignale besitzen, über den TIM22-Komplex importiert. Die Funktion der Intermembranraumchaperone Tim10 und Tim12 ist essentiell für diesen Importweg [171].

Um weitere Komponenten aus der Familie von Tim10 und Tim12 zu identifizieren wurde ein spezialisierter Algorithmus zum Auffinden homologer Aminosäuresequenzen entwickelt, der sich an der Struktur dieser essentiellen Proteine orientiert. Die Suche mittels einer der bereits existierenden Suchmaschinen der öffentlichen Datenbanken erschien wenig erfolgreich, da diese Suchmaschinen eine Homologiesuche mit spezifischen Parametern und Kriterien nicht zuließen. Des weiteren bedienen sich viele Suchalgorithmen bereits identifizierter ORFs, wie sie in den Datenbanken angelegt sind. Das schloß aus, daß bisher nicht identifizierte ORFs untersucht würden. Weiterhin werden bei Anwendung dieses Verfahrens diejenigen ORFs nicht berücksichtigt, die mit identifizierten Genen überlappen. Ebenso liegt bei manchen Datenbanken der Ausschlußbereich bei einer Gengröße von etwa 300 bis 400 Basenpaaren. Dadurch werden kleine Gene, wie z.B. das 282 bp lange *TIM10*, nicht erkannt. Aus diesen Gründen war es notwendig, ein eigenes Suchprogramm mit einem spezialisierten Algorithmus für die Suche im Hefegenom zu entwickeln (2.6).

3.1.1 Sequenzvergleich und Ermittlung der Suchkriterien

Als Referenz für die Suche nach weiteren Komponenten wurden die Sequenzen der publizierten kleinen Tim-Proteine (Tim10, Tim12) und die Sequenz eines bis dahin unveröffentlichten homologen Proteins, Tim13 (M. Endres), gewählt. Zwischen den Proteinen besteht Sequenzähnlichkeit von etwa 25% (Abbildung 17).

Vier charakteristische Cysteinreste sind in allen drei Sequenzen konserviert. Ihre Anordnung in zwei CX_3C-Motive, die durch mehrere Aminosäuren von einander getrennt sind, ähnelt der in Zinkfinger-Proteinen. Für die Proteine Tim10 und Tim12 ist bekannt, daß sie Zn^{2+} in äquimolaren Mengen binden [171]. Häufig spielen Zinkfinger-Strukturen eine Rolle bei der Interaktion eines Proteins mit anderen Proteinen [26]. Dies läßt vermuten, daß das konservierte Zinkfinger-ähnliche Motiv der bisher bekannten kleinen Tim-Proteine für deren Funktion von entscheidender Bedeutung ist.

Innerhalb der CX_3C-Motive finden sich in allen drei Sequenzen konservierte geladene und hydrophobe Aminosäuren. Allerdings ist für die Bildung des Zinkfingers keine bestimmte Ladung in diesem Bereich notwendig. Es wurden daher in der Suche keine geladenen Aminosäuren innerhalb der CX_3C-Motive gefordert. Jedoch wurde die in allen drei Vorlagen (Tim10, Tim12, Tim13) konservierte hydrophobe Aminosäure hinter dem jeweils ersten

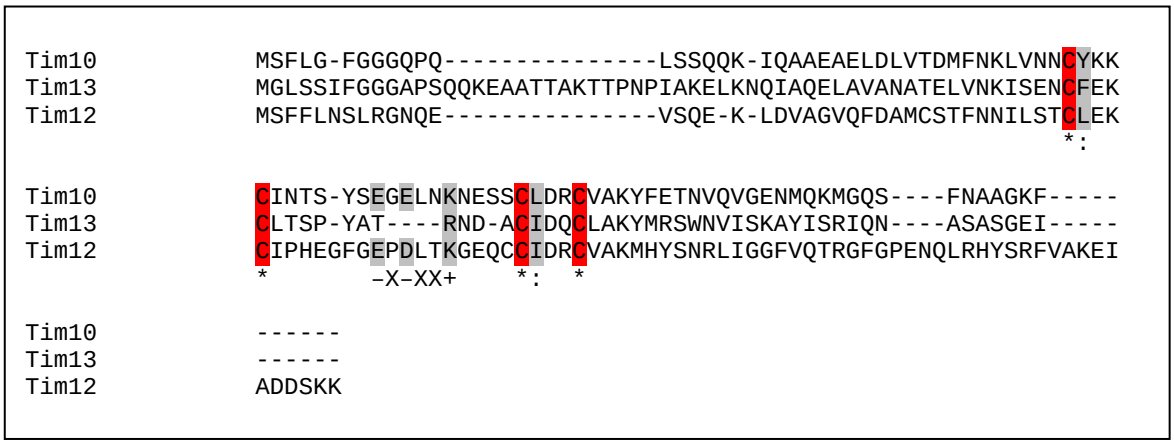


Abb. 17: **Konservierte Sequenzbereiche als Suchkriterien**
Die kleinen Tim-Proteine sind sich in der Länge (Tim12 109AS, Tim13 105AS, Tim10 93AS) ähnlich und weisen konservierte CX_3C-Motiven im mittleren Bereich der Proteine auf (*), wobei die Aminosäure direkt hinter dem ersten Cystein hydrophob ist (:). Diese konservierten Sequenzen dienen als Kriterium für die Suche nach homologen Proteinen. [–X–XX+]: In Tim10 und Tim12 erhaltenes Muster, das komplementär zur Carrier-Signatur ist.

Cystein verwendet. Auffallend ist auch eine spezifische Ladungsverteilung in Tim10 und Tim12 zwischen den beiden CX_3C-Motiven: [–X–XX+]. Sie ist komplementär zur sogenannten Carrier-Signatur und könnte in Tim10 und Tim12 als Erkennungssequenz für importierte Carrierproteine dienen (Abbildung 42) [171]. Jedoch ist sie nicht im uncharakterisiertem Tim13 erhalten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß Tim13 mit anderen Proteinen oder Proteinsegmenten interagiert. Andere Komponenten der Familie der kleinen Tim-Proteine könnten ebenfalls Erkennungssequenzen zwischen den konservierten CX_3C-Motiven besitzen, die sich von denen, in Tim10 und Tim12 enthaltenen, unterscheiden. Unter Berücksichtigung dieser Überlegung wurde die konservierte Ladungsverteilung [–X–XX+] aus Tim10 und Tim12 nicht als Kriterium für die Suche verwendet.
Die genannten Kriterien erlaubten es, folgende Sequenz für die Suche nach ORFs im Hefegenom aufzustellen:

$$\mathbf{[C\ \$\ X\ X\ C\ (X_{10\text{-}30})\ C\ \$\ X\ X\ C]}$$

Abb. 18: **Suchsequenz zur Identifikation von Homologen kleiner Tim-Proteinen**
C: Cystein, X: beliebige Aminosäure, $: hydrophobe Aminosäure, $X_{10\text{-}30}$: Bereich beliebiger Aminosäuren mit variabler Länge zwischen 10 und 30 Aminosäuren.

3.1.2 Mustersuche im Hefegenom

Die Suche wurde mit dem entwickelten Programm (Methodenteil 2.6.2) und der ermittelten Suchsequenz durchgeführt. Es wurden alle 16 Chromosomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in beiden Leserichtungen (Watson (w)-Strang, Crick (c)-Strang) durchsucht.
Die Suche bestand im Wesentlichen aus den folgenden vier Schritten:

1. Suche in allen Leserahmen nach ATG und dem zugehörigen Stopp-Codon im gleichen Leserahmen
2. Bestimmung der Größe des ORFs, wobei eine Länge von 65-1000 Aminosäuren erlaubt wurde
3. Suche innerhalb des ORF nach [C$XXC($X_{10-30}$)C$XXC]
4. Vergleich der gefundenen Position mit Eintragungen in der Datenbank

Die Ergebnisse wurden mit Einträgen der MIPS-Datenbank verglichen und mit entsprechender Beschreibung ausgegeben. In Abbildung 19 sind die 21 gefundenen ORFs dargestellt.

3.1.3 Bewertung und Auswahl der Ergebnisse

In diesen vorläufigen Ergebnissen waren alle ORFs des Hefegenoms enthalten, die den Suchkriterien entsprachen und eine Länge zwischen 195 bp bis 3000 bp besitzen. Alle diese Sequenzen kämen unter alleiniger Berücksichtigung des gesuchten Motivs als potentielle Mitglieder der Tim10-12-13-Familie in Betracht. Eine Vorauswahl der gefundenen Sequenzen erfolgte bei der ersten Durchsicht, da manche der Sequenzen, abgesehen vom gesuchten Bereich, stark von den Vorlagen abwichen. So waren solche Proteine nicht geeignet, die reich an Cystein-Resten sind. In diesen Proteinen ist das Muster CX_3C vermutlich durch statistische Anordnung der Cysteinreste entstanden. Somit ist es unwahrscheinlich, daß es sich um ein konserviertes Element handelt, wie es für die Tim-Familie charakteristisch ist.
Ebenso sind ORFs ungeeignet, die für längere repetitive Sequenzen der gleichen Aminosäure kodieren oder die sich in ihrer Länge stark von den Genen *TIM10*, *TIM12*, *TIM13* unterscheiden.
Eine Länge von mehr als 400 Basen, ein Cystein-Gehalt von mehr als acht in der Aminosäuresequenz und jegliche repetitive Sequenz mit mehr als fünf gleichen Aminosäuren in Folge wurde als Hinweis auf eine nicht verwandte Sequenz betrachtet.
Damit wurden von den ermittelten 21 Sequenzen sechs als mögliche Zielproteine ausgewählt (siehe 3.1.4.1, oberer Bereich). Darunter befinden sich Tim10, Tim12 und Tim13. Dies zeigte, daß mit dem gewählten Verfahren erfolgreich Mitglieder der Tim-Proteine im Hefegenom erkannt werden konnten. Die drei neuen ORFs wurden vorläufig als LX1, LX2, LX3 benannt.

Position	Length (bp)	in Database	DB-ORF-Start	DB-ORF-End	Description
II-C, 385697	330	YBR091c	427116	427442	subunit of the Tim22-complex **Mrs5p Tim12**
V, 117210	264	misc_RNA	117211	117471	**Lx2 Tim9**
VII, 858280	318	YGR181w	858281	858595	similarity to YHR004c-a **Mrsx Tim13**
VIII-C, 115612	282	YHR005c-a	115616	115894	subunit of the Tim22-complex **Mrs11p Tim 10**
X, 676659	264	YJR135w-a	676660	676920	**similarity to human DDP gene**, hypothetical protein (YA94_SCHPO) and Mrs11p (YHR005c-a) (LITERATURE) **Lx1 Tim8**
XV, 855797	382	SO_15_X89633	855798	856180	prepublication: SO_15_X89633 **Lx3**
I-C, 165561	*207*	---			---
I-C, 230206	*1122*	---			---
IV-C, 626700	*1827*	YDR091c	626704	628527	strong similarity to human RNase L inhibitor and M transporter protein
IV-C, 1294824	*576*	YDR413c	1294828	1295400	weak similarity to NADH dehydrogenase
IV-C, 1395846	*360*				---
VI-C, 134514	*2637*	YFL003c	134518	137151	MSH4, meiosis-specific protein
VII-C, 919888	*207*	---			---
IX-C, 177339	*339*	YIL100c-a	177343	177678	questionable ORF
XII-C, 11157	*294*		5724	11196	Yprime_chrXIILb
XIII-C, 37419	*216*	---			---
XIII-C, 354417	*201*	---			---
XIV-C, 588258	*2898*	YNL023c	588262	591156	similarity to D.melanogaster shuttle craft protein
XV-C, 392414	*2109*	DHS1	392418	394523	EXO1 encodes an exonuclease which interacts with
XVI-C, 15404	*1464*	YPL277c	15408	16868	strong similarity to hypothetical protein YOR389w/ pseudogene
XVI-C, 369963	*204*	YPL094c	369837	370685	ER protein-translocation complex subunit

Abb. 19: **Ergebnisse des Suchalgorithmus**
Das Programm lieferte 21 Ergebnisse, die den Anforderungen der Suchkriterien entsprachen. Für jeden gefundenen offenen Leserahmen wurde ein Vergleich mit der MIPS-Datenbank durchgeführt und der entsprechende Eintrag ausgegeben (Position auf dem Chromosom und Länge des gefundenen ORFs in der 1. und 2. Spalte von links; am besten entsprechender ORF/Region laut Datenbank mit Start- und Stopp-Position in den Spalten 3-5; rechte Spalte: Bemerkungen der Datenbank im Dünndruck, eigene Bemerkungen im Fettdruck; die Doppellinie trennt im oberen Feld die manuell ausgewählten besten Treffer (siehe 3.1.3)).

3.1.3.1 Sequenzen der ausgewählten offenen Leserahmen

LX1
DNA-Sequenz: 001 ATGTCTTCTC TATCAACGTC TGATTTGGCC TCCCTTGATG ACACTTCCAA 051 AAAGGAAATT GCTACTTTCT TGGAGGGAGA GAACTCCAAA CAAAAAGTCC 101 AGATGTCAAT CCATCAATTC ACTAATATAT GCTTCAAAAA ATGTGTTGAG 151 TCTGTCAATG ATTCTAATTT AAGTTCGCAA GAAGAGCAAT GTTTGTCTAA 201 CTGTGTGAAT CGGTTTTTGG ATACTAATAT CAGGATTGTG AACGGGTTGC 251 AAAACACCCG TTAA
Protein-Sequenz: MSSLSTSDLA SLDDTSKKEI ATFLEGENSK QKVQMSIHQF TNICFKKCVE SVNDSNLSSQ EEQCLSNCVN RFLDTNIRIV NGLQNTR*

LX2
DNA-Sequenz: 001 ATGGACGCAT TGAACTCCAA AGAACAACAA GAGTTCCAAA AAGTAGTGGA 051 ACAAAAGCAA ATGAAGGATT TCATGCGTTT GTACTCTAAT CTGGTAGAAA 101 GATGTTTCAC AGACTGTGTC AATGACTTCA CAACATCAAA GCTAACCAAT 151 AAGGAACAAA CATGCATCAT GAAGTGCTCA GAAAAGTTCT TGAAGCATAG 201 CGAACGTGTA GGGCAGCGTT TCCAAGAACA AAACGCTGCC TTGGGACAAG 251 GCTTGGGCCG ATAA
Protein-Sequenz: MDALNSKEQQ EFQKVVEQKQ MKDFMRLYSN LVERCFTDCV NDFTTSKLTN KEQTCIMKCS EKFLKHSERV GQRFQEQNAA LGQGLGR*

LX3
DNA-Sequenz: 001 ATGTCCATAA AATCCTCACT GGGAGAGTTA TCGCCAGTAA CTGGACTTGA 051 TTCAAGCGCT GGTGGTTCAG AATTTTCAGA TCCTTCAAGT TTCACTTTCT 101 TAGGTCTTCC ACGGGGCCTT CCTGCCTTTC TCTTTTTAGA CAAGAAATCA 151 TCGTCATTCA TTGCCAAATC CGTATCTGCC CGATCTTCGG CCGATATATT 201 ATTAATTCTA GGACCGTCAT TATCAGCGTC AATGTTTTCG CCTTTAATTT 251 CTCCATTCCC ATCAATCGCC TCGCTCTTAT CTTCCTTCTT TGTTCGTTGT 301 TTTCTTGCCT GCTTGTCATT TTTTTCATCA TCGCTAACTT CAAATTGTCT 351 TAACCACTGT TCTTCAGACA TATTATCGTT GTAA
Protein-Sequenz: MSIKSSLGEL SPVTGLDSSA GGSEFSDPSS FTFLGLPRGL PAFLFLDKKS SSFIAKSVSA RSSADILLIL GPSLSASMFS PLISPFPSIA SLLSSFFVRC FLACLSFFSS SLTSNCLNHC SSDILSL*

3.1.3.2 Expressionsanalyse der ORFs

Wichtig für die Beurteilung der verbleibenden ORFs war es, einen Hinweis auf deren Expression zu erhalten. Als bioinformatische Methode wurde hierzu eine Datenbank aus cDNS-Sequenzen von verschiedenen Organismen untersucht. Darin sind revers transkribierte Teile von mRNS-Sequenzen exprimierter Gene (**E**xpressed **S**equence **T**ag; EST) aus Zellen verschiedener Organismen erfaßt. Lassen sich in dieser Datenbank homologe Sequenzen zu LX1, LX2 und LX3 finden, würde das auf Expression dieser ORFs hindeuten.
Zur Suche in dieser Datenbank, wurde der BLAST-Server der dbEST des NCBI (National Center for Biotechnology Information, XREFdb) benutzt. Die Ergebnisse der EST-Datenbank sind in der Abbildung 20 dargestellt. Der errechnete BLAST P-Wert zeigt die Ähnlichkeit der Sequenz von LX1, LX2 und LX3 mit den dazu gefundenen ESTs an. Je geringer der Wert, desto größer ist die Verwandtschaft der Sequenzen. Die gefundenen ESTs haben eine für heterologe Sequenzen hohe Ähnlichkeit mit den Sequenzen von LX1 und LX2. Sie stammen aus verschiedenen Organismen (Mensch, Ratte und Maus), was auf eine Konservierung dieser Proteine im Genom verschiedener Spezies und damit auf eine wichtige Funktion hinweist. Die ESTs für LX1 und LX2 sprechen für die Expression dieser Gene auch in Hefe. Im Vergleich dazu gibt es für LX3 keine sehr ähnlichen ESTs in der Datenbank, was gegen dessen Expression spricht.
Zu bedenken ist jedoch, daß ESTs Bruchstücke aus der mRNS exprimierter Gene sind. Sie enthalten keinen Hinweis auf den verwendeten Leserahmen des exprimierten Gens. Es könnte damit sein, daß die gefundenen ESTs zu einem Gen gehören, das den gefundenen ORF von LX1 oder LX2 einschließt und im selben oder einem anderen Leserahmen exprimiert wird. Daher ist es notwendig zu untersuchen, ob exprimierte Gene den Genombereich von LX1 oder LX2 überlappen. Einen Überblick über bekannte Gene in der Nachbarschaft der gefundenen ORFs geben Genkarten der Regionen um LX1, LX2 und LX3 (MIPS-Datenbank).
Bei Betrachtung der drei Regionen zeigte sich, daß LX1 (bereits als ORF YJR135w-a in der Datenbank), LX2 und LX3 mit keinen anderen Genen/ORFs überlappen. Der ORF LX2, der in der Datenbank noch nicht identifiziert war, grenzt eng an die kodierende Region von RNAse-P-RNA an, überschneidet sich jedoch nicht mit dieser (Abbildung 22).

3.1.3.3 Zusammenfassung

Aufgrund der durchgeführten bioinformatischen Analysen ist die Expression der ORFs LX1 und LX2 wahrscheinlich, nicht jedoch die des ORFs LX3. Im weiteren Untersuchungen wird Lx2 aufgrund des berechneten Molekulargewichts von 10.2 kDa und der Tatsache, daß es kleiner als Tim10 ist, entsprechend der vereinbarten Nomenklatur für Proteine des mitochondrialen Imports [141] **Tim9** genannt. Das etwas kleinere Lx1 wird als **Tim8** bezeichnet.

GenBank NCBI_ID:	Accession:	Org:	P value:	Mapped N:	Unigene ID
LX1:					
2199207	AA900102	Rat	7.6e-14	2	
1484203	AA762075	Mouse	2.9e-13	2	
895995	AA255035	Mouse	4.3e-13	2	
1315023	AA617279	Mouse	2.4e-12	2	
180702	R10406	Human	3.3e-12	2	125565
646521	AA032824	Mouse	4.3e-12	2	
176193	R05897	Human	5.1e-12	2	125565
1321931	AA624187	Mouse	6.0e-12	2	
1788230	AI048811	Mouse	6.7e-12	2	
945660	AA304351	Human	8.3e-12	2	7499
1391640	AA685493	Rat	1.0e-11	2	
2029922	AI256838	Mouse	1.2e-11	2	
644785	AA030627	Mouse	1.6e-11	2	
1116661	AA471891	Mouse	1.7e-11	2	
1933817	AI171266	Rat	2.0e-11	2	
663625	AA047955	Mouse	2.3e-11	2	
1723791	AA986236	Mouse	2.6e-11	2	
1873932	AI115413	Mouse	2.7e-11	2	
674884	W82151	Mouse	2.8e-11	2	
1671006	AA938205	Human	4.2e-11	3	125565
LX2:					
612363	AA003104	Mouse	4.0e-14	1	
1533821	AA811988	Human	5.9e-14	1	32456
1338483	AA635047	Human	1.7e-13	1	32456
2157740	AI368790	Human	1.7e-13	1	32456
676022	W83746	Mouse	1.7e-13	1	
898078	AA255745	Human	1.8e-13	1	32456
1927498	AI168679	Human	2.8e-13	1	32456
929278	AA288153	Mouse	2.8e-13	1	
1713699	AA977202	Human	3.0e-13	1	32456
1155743	AA511103	Mouse	4.5e-13	1	
1511237	AA789562	Mouse	6.0e-13	1	
929751	AA289063	Mouse	6.3e-13	1	
915456	AA274844	Mouse	7.3e-13	1	
1068082	AA423814	Human	1.1e-12	1	32456
1958341	AI194594	Mouse	2.8e-12	1	
1406588	AA700205	Human	3.8e-11	1	32456
848996	AA209542	Mouse	6.3e-11	1	
1643417	AA915358	Mouse	8.5e-11	2	
1952945	AI189196	Human	1.2e-10	1	32456
1134675	AA490434	Human	2.8e-10	1	32456
LX3:					
1902760	AI144091	Human	6.5e-2	2	235140

Abb. 20: **Expressed Sequence Tags der gefundenen ORFs**
Mit den identifizierten offenen Leserahmen wurde eine Homologiesuche in der cDNS-Datenbank (dbEST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) für exprimierte Sequenzabschnitte durchgeführt. Die homologen Sequenzen in unterschiedlichen Organismen sind aufgeführt. P-Werte im Bereich von 10^{-10} und darunter zeigen eine große Ähnlichkeit der gefundenen cDNS-Sequenzen mit dem entsprechenden ORF an.
NCBI_ID, *Accession*, *Unigene ID*: Referenzen der Sequenz in verschiedenen Datenbanken; *Org*: Organismus; *P value*: P-Wert für die Sequenzähnlichkeit; *Mapped N*: Anzahl der zu diesem EST gefundenen Einträge in der Datenbank.

Genkarte Region LX1/*TIM8*

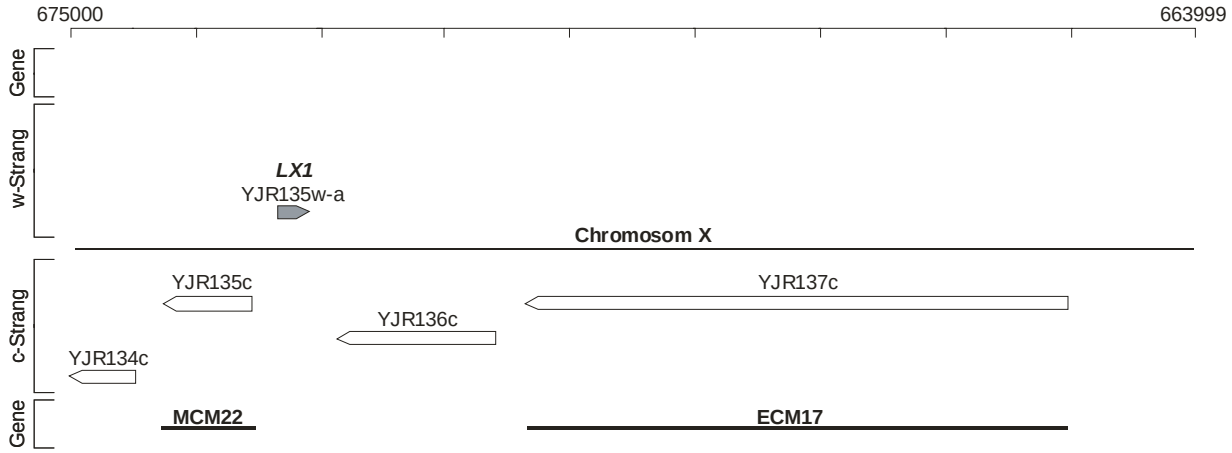


Abb. 21: **Genkarte der Region LX1/*TIM8***
LX1 ist auf dem Chromosom 10 ab dem Basenpaar 676660 im Leserahmen 3 des w-Stranges codiert. An dieser Position wurde bereits ein offener Leserahmen unbekannter Funktion gefunden und systematisch mit YJR135w-a bezeichnet. Auf beiden Strängen befinden sich in keinem Leserahmen überlappende ORFs mit einer Länge von über 100 bp.
Die in dieser Region bereits identifizierten Gene sind mit Namen und einem Balken dargestellt.

Genkarte Region LX2/*TIM9*

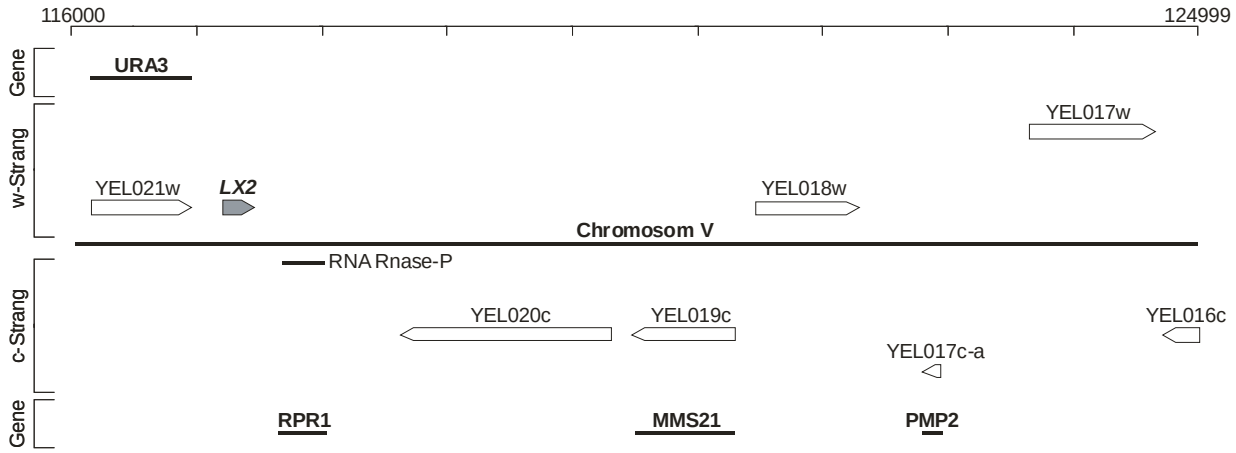


Abb. 22: **Genkarte der Region LX2/*TIM9***
LX2 ist auf dem Chromosom 5 ab dem Basenpaar 117211 im Leserahmen 3 des w-Stranges codiert. Strangabwärts befindet sich auf dem gegenüberliegenden Strang eine Sequenz, die für die RNS der RNaseP kodiert. Jedoch überlappt sie nicht mit LX2. Es gibt auch in keinem weiteren Leserahmen ein überlappendes Gen.

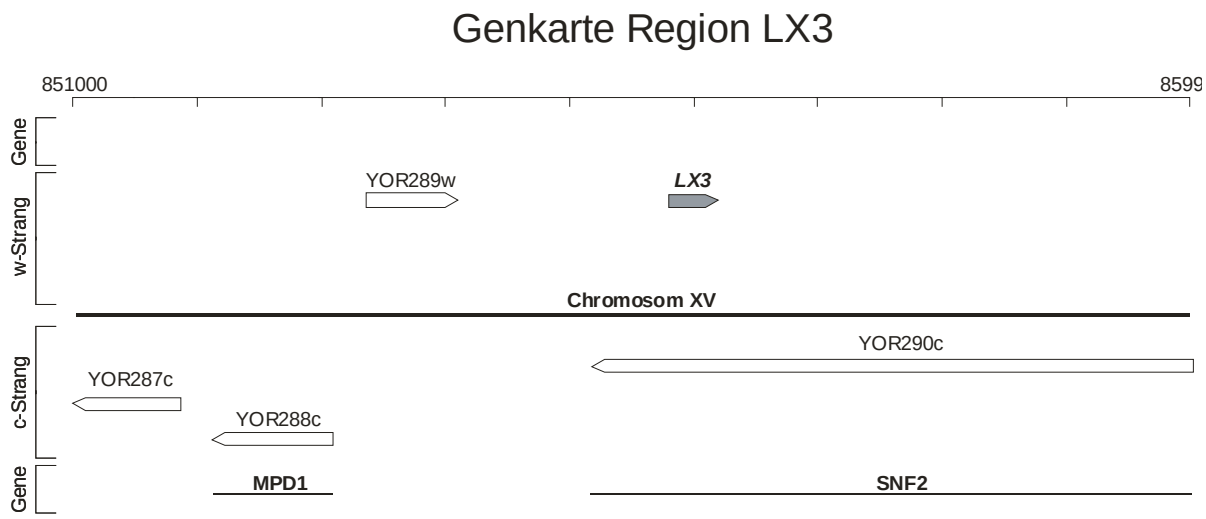


Abb. 23: **Genkarte der Region LX3**
LX3 ist auf dem Chromosom 15 ab dem Basenpaar 855798 im Leserahmen 1 des w-Stranges codiert. Das Gen *SNF2* (in der systematischen Nomenklatur der ORFs YOR290c) liegt im Leserahmen 1 des gegenüberliegenden c-Stranges.

3.2 Analyse der Gene TIM8 und TIM9

Die beiden bisher identifizierten kleinen Tim-Proteine, Tim10 und Tim12, sind essentiell für das Wachstum der Hefezellen. Um die Bedeutung der gefundenen ORFs für die Hefe zu bestimmen, wurden Disruptionsanalysen der Gene *TIM8* und *TIM9* durchgeführt.

3.2.1 Das *TIM8*-Gen ist nicht essentiell für *S.c.*

Das Gen TIM8 wurde deletiert und der Phänotyp des haploiden Depletionsstammes wurde auf einen letalen Phänotyp analysiert. Dazu wurde eine Rekombinationskassette konstruiert (Abbildung 24), die am 5' und 3'-Ende je einen Bereich enthielt, der homolog zum 5'-Bereich vor der Promotorregion von *TIM8* bzw. homolog zum *TIM8* flankierenden 3'-Bereich ist. Die Kassette enthielt eine funktionelle Kopie des *HIS3*-Gens für die Imidazolglycerol-phosphat-dehydratase aus *Schizosaccharomyces pombe*, die auch in *S.c.* funktionell ist. In dem diploiden *S.c.*-Stamm, der aufgrund einer knock-out-Mutation im Bereich beider Allele des *HIS3*-Gens auxotroph für Histidin ist [110], wurde ein Allel vom *TIM8* durch homologe Rekombination mit dem *HIS3*-Gen ersetzt. Die erfolgreiche Integration des *HIS3*-Gens in das Hefegenom zeigte sich durch das Wachstum des diploiden Stammes auf histidinfreiem Medium.

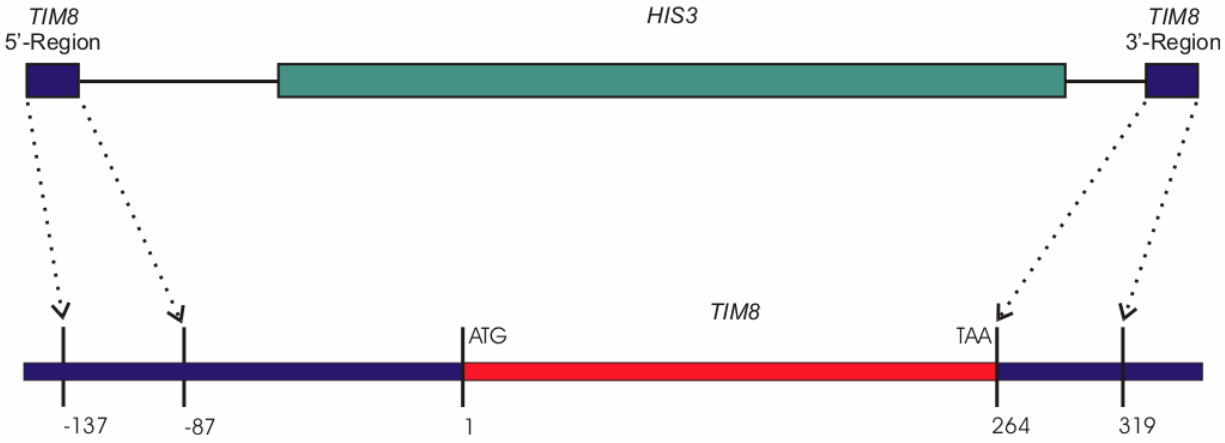


Abb. 24: ***TIM8-HIS3*-Rekombinationskassette**
Der ORF *TIM8* und 87 Basen des Promotors strangaufwärts wurden durch das *HIS3*-Gen ersetzt. Dabei wurde zur homologen Rekombination ein Bereich von 50 Basen der 5'-nicht kodierenden Region (-137 bis -87) und ein Bereich von 55 Basen ab dem Stopp-Codon strangabwärts verwendet.

Zellen dieses Stammes wurden nach Sporulation einer Tetradenanalyse unterzogen. Die getrennten vier Sporen wurden zuerst auf YPD-Vollmedium zu Kolonien gezogen, und anschließend auf histidinfreies Medium umgeimpft, um die Kolonien auf Histidinauxotrophie zu testen. Alle vier Tochterkolonien waren lebensfähig auf YPD-Vollmedium (Daten nicht gezeigt). In jeweils zwei der vier Sporen war das Allel von *TIM8* durch die *HIS3*-Kasette ersetzt worden, wie deren Wachstum auf histidinfreiem Medium bestätigte (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigten, daß die Deletion des *TIM8*-Gens nicht letal für die Hefezelle ist. *TIM8* ist kein essentielles Gen.

3.2.2 Das *TIM9*-Gen ist essentiell für *S.c.*

Das gleiches Vorgehen wie im Fall des oben beschriebenen Gens für Tim8 wurde bei *TIM9* angewandt, um festzustellen, ob es ein essentielles Gen ist. Es wurde ebenfalls ein Allel des *TIM9* in dem diploiden *S.c.*-Stamm MB2 durch homologe Rekombination mit einer Rekombinationskassette (Abbildung 25) ersetzt. Zellen, bei denen dieser Austausch erfolgreich stattfand, wurden anschließend auf histidinfreiem Medium selektioniert.

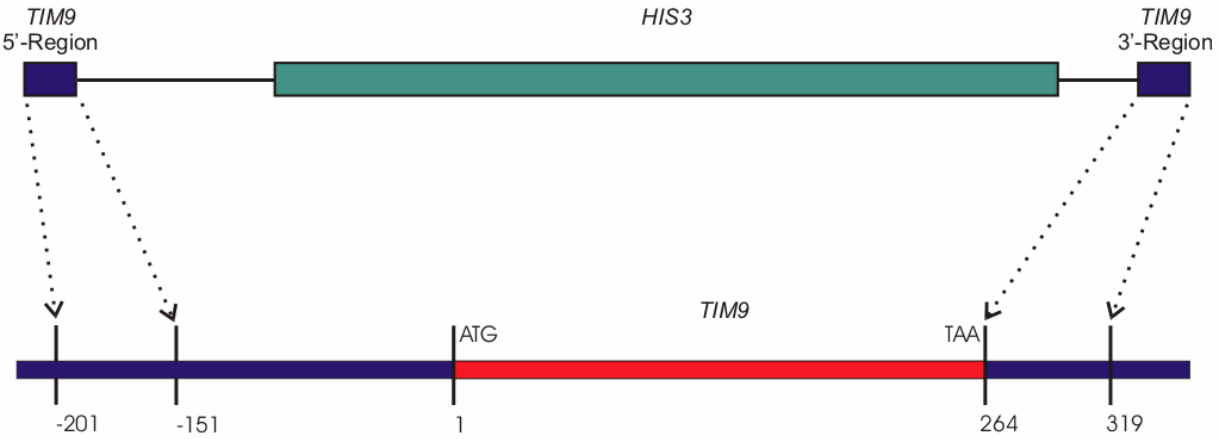


Abb. 25: ***TIM9-HIS3*-Rekombinationskassette**
Der ORF von *TIM9* und 151 Basen des Promotors strangaufwärts davon wurden analog zu *TIM8* durch das *HIS3*-Gen ersetzt. Dabei wurde auch hier zur homologen Rekombination ein Bereich von 50 Basen der 5'-nicht kodierenden Region (-201 bis -151) und ein Bereich von 55 Basen ab dem Stopp-Codon strangabwärts verwendet.

Nach Sporulation wurde ebenfalls eine Tetradenanalyse durchgeführt. Es waren lediglich zwei von den vier getrennten Sporen auf YDP-Vollmedium lebensfähig (Abbildung 26).

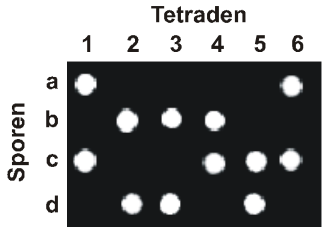


Abb. 26: **Zwei von vier Tetraden eines *TIM9*/Δ*tim9* – Hefestammes sind lebensfähig**
Die Tetradenanalyse des diploiden MB2-Stammes nach der Disruption eines *TIM9*-Allels mit dem HIS3-Auxotrophiemarkers und anschließender Sporulation zeigt jeweils nur Wachstum von zwei der vier möglichen Sporen auf YPD-Medium.

Die Feststellung, ob in den gewachsenen Kolonien das *TIM9*-Gen durch das *HIS3*-Gen ersetzt worden war, wurde mit PCR durchgeführt. Würden die Sporen das *TIM9*-Allel bzw. das *HIS3*-

Gen enthalten, dann ließe sich mit spezifischen Primern ein PCR-Fragment entsprechender Größe für das *TIM9*-Gen bzw. das *HIS3*-Gen aus den Hefezellen amplifizieren und mittels Agarose-Gelelektrophorese detektieren. In der PCR wurden nur Amplifikationsprodukte des *TIM9*-Gens nachgewiesen. Damit enthielt jede der gewachsenen Sporen das unveränderte *TIM9*-Gen und nicht das *HIS3*-Gen. Dies stimmte mit der Beobachtung überein, daß keine der Sporen in Abwesenheit von Histidin wachsen konnte (Daten nicht gezeigt).
Da nur Zellen wachsen konnten, die keine Deletion des *TIM9*-Gens aufwiesen, ist Tim9 essentiell für das Wachstum der Hefezelle.

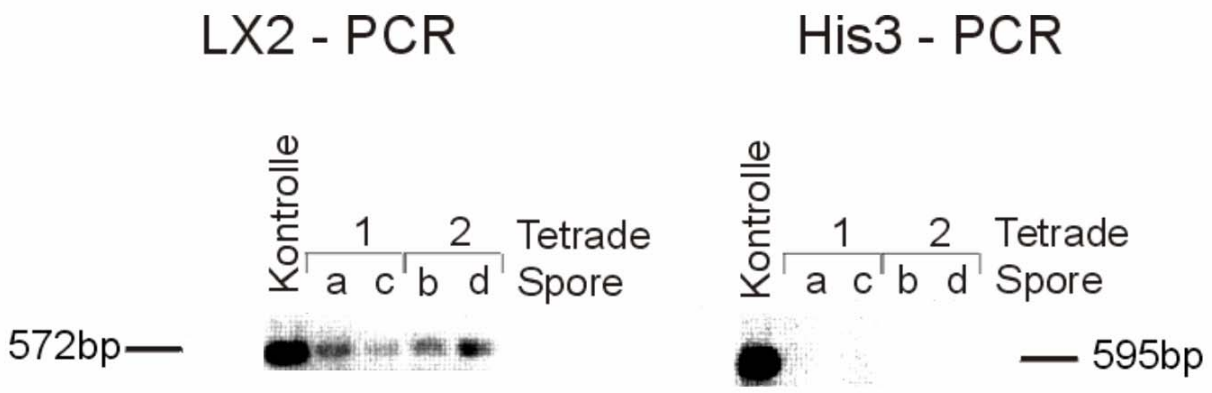


Abb. 27: **Kontrolle der lebensfähigen Sporen auf die Integration der Rekombinationskassette**
Von den Tetraden wurden die zwei lebensfähigen Sporen auf die Anwesenheit der TIM9-Sequenz bzw. der HIS3-Sequenz mittels PCR überprüft. Als Kontrolle diente der diploide Stamm. Es konnte nur in der PCR für das *LX2*-Gen ein Fragment mit der Länge des *LX2*-Gens amplifiziert werden. Die PCR für das *HIS3*-Gen zeigte kein Amplifikationsprodukt aus den Sporen. In allen gestesteten Sporen war damit das *TIM9*-Allel erhalten.

3.3 Mitochondriale Lokalisation von Tim8 und Tim9

Die Verwandtschaft der gefundenen ORFs zu der Familie der mitochondrialen kleinen Tim-Proteine legt die Vermutung nahe, daß die beiden neuen Proteine in Mitochondrien lokalisiert sind. Um einen Hinweis auf die Lokalisation der Proteine *in vivo* zu bekommen, wurde im Folgenden untersucht, ob die *in vitro* synthetisierten Produkte der Gene *TIM8* und *TIM9* in Mitochondrien importiert werden. Dazu wurden beide Gene in einen pGEM4-Vektor kloniert, *in vitro* transkribiert und mittels Retikulozytenlysat unter Anwesenheit von radioaktiv markiertem [^{35}S]-Methionin translatiert. Die synthetisierten Proteine wurden in Anwesenheit des Membranpotentials (+ΔΨ) sowie nach Depletion des Membranpotentials (-ΔΨ) in Mitochondrien importiert und anschließend durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulosemembran und Autoradiographie untersucht.

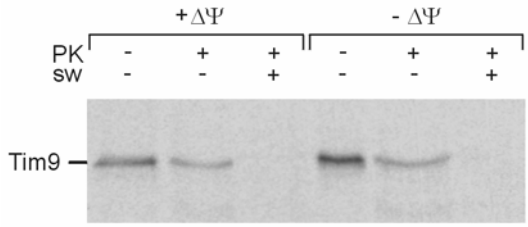


Abb. 28: **Tim9 wird in Mitochondrien unabhängig vom Membranpotential importiert**
In vitro synthetisiertes und mit [^{35}S]-Methionin markiertes Tim9 wurde für 30 min bei 24°C mit isolierten Mitochondrien in Anwesenheit (+ΔΨ) oder nach Depletion des Membranpotentials (-ΔΨ) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze geteilt. Ein Teil blieb unbehandelt, während die anderen Teile mit 100µg/ml Proteinase K (PK) ohne (-sw) und mit (+sw) hypotonem Schwellen zur Öffnung der Außenmembran behandelt wurden. Nach Isolation mittels Zentrifugation wurden die Proben per SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Es zeigte sich, daß beide Proteine nach Zusatz von Proteinase K (PK), die alle nicht-importierten Proteine außerhalb der Mitochondrien abbaut, noch nachweisbar waren: Die Proteine wurden in die Mitochondrien importiert. Nach hypotonem Schwellen der Mitochondrien, um die Außenmembran zu öffnen und den Intermembranraum sowie die Innenmembran für PK zugänglich zu machen, waren Tim8 und Tim9 nicht mehr nachweisbar. Diese Experimente unterstützen, daß Tim8 und Tim9 mitochondriale Proteine sind und vermutlich im Intermembranraum lokalisiert sind.

3.4 Charakterisierung von Tim9

3.4.1 Tim9 interagiert mit Tim10 und Tim12

In einem nachfolgenden Schritt wurde Tim9 funktionell und strukturell charakterisiert, da sein Erfordernis für das Wachstum der Hefe auf eine wichtige Funktion hindeutet.
Wie gezeigt werden konnte, ist Tim9 ebenso wie Tim10 und Tim12 ein mitochondriales Protein. Es ist essentiell für das Wachstum der Hefe und besitzt Sequenzähnlichkeit zu den anderen beiden Tim-Proteinen. Tim10 und Tim12 liegen zusammen in einem Komplex mit Tim22 vor [171]. Eine Wechselwirkung zwischen Tim9 mit diesem Komplex bzw. dessen Komponenten ist demzufolge denkbar. Um eine Interaktion zwischen Tim9 und Tim10 nachzuweisen, wurde eine Co-Immunfällung von Tim10 aus radioaktiv markierten Mitochondrien durchgeführt. Dazu wurden [^{35}S]-markierte Mitochondrien hergestellt. In diesen Mitochondrien wurden alle schwefelhaltigen Proteine, somit auch Tim9, Tim10, Tim12, durch die eingebauten radioaktiv markierten Aminosäuren Cystein und Methionin mittels Autoradiographie detektierbar. Die Mitochondrien wurden mit dem Detergenz Triton X-100 solubilisiert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tim10 durchgeführt. Drei radioaktiv markierte Proteine fanden sich im Präzipitat (Abbildung 29). Diese Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und zeigten ein Laufgeschwindigkeit, die

einer Molekülgröße von etwa 10kDa, 11kDa und 12kDa entspricht. Mittels Immundekoration konnte das 10kDa und das 12kDa Protein als Tim10 und Tim12 identifiziert werden.

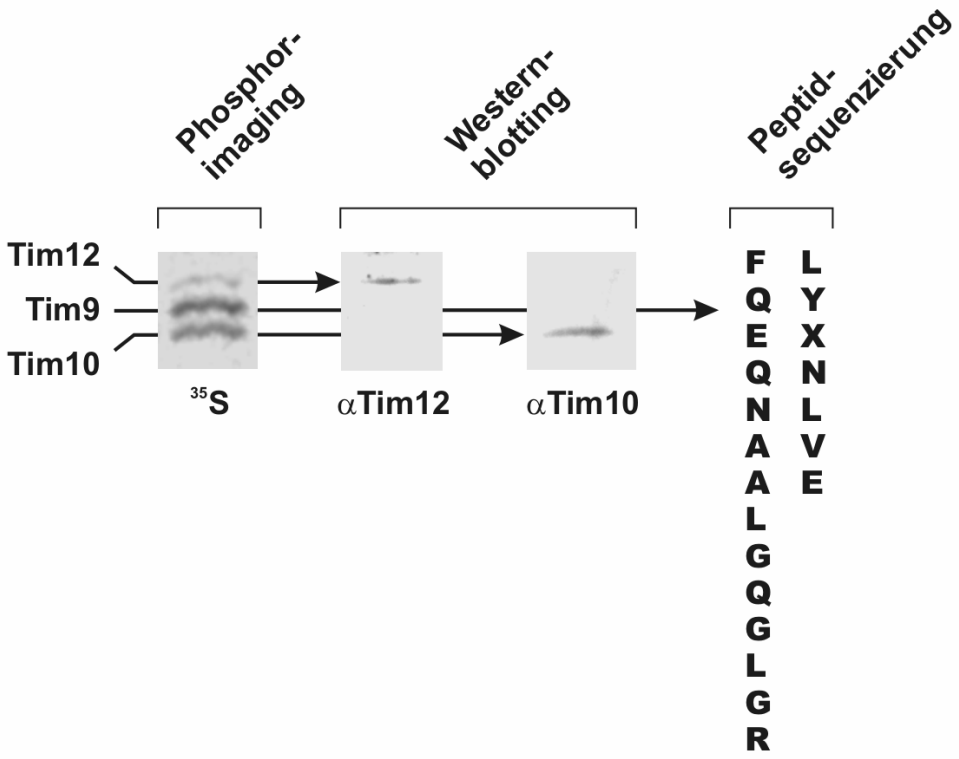


Abb. 29: **Tim9 interagiert mit Tim10 und Tim12**
[^{35}S]-markierte Mitochondrien und nicht-markierte Mitochondrien aus Hefe wurden in Triton X-100 (1% w/v) solubilisiert und mit Antiserum gegen Tim10 immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit SDS/Harnstoff-PAGE, Phosphorimaging (linke Spuren) und mit Westernblotting mit Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim10 und Tim12 (rechte Spuren) untersucht. Die Bande mit Tim9 wurde nach präparativer Immunopräzipitation von 1 mg mitochondrialer Proteine ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die Aminosäuresequenzierung ergab zwei Proteinfragmente, die Teile der Tim9-Sequenz sind.

Das 11kDa große Protein wurde aus dem Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und die Peptide anschließend sequenziert (C. Sirrenberg). Es wurden zwei Peptidsequenzen identifiziert, die beide in der gefundenen Sequenz von Tim9 enthalten sind.
Die Ergebnisse zeigen, daß Tim9 mit Tim10 und Tim12 einen Komplex in Hefemitochondrien bildet.

3.4.2 Herstellung spezifischer Antiseren gegen Tim9

Um Tim9 mit immunologischen Methoden nachweisen zu können, wurden Antikörper gegen Tim9 hergestellt. Die Gewinnung der Antikörper erfolgte durch Immunisieren von Kaninchen mit einem an ein Trägermolekül gekoppeltes Peptid aus Tim9 und anschließender Aufarbeitung des Serums mit Reinigung der Antikörper.
Als Oligopeptid wurden die ersten zwölf Aminosäuren aus Tim9 mit einem zusätzlichen Cystein am C-terminalen Ende synthetisiert. Über das Cystein wurde das Peptid an das

Trägermolekül Ovalbumin gekoppelt und für mehrmaliges Immunisieren der Kaninchen verwendet.

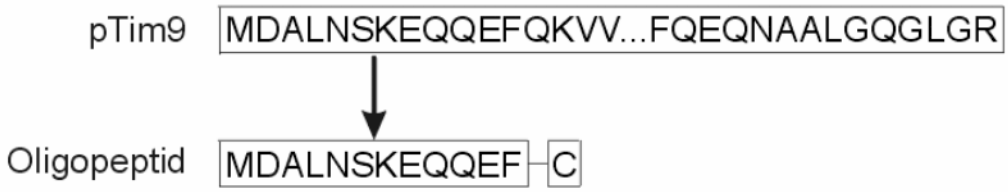


Abb. 30: **Synthetisches Oligopeptid aus Tim9**

Das erhaltene Serum wurde durch Immundekoration von auf Nitrocellulose transferiertem, über SDS-PAGE aufgetrenntem mitochondrialem Gesamtprotein getestet. Es zeigte sich jedoch nur eine geringe Tim9-Antikörperreaktion (Abbildung 31, links), neben verschiedenen Reaktionen anderer im Serum enthaltener Antikörper. Zur Verbesserung der Spezifität wurde das Serum über eine Tim9-Oligopeptid-Säule affinitätsgereinigt. Die erhaltene gereinigte Antikörperlösung wurde wiederum mittels Immundekoration von mitochondrialem Gesamtproteinextrakt getestet (Abbildung 31, rechts). Die gereinigten Antikörper reagierten wesentlich spezifischer als Serum und es traten nur zwei Kreuzreaktion mit deutlich größeren Proteinen (ca. 20kDa und 30kDa) auf. Diese beeinträchtigten die nachfolgenden Untersuchungen auf Grund der zu Tim9 unterschiedlichen Größe aber nicht wesentlich.

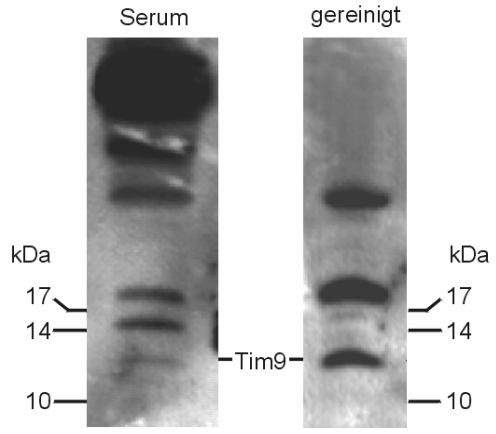


Abb. 31: **Affinitätsreinigung des Tim9-Antiserums**
Um die geringe Spezifität des Tim9-Antiserums zu verbessern, wurde das Serum über eine Tim9-Peptid-Sepharose-Säule gereinigt. Serum bzw. gereinigte Tim9-Antikörperfraktion wurde danach eine Immundekoration von 50 µg Mitochondrien getestet, die über ein SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen wurden. Es zeigten sich im affinitätsgereinigtem Serum weniger unspezifische Banden und eine stärkere Markierung von Tim9.

3.4.3 Auswirkungen der verminderten Tim9-Expression

3.4.3.1 Tim9-Expression ist unter Kontrolle durch den gal10-Promotor regulierbar

Da Tim9 essentiell für das Wachstum der Hefe ist, konnte kein Deletionsstamm zur funktionellen Analyse von Tim9 erzeugt werden. Statt dessen wurde ein Hefestamm generiert, der die verminderte Expression von Tim9 ermöglicht. Die Auswirkungen der verminderten Tim9-Expression sollten analysiert werden, um Hinweise auf die Funktion des Proteins zu liefern.

Zur Expressionskontrolle des *TIM9*-Gens wurde der gal10-Promotor verwendet, der entsprechend der Galaktosekonzentration im Medium die Transkription steuert [169, 171]. Der haploide, für Leucin auxotrophe Stamm MB2 wurde dazu mit einer Rekombinationskassette transformiert, die den gal10-Promotor aus *S.c.*, das *LEU2*-Gen als Marker, sowie homologe Abschnitte zur 5'- und 3'-Region des *TIM9*-Gens enthielt. Durch homologe Rekombination wurde die Rekombinationskassette an Stelle des endogenen Promotors von *TIM9* in das Genom integriert. Zur Selektion der Zellen wurde Leucin-freies, galaktosehaltiges Medium verwendet. Diejenigen, in denen die Rekombination erfolgreich war, waren prototroph für Leucin und wuchsen auf dem Selektionsmedium. Diese Zellen werden im Folgenden als Tim9(gal10) bezeichnet.

Zur Kontrolle des Tim9(gal10)-Stammes auf die Integration des gal10-Promotors vor das *TIM9*-Gen wurden zwei Kulturen zuerst in galaktosehaltigem Medium angesetzt und bis zu einer OD von 1.0 gewachsen. Danach wurden die Zellen gewaschen und eine Kultur in galaktosehaltigem (Tim9↑), die andere in galaktosefreiem (Tim9↓) Medium inkubiert. Nach einem Tag wurden aus den Zellen Mitochondrien präpariert. Gleiche Proteinmengen an Mitochondrien wurden mit SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulosemembran und Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim9 und Tim12 untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp (wt) wurde in Tim9↑-Mitochondrien ein höherer, in Tim9↓-Mitochondrien ein niedrigerer Gehalt an Tim9 nachgewiesen. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen diente das Intermembranraumprotein Tim12. In allen Spuren wurden gleiche Mengen an Tim12 nachgewiesen. Dies Ergebnis bestätigt, daß die Expression von Tim9 des Tim9(gal10)-Stammes von der Kohlenstoffquelle Galaktose reguliert wird. Die Integration des gal10-Promotors hat an der richtigen Stelle vor *TIM9* stattgefunden.

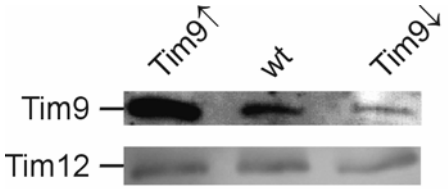


Abb. 32: **Tim9 ist in Mitochondrien nachweisbar und die Expression ist in dem Tim9(gal10)-Stamm regulierbar**
Nach Anfertigen eines MB2-Hefestammes, dessen Expression von Tim9 unter der Kontrolle des gal10-Promotors steht, wurden gereinigte Mitochondrien aus Kulturen mit (Tim9↑) und ohne (Tim9↓) Galaktose präpariert. Es wurden gleiche Mengen Mitochondrien (50 µg) mit SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen Tim9 untersucht. Als Vergleich dienten Mitochondrien des wt-Stamms. Immunoblotting mit Antikörpern gegen Tim12 zeigte, daß gleiche Proteinmengen pro Spur geladen wurden.

3.4.3.2 Repression des Tim9-Gens ist für Hefezellen letal

Zur Analyse des Wachstums wurden Zellen des Tim9(gal10)-Stammes in galaktosehaltiges Flüssigmedium überimpft und für einen Tag bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Kultur zweimal gewaschen und zur Hälfte in ein galaktosefreies bzw. in ein galaktosehaltiges (0.5%) Lactatmedium übertragen. In Anwesenheit von Galaktose im Medium wuchsen die Tim9(gal10)-Zellen wie die des Wildtyp-Stammes (Daten nicht gezeigt). In galaktosefreiem Medium kam das Wachstum der Zellen binnen drei bis vier Tagen nahezu vollständig zum Stillstand. Dieses Wachstumsverhalten bestätigte, daß Tim9 essentiell für die Hefezelle ist.

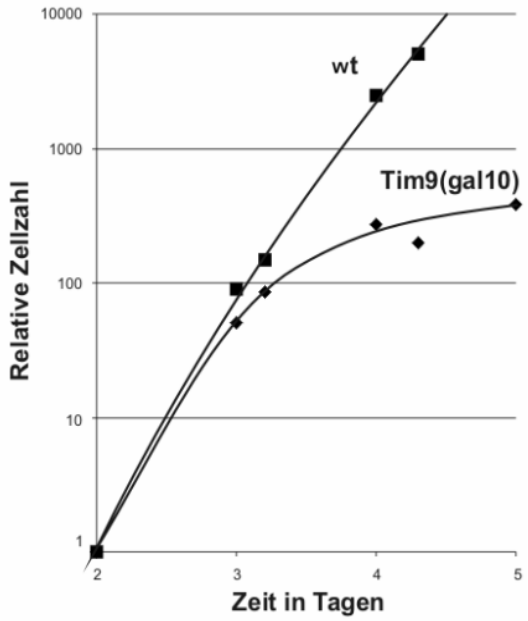


Abb. 33: **Tim9 ist für das Wachstum der Hefezellen essentiell**
Haploide Hefezellen, deren *TIM9*-Gen unter der Kontrolle des gal10-Promotors steht, Tim9(gal10), zeigen bei Wachstum auf galaktosefreiem Medium ein Wachstumsstillstand nach etwa 4 Tagen. Ein als Kontrolle parallel gezogener Wildtyp-Stamm (wt) wächst logarithmisch weiter. Die relative Zellzahl wurde durch Absorption bei einer Wellenlänge von λ=600 nm bestimmt. Zum Zeitpunkt Tag 2 wurde die Zellzahl gleich 1 gesetzt.

3.4.3.3 Tim9 ist für die Stabilität von Komponenten des TIM22-Komplexes notwendig

Für die mit Tim9 interagierenden kleinen Tim-Proteine, Tim10 und Tim12, ist gezeigt, daß sie zur Stabilisierung von Tim22 in den Mitochondrien notwendig sind [171]. Es wurde untersucht, ob die verminderte Expression von Tim9 die endogenen Mengen an mitochondrialen Proteinen der Innenmembrantranslokasen ebenfalls beeinflußt. Mitochondrien wurden dazu von Tim9(gal10)- und Wildtyp (wt)-Zellen, die zuvor zwei Tage auf galaktose-freiem Medium gewachsen waren (Tim9↓), isoliert. Zu diesem Zeitpunkt wuchsen die Tim9(gal10)-Zellen noch wie der Kontroll-Stamm. Die Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulosemembran und Immundekoration auf den Gehalt an bestimmten Proteinen untersucht.

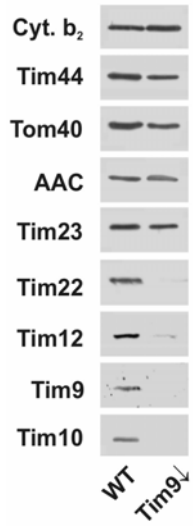


Abb. 34: **Verringerte Mengen an Tim9 führen zum Verlust an Komponenten des TIM22-Importweges** Zellen des Tim9(gal10)-Hefestamms wurden für 2 Tage auf galaktosefreiem Medium gezogen. Die daraus präparierten Mitochondrien wurde auf ihren Gehalt an den bezeichneten Proteinen mittels SDS-PAGE und Immundekoration untersucht. (Cyt b_2: Cytochrom b_2; AAC: ADP/ATP-Transporter)

Dabei zeigte sich, daß Tim9↓-Mitochondrien normale Mengen an Tom40, einem Protein der Außenmembran, Cytochrom b_2, einem Protein des Intermembranraums, und Tim44, einem Protein der Matrix, enthielten. Des weiteren waren die Mengen des ADP/ATP-Carrier und des Tim23 normal. Tim9↓-Mitochondrien wiesen jedoch geringere Mengen an Tim9, Tim10, Tim12 und Tim22 auf. Das zeigt, daß Tim9 benötigt wird, um normale Mengen der Komponenten des Tim22-abhängigen Importweges zu erhalten.

3.4.3.4 Import von Carrier-Proteinen benötigt Tim9

Tim9↓-Mitochondrien wurden auf ihr Vermögen untersucht, mitochondriale Vorstufenproteine *in vitro* zu importieren. Dazu wurden Tim9(gal) Zellen zwei Tage auf galaktosefreiem Medium kultiviert und Mitochondrien (Tim9↓) aus diesen präpariert. Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden in Retikulozytenlysat synthetisiert und mit energetisierten Tim9↓- bzw. Wildtyp-Mitochondrien inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien auf den Gehalt an importierten Proteinen mittels SDS-PAGE, Autoradiographie und Quantifizierung mittels Densitometer analysiert (Abbildung 35). Vorstufenproteine mit einem abspaltbaren N-terminalen Matrixsortierungssignal wurden in Tim9↓-Mitochondrien über den TIM23-Komplex importiert und korrekt in die entsprechenden Subkompartimente sortiert. Als Matrixproteine wurden verwendet: Su9(1-79)DHFR (Fusionsprotein aus den die Präsequenz enthaltenden ersten 79 Aminosäureresten der F_0-ATPase-Untereinheit 9 aus *Neurospora crassa* und der Dihydrofolatreduktase aus *Mus musculus*) und Cyt $b_2\Delta$19(1-167)DHFR (Fusionsprotein aus Cytochrom b_2 mit inaktiviertem Intermembranraumsortierungssignal und

DHFR). Als Proteine der Innenmembran wurde verwendet: Cyt c_1-DHFR (Fusionsprotein aus Cytochrom c_1 und DHFR).
Im Gegensatz dazu konnten Proteine, die den TIM22-Importweg benutzen (z.B. der ADP/ATP-Transporter (AAC), der Phosphattransporter (PiC), und Mrs3, ein Mitglied der mitochondrialen Transporterfamilie [192]), nur mit sehr reduzierter Effizienz in Tim9↓-Mitochondrien importiert werden (Abbildung 35).
Tim9 wird damit spezifisch für den Import von Vorstufenproteinen über den Tim22-abhängigen Weg benötigt.

Im Folgenden wurde untersucht, auf welcher Importstufe Tim9 arbeitet. Dazu wurde das Vorstufenprotein des ADP/ATP-Transporters (AAC) unter Anwesenheit und nach Depletion des Membranpotentials ($\Delta\psi$) importiert (Abbildung 36). Bei vorhandenem Membranpotential war der AAC in wt-Mitochondrien, nach Zugabe höherer Konzentrationen von PK, vor der Protease geschützt. Das beweist einen effizienten Transport über die äußere Membran. Wurde bei diesen Mitochondrien durch hypotones Schwellen selektiv die Außenmembran zerstört und anschließend mit PK behandelt, so wurde der AAC durch die Protease zu einem Fragment (f) geschnitten. Die Entstehung dieses PK-geschützten Fragmentes beweist, daß der AAC in die mitochondriale Innenmembran inseriert worden war [142-144, 169]. In Abwesenheit von $\Delta\psi$ war der AAC bei Behandlung der Mitochondrien mit PK teilweise geschützt und wurde nur zu einem geringen Anteil zu einem Fragment (f*) abgebaut. Dagegen wurde der AAC nach Schwellen der Mitochondrien vollständig durch die Protease verdaut. Das deutet auf eine Ansammlung des AAC auf Stufe 3 des Imports hin. Auf dieser Stufe ist der AAC größtenteils über die Außenmembran transloziert, aber noch nicht in die mitochondriale Innenmembran inseriert.
Inkubiert man AAC-Vorstufenprotein mit Tim9↓-Mitochondrien, bindet der AAC effizient an die Mitochondrien. Aber bei Behandlung der Mitochondrien mit PK wird der AAC sowohl in Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von $\Delta\psi$ vollständig abgebaut. Das zeigt, daß AAC nicht die Stufe 3 des Imports erreicht, wenn den Mitochondrien Tim9 fehlt. Tim9 ist für den vollständigen Import von AAC über die Außenmembran notwendig.

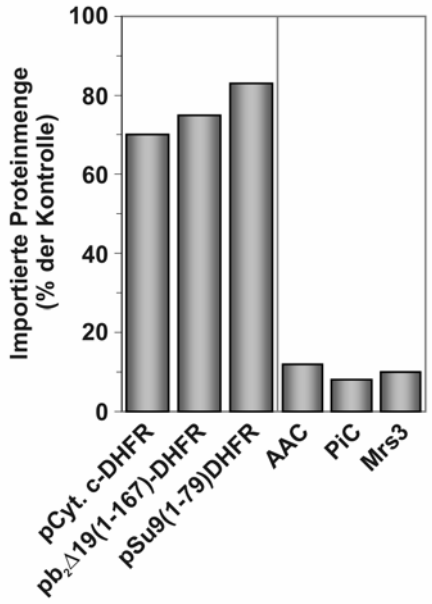


Abb. 35: **Tim9 wird für den Import von Transporterproteinen benötigt**
Radioaktiv markierte Vorstufenproteine mit einem Matrixsortierungssignal (pCyt. c_1-DHFR, pSu9(1-79)DHFR, $pb_2\Delta19$(1-167)DHFR und Vorstufen mitochondrialer Transporter, wie der ADP/ATP-Transporter (AAC), Phosphat-Transporter (PiC) und Mrs3, wurden in wt- und Tim9↓-Mitochondrien bei vorhandenem Membranpotential importiert. Die Mitochondrien wurden mit Proteinase K (PK) behandelt, mit SDS-PAGE und anschließendem quantifizierendem Phosphorimaging-Verfahren untersucht. Der Import in Tim9↓-Mitochondrien ist als Prozentsatz des Imports in wt-Mitochondrien angegeben.

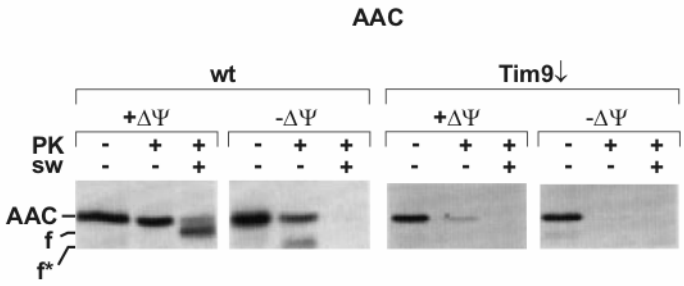


Abb. 36: **Tim9 ist am Transport von Vorstufenproteinen über die Außenmembran beteiligt**
Isolierte wt- und Tim9↓-Mitochondrien wurden in Anwesenheit (+ΔΨ) und nach Depletion (-ΔΨ) des Membranpotentials für 30 min mit [^{35}S]-markiertem AAC inkubiert. Nach Import mit ΔΨ wurde der Ansatz gedrittelt. Ein Teil blieb unbehandelt, die anderen Teile wurden ohne (-sw) und mit (+sw) hypotonem Schwellen, zur Öffnung der Außenmembran, mit Proteinase K (200µg/ml) behandelt. Die Proben wurden nach Isolation mittels Zentrifugation durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Nach Import ohne ΔΨ wurden die Proben mit einer geringeren Konzentration an PK (30µg/ml) in entsprechender Weise behandelt und ausgewertet. Das dabei gebildete Fragment (f*) zeigte das Erreichen der Stufe 3 des Imports an.
(p: Vorstufenform, *precursor*; f: Fragment des AAC, welches in Mitoplasten entsteht, wenn der AAC in die Innenmembran inseriert ist; f^*: Fragment des AAC in Stufe 3, bei unvollständiger Insertion in die Innenmembran).

3.4.4 Organisation von Tim9, Tim10, Tim12

3.4.4.1 Lokalisierung von Tim9 im Subkompartiment

Importversuche in isolierte Mitochondrien haben ergeben, daß Tim 9 nach Import über die Außenmembran außerhalb der Matrix lokalisiert ist (siehe 3.3). Um unterscheiden zu können, ob Tim9 ebenso wie Tim10 hauptsächlich im Intermembranraum vorhanden ist, oder ob es wie Tim12 mit der Innenmembran assoziiert ist, wurde eine Hochsalzextraktion mit Mitoplasten durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien zunächst mit radioaktiv markiertem Tim9 inkubiert und anschließend in hypotonem Puffer zu Mitoplasten geschwollen. Die Mitoplasten wurden dann entweder unbehandelt gelassen oder einer Hochsalzbehandlung mit einer 0.5 M NaCl-Lösung unterzogen, um die peripheren Membranproteine abzulösen. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation reisoliert und die Proteine der Membranfraktion und des Überstandes nach TCA-Fällung untersucht.

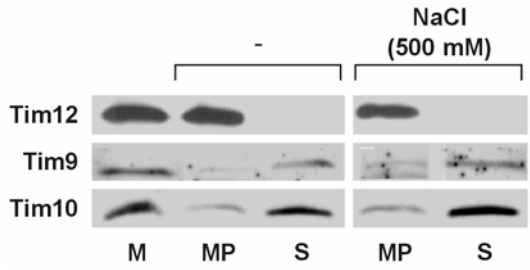


Abb. 37: **Tim9 liegt in einem membranassoziierten Komplex mit Tim12 und Tim10 vor**
Mitochondrien wurden mit SEM-Puffer gewaschen und durch Schwellen mit 10 mM HEPES-KOH pH 7.2 zu Mitoplasten konvertiert. Nach Teilung der Proben wurde eine Hälfte mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 1 M NaCl 10mM HEPES-KOH pH 7.2 versetzt, die andere mit dem gleichen Volumen 10 mM HEPES-KOH pH 7.2. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation reisoliert. Die Fällung der Proteine des Überstandes erfolgte mit TCA. Anschließend wurden die Mitochondrien und Mitoplasten mit 10 mM HEPES-KOH pH 7.2 gewaschen und mit Auftragspuffer solubilisiert. Mitochondrien (M), Mitoplasten (MP) und der TCA-gefällte Überstand (S) wurden dann mit SDS-PAGE und Westernblotting auf die angegebenen Proteine untersucht.

Tim12 wurde ausschließlich in der Fraktion der mitochondrialen Membranen gefunden. Es konnte nicht durch Waschen mit einer 0.5M NaCl-Lösung von ihnen abgelöst werden. Tim12 liegt demnach eng mit den Mitoplasten assoziiert vor [171]. Der größte Teil von Tim10 wurde nach Schwellen der Mitochondrien in der löslichen Intermembranraumfraktion detektiert; ein kleiner Teil blieb jedoch an den Mitoplasten gebunden. Dieser Anteil konnte auch nicht durch Inkubation mit einer 0.5M NaCl-Lösung von der Membran entfernt werden. Tim9 verhielt sich wie Tim10: der größte Teil wurde durch die Erzeugung von Mitoplasten in den Überstand freigesetzt, nur ein kleiner Teil blieb - unabhängig von der Hochsalzbehandlung - mit der Membran assoziiert. Es gibt folglich eine Spezies von Tim12, aber offensichtlich zwei Spezies von Tim9 und Tim10. Die eine Spezies, die den größeren Anteil an beiden Proteinen ausmacht, wird durch Öffnen des Intermembranraumes leicht freigesetzt, wohingegen die andere eng an

die Mitochondrienmembran gebunden ist und sich nicht in der löslichen Membranfraktion befindet.

3.4.4.2 Tim9 ist Teil eines 70kDa und eines 300kDa Proteinkomplexes

Zwei Spezies von Tim9 lassen sich, wie gezeigt, auf Grund ihrer Lokalisierung in Mitochondrien unterscheiden: eine im Intermembranraum lösliche Form und eine mit der Innenmembran assoziierte Form. Es stellt sich die Frage, welchen nativen Zustand diese beiden Formen von Tim9 aufweisen und wie sie mit den anderen Tim-Proteinen des Intermembranraumes, Tim10 und Tim12, strukturell organisiert sind. Dazu wurden wt-Mitochondrien von Zellen, die durch Aufzucht in [^{35}S]-Sulfat-haltigem Medium metabolisch radioaktiv markiert worden sind, mit 1% Digitonin solubilisiert. Unter diesen Bedingungen ist der TIM22-Komplex stabil [169, 171]. Das Solubilisat wurde mittels Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen per Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tim10 untersucht (Abbildung 36).
Tim22 eluierte von der Gelfiltrationssäule in der Fraktion, die einem Molekulargewicht von 300kDa entspricht (Daten nicht gezeigt). Tim12 wurde ebenfalls in der 300kDa Fraktion gefunden. Dies bestätigte frühere Ergebnisse, die eine Assoziation von Tim12 mit Tim22 nachgewiesen haben [85, 171]. Im Gegensatz dazu konnten nur etwa 20% von Tim9 und Tim10 in der 300kDa-Fraktion detektiert werden. Das restliche Tim9 und Tim10 eluierte in einer Fraktion, die einer Größe von etwa 70kDa entspricht.
Mitochondrien von Zellen mit einem verminderten Gehalt an Tim22 (Tim22↓) [169] wurden mittels einer Gelfiltration analysiert. Dabei fanden sich Tim9, Tim10, Tim12 ausschließlich in der 70kDa-Fraktion. Des weiteren wurden Tim12, Tim10, Tim9 in einem 70kDa-Komplex gefunden, wenn Mitochondrien mit Triton-X solubilisiert wurden, das den TIM22-Komplex zerstört (Daten nicht gezeigt).
Zusammengenommen liegt Tim9 unter nativen Bedingungen in zwei Proteinkomplexen vor: Tim9 interagiert mit Tim10 in einem 70kDa-Komplex und es bildet mit Tim10, Tim12 und Tim22 einen 300kDa-Komplex. In TX-100 wird der 300kDa-Komplex zerstört und es wird ein weiterer 70kDa-Komplex detektiert: er enthält zusätzlich zu Tim9 und Tim10 noch Tim12.

3.4.4.3 Stöchiometrie der 70kDa-Komplexe

Die Zusammensetzung der 70kDa-Komplexe wurde näher untersucht. Zuerst wurden radioaktiv markierte Mitochondrien mit Triton-X solubilisiert und anschließend immunopräzipitiert. Antikörper, die gegen Tim12 und Tim10 gerichtet waren, präzipitierten die gleiche Kombination dreier radioaktiv markierter Proteine (Abbildung 39 B). Eine immunologische Identifikation zeigte, daß es sich bei diesen drei Proteinen um Tim9, Tim10 und Tim12 handelte (Daten nicht gezeigt). Die Mengenverhältnisse und die Stöchiometrie von Tim9, Tim10 und Tim12 waren in den beiden Immunopräzipitaten unterschiedlich. Tim10-Antikörper fällten Tim12 vollständig aus dem Mitochondrienextrakt. Tim12-Antikörper vermochten

Tim10 dagegen nicht vollständig zu fällen. Das bestätigte die Vermutung, daß es zwei Arten der 70 kDa-Komplexe mit unterschiedlicher Zusammensetzung gibt.
Die molaren Verhältnisse der Untereinheiten der 70kDa Komplexe wurden bestimmt, indem die präzipitierten Tim-Komponenten mit Hilfe eines Phosphorimaging Systems quantifiziert wurden [170]. Die Werte wurden entsprechend des Gehaltes der drei Proteine an radioaktiven Methionin- und Cystein-Resten korrigiert. Es ergaben sich in den Immunopräzipitaten von Tim12 für die molaren Verhältnisse von Tim12:Tim10:Tim9 die Werte von ca. 1 : 2.1 : 3.2. Bei der Präzipitation mit Tim10-Antikörpern, ergab sich dagegen ein Verhältnis von etwa 1 : 9.4 : 12.8 für Tim12:Tim10:Tim9. Da die Mitochondrien mit Detergenz solubilisiert wurden, fällten Tim10-Antikörper sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form der 70kDa Komplexe. Der größte Teil von Tim10 war nicht fest mit der Mitochondrienmembran assoziiert. Um diese Fraktion zu untersuchen, wurden radioaktiv markierte Mitochondrien in hypotonem Puffer inkubiert, um die äußere Membran zu zerstören. Die Mitochondrien-membranen wurden durch Zentrifugation entfernt und die löslichen Tim-Proteine des Intermembranraums durch Immunopräzipitation analysiert (Abbildung 39 B). Antikörper gegen Tim10 und Tim9 fällten jeweils Tim9 und Tim10, aber kein Tim12. In beiden Immunopräzipitaten lagen Tim9 und Tim10 in einem molaren Verhältnis von 1:1.1 vor.
Insgesamt deuten die Daten darauf hin, daß Mitochondrien zwei Formen von 70kDa Komplexen besitzen, die jeweils aus sechs Untereinheiten aufgebaut sein könnten. Der TIM9-10-12 Komplex besteht aus Tim9, Tim10 und Tim12 und ist fest mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert. Der TIM9-10-Komplex enthält Tim9 und Tim10, aber kein Tim12. Er scheint in deutlich höheren Mengen als der TIM9-10-12-Komplex vorzukommen und im Intermembranraum frei beweglich zu sein.

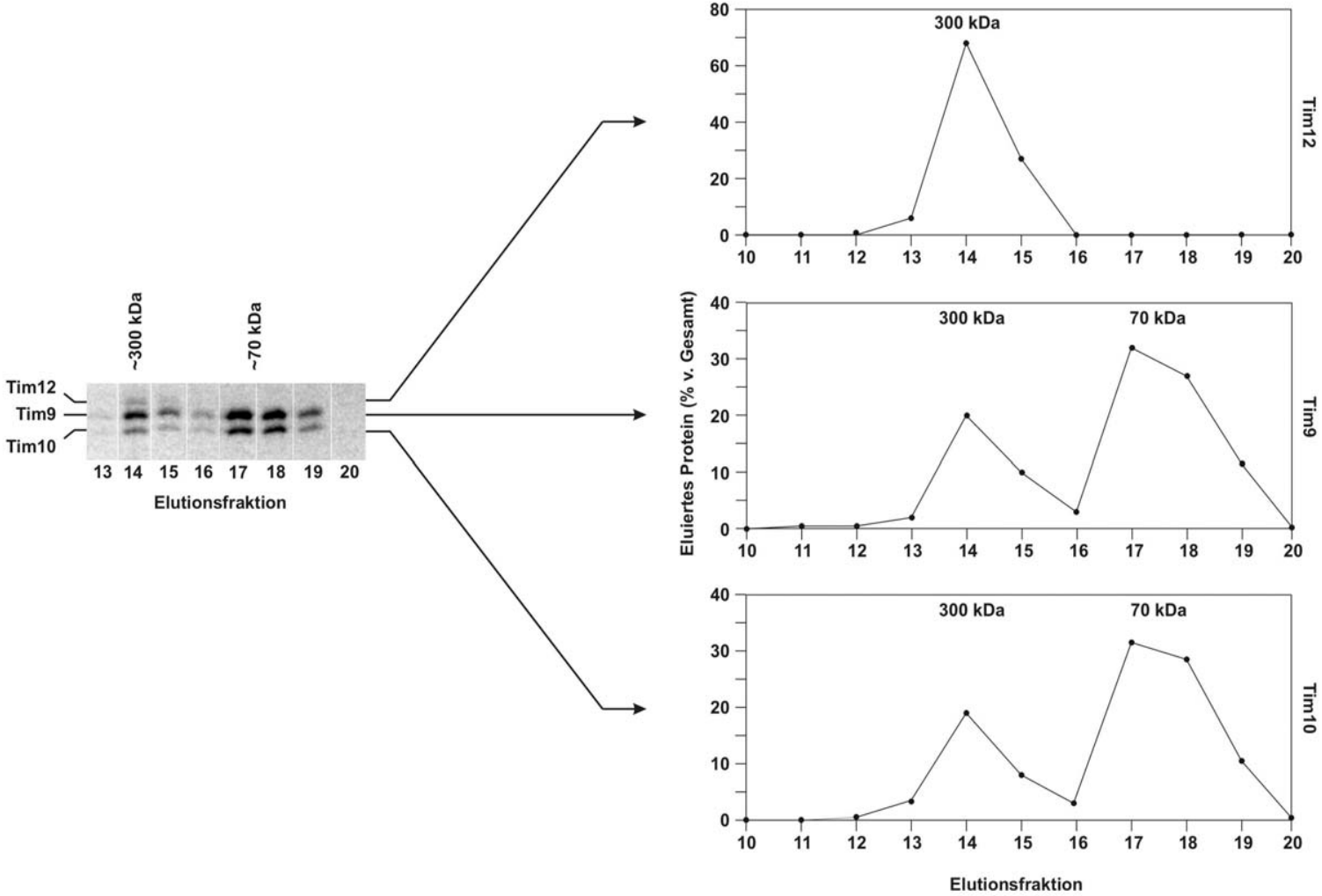
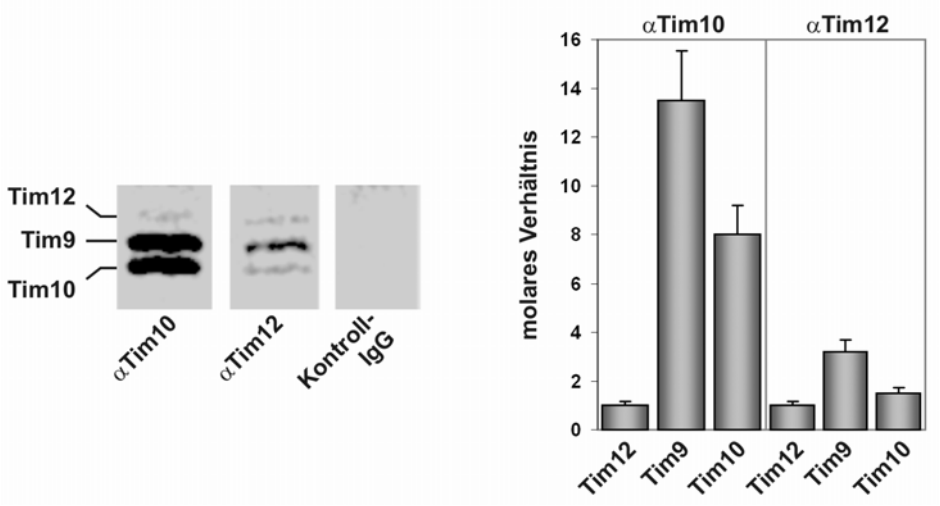


Abb. 38: **Gelfiltration**
Radioaktiv markierte Mitochondrien wurden in 1% Digitonin solubilisiert, von Membranbruchstücken durch Zentrifugation gereinigt und chromatographisch über eine Superose 6-Säule aufgetrennt (25 ml Laufvolumen, 0.2 ml/min). Die gewonnenen Fraktionen wurden einer Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Tim10 unterzogen. Die Untersuchung der Präzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Quantifizierung durch ein Phosphorimaging-Verfahren. Die Säule wurde mit folgenden Größenstandards geeicht: Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa). Die angegebenen Komplexgrößen wurden über die mit Standards erhaltene Eichgerade bestimmt.

A



B

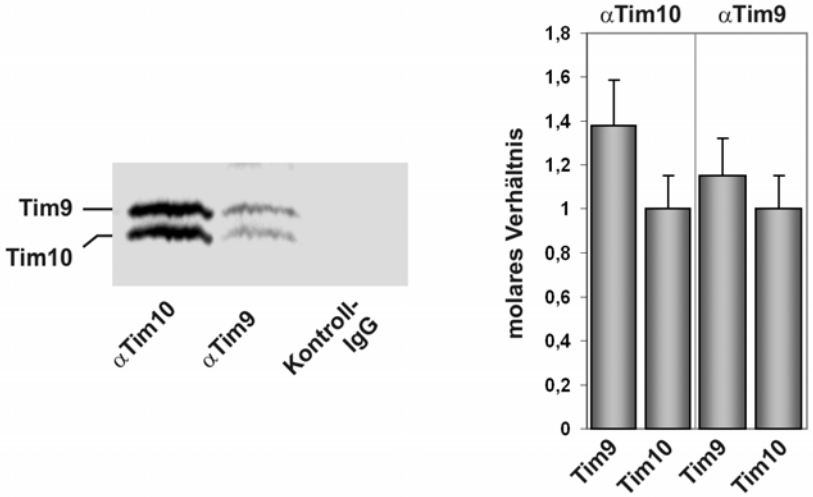


Abb. 39: **Tim9 liegt in zwei Komplexen vor: Tim9-10-12-Komplex und Tim9-10-Komplex**
(**A**) Radioaktiv markierte Mitochondrien wurden mit Triton X-100 (1% w/v) solubilisiert und mit Antikörpern gegen Tim12 und Tim10 immunopräzipitiert. Als Kontrolle wurden IgGs mit anderer Spezifität verwendet. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE und quantifizierendem Phosphorimaging-Verfahren untersucht. Zur Bestimmung der molaren Verhältnisse der Proteine wurden die Werte entsprechend des Gehalts an radioaktiv markierten Aminosäuren korrigiert. Die von Antikörpern gegen Tim12 präzipitierte Menge an Tim12 wurde zur Normierung der Werte als 1 gesetzt. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung von fünf Immunopräzipitationen.
(**B**) Radioaktiv markierte Mitochondrien wurden durch Schwellen in 10 mM HEPES-KOH pH 7.5 zu Mitoplasten konvertiert. Die Mitoplasten wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit Antikörpern gegen Tim10 und Tim9 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden wie in (A) untersucht. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert aus zwei Immunopräzipitationen. Die Menge an Tim10 in den Präzipitaten wurde gleich 1 gesetzt.

4 Diskussion

Der größte Teil der mitochondrialen Proteine ist nicht in der Organelle, sondern im Kern der eukaryontischen Zelle kodiert. Nach der Synthese dieser Proteine müssen sie aus dem Cytosol in die verschiedenen Kompartimente der Mitochondrien transportiert werden. Nach Translokation über die Außenmembran erfolgt die weitere Translokation mittels zweier Translokationskomplexe der Innenmembran. Proteine, die ein typisches Matrixsortierungssignal besitzen, werden über den TIM23-Komplex in die Matrix transportiert oder in die Innenmembran inseriert. Proteine, die ein internes Sortierungssignal tragen, werden über den TIM22-Komplex in die Innenmembran inseriert. In diesem Importweg vermitteln zwei Chaperone des Intermembranraums, Tim10 und Tim12, die Übergabe des Vorstufenproteins vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex.
In dieser Arbeit wurden durch einen bioinformatischen Ansatz mit Tim8 und Tim9 neue Komponenten des TIM22-Importweges identifiziert und die essentielle Komponente Tim9 strukturell und funktionell charakterisiert.

4.1 Entwicklung des Suchalgorithmus

Um eine neue Komponente des TIM22-Importweges zu identifizieren, wurde im Hefegenom nach Proteinen mit Motiven gesucht, die für die Intermembranraumproteinen Tim10 und Tim12 charakteristisch sind. Als Suchkriterien sind nur solche Bereiche der bekannten Proteine sinnvoll, die in allen diesen Proteinen konserviert sind. Auffallend in Tim10 und Tim12 sind zwei CX_3C-Motive, die für die Funktion der kleinen Tim-Proteine essentiell sind [104, 137, 153, 171]. Sie bilden vermutlich eine Bindungsstelle für Zn^{2+}-Ionen, da Tim10 und Tim12 diese Metallionen binden können und Zn^{2+} für die Interaktion dieser Proteine mit Substrat nötig zu sein scheint. Verwandte Proteine, mit Aufgaben entsprechend denen von Tim10 und Tim12, könnten durch dieses CX_3C-Motiv und durch vergleichbare Aminosäuremuster innerhalb des Proteins erkennbar sein (Abbildung 40).
Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Suchmaschinen für Genomdatenbanken verfügbar, die eine Suche im Hefegenom nach neuen offenen Leserahmen mit bestimmten Aminosäuremustern ermöglichten. Das speziell für diese Suche entwickelte Computerprogramm erlaubte es, unabhängig von limitierten oder organisierten Datenbanken das Hefegenom in Aminosäuresequenzen umzuschreiben und nach beliebigen Proteinsequenzen und charakteristischen Motiven zu durchsuchen.
Die Entwicklung des neuen Algorithmus erwies sich als erfolgreich, da als Ergebnis der Suche sechs offene Leserahmen im Hefegenom gefunden wurden. Zwei dieser ORFs gehörten zu den bereits identifizierten Proteinen Tim10 und Tim12 [171], was die Signifikanz der gefundenen ORFs bestätigt. Ein weiterer offener Leserahmen kodiert für das in dieser Arbeit charakterisierte Tim9, während zwei zusätzliche die Chaperone Tim8 und Tim13 kodierten [88]. Wie nachfolgende Untersuchungen zeigten, gehören Tim8 und Tim13 auch zu der Gruppe der kleinen Tim-Proteine. Sie interagieren mit dem Translokationsintermediat von

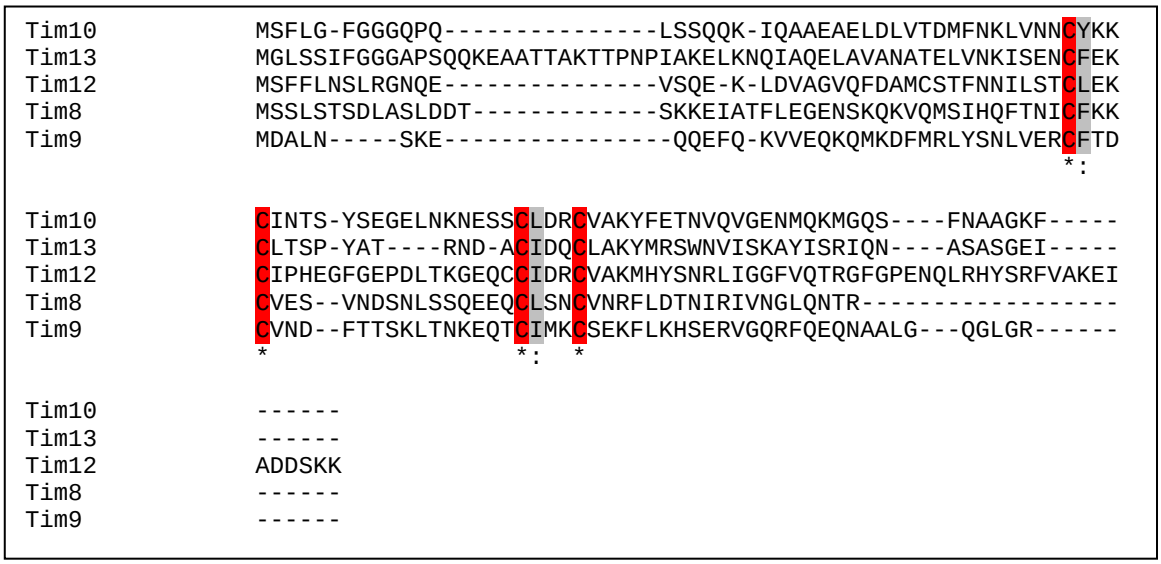


Abb. 40: **Sequenzvergleich der kleinen Tim-Proteine Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13**
Markiert ist das allen gemeinsame CX_3C-Motiv (*) und konservierte Positionen mit hydrophoben Aminosäuren innerhalb des Motivs, die zur Suche verwendet wurden (:).
Die „kleinen Tims“ besitzen eine durchschnittliche Sequenzähnlichkeit der Aminosäuren von etwa 27%.

Tim23 [101] und scheinen bei geringem Membranpotential essentiell für die Translokation dieses Protein zu sein [136, 137].

4.2 Die gefundenen offenen Leserahmen kodieren für mitochondriale Proteine

Der verwendete Suchalgorithmus beurteilte nicht die zum ORF 5’-liegende Region in Hinsicht auf eine mögliche Promotorregion, um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Expression der ORFs geben zu können. Um einen Hinweis für seine Expression zu erhalten, wurde die *expressed sequence tags*–Datenbank [15] verwendet. Sie enthält cDNS-Sequenzen, die aus mRNS verschiedener Organismen hergestellt wurden. Diese mRNS spiegeln die zu einem bestimmten Augenblick von der Zelle exprimierten Gene wider.
In der cDNS-Datenbank des NCBI fanden sich Sequenzen verschiedener Organismen, die eine starke Homologie mit den gefundenen ORFs von Tim8 und Tim9 aufwiesen. Das macht es wahrscheinlich, daß es sich auch bei TIM8 und TIM9 um ORFs handelt, die exprimiert werden. In Importversuchen der *in vitro* transkribierten und durch [^{35}S]-Methionin markierten translatierten Proteine konnte nachgewiesen werden, daß Tim8 und Tim9 in Mitochondrien importiert werden können. Dies bestärkt auch die Annahme, daß die ORFs TIM8 und TIM9 für funktionelle Proteine kodieren.

4.3 Tim 9 ist eine essentielle, neue Komponente der Tim22-Translokase

Die meisten der bisher bekannten Mitglieder des TIM22-Komplexes, Tim22, Tim10, Tim12, sind essentiell für die Hefezelle [77, 78, 82, 85, 169, 171]. Tim10 und Tim12 besitzen 35% Sequenzähnlichkeit zueinander, beide sind im Intermembranraum lokalisiert und können die

Disruption des jeweils anderen nicht ersetzen [77, 78]. Es konnte gezeigt werden, daß beide Proteine für den mitochondrialen TIM22-Importweg notwendig sind [170]. Aus der Homologie von Tim9 zu Tim10 bzw. Tim12, stellte sich die Frage, ob auch diese Komponente essentieller Bestandteil des TIM22-Importweges ist.
Die Depletion des *TIM9*-Gens zeigte, daß Tim9 essentiell für die Hefezelle ist. Auch bei Repression der Expression von Tim9 in Tim9(gal10)-Zellen kam das Wachstum der Hefe nach etwa drei Tagen zum Stillstand. Untersuchungen an Tim9↓-Mitochondrien ergaben Hinweise auf den Prozeß, an dem Tim9 beteiligt ist: Durch den Verlust an Tim9 kam es zu einer nachweisbaren Reduktion der Proteine Tim22, Tim10 und Tim12, alles Komponenten des Tim22-Importweges. Nicht betroffen waren Proteine des Tim23-Importweges (Tim23, Tim44) und der Translokase der äußeren Membran (Tom40). Präproteine, die den TIM22-Komplex benötigen, wie etwa AAC, PiC und Mrs3, werden bei Abwesenheit von Tim9 nicht mehr importiert. Dagegen zeigte sich der Import von Präproteinen, die den TIM23-Komplex benutzen, wie beispielsweise pSu9-DHFR, pCyt b_2-DHFR und pCyt c_1, in Tim9↓-Mitochondrien unbeeinflußt. Es handelt sich somit nicht um einen unspezifischen Importdefekt in Tim9↓-Mitochondrien, der auf einer Akkumulation von Sekundäreffekten beruht.
Damit war gezeigt, daß Tim9 am Import von Präproteinen über den Tim22-Importweg beteiligt sein muß.

4.4 Verwandtschaft von Tim9 mit Tim10 und Tim12

Tim9 ist strukturell mit Tim10 und Tim12 verwandt. Insbesondere ist diesen Proteinen gemeinsam, daß sie vier konservierte Cysteinreste besitzen, die einem Zinkfinger-Motiv ähnlich sind. Für die Anordnung der Cysteinreste zur Ausbildung eines Zinkfingers werden zwei Arten diskutiert (Abbildung 41). Einerseits konnte gezeigt werden, daß diese Motive in Tim10 und Tim12 Zink-Ionen binden [68, 104, 171] und damit das Protein vermutlich zu einem Metallokomplex aus dem Metallion und vier Cysteinen faltet. Andererseits wurde die Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen jeweils zwei Cysteinen zur strukturellen Stabilisation vorgeschlagen [28, 102]. Neuere Untersuchungen [108] weisen stark darauf hin, daß Zink mit den reduzierten Thiolgruppen der Cysteinreste eine Komplexbindung eingeht und die Faltung des Proteins induziert. Dabei entstehen proteasegeschützte zentrale Proteinbereiche, die die Zinkfinger-artige Struktur bilden [186]. Die Faltung der kleinen Tim-Proteine im IMS treibt den gerichteten Import in den IMS. Andererseits könnte die gebildete "fingerförmige" Struktur Protein-Protein-Interaktion zwischen den kleinen Tim-Proteinen oder mit Substrat vermitteln. Das gleiche in Tim9 vorliegende Zinkfinger-ähnliche Motiv könnte auf eine zu Tim10 und Tim12 ähnliche Funktion von Tim9 hindeuten. In der Tat wirkt Tim9, ebenso wie Tim10 und Tim12 im Importweg von Carrier-Proteinen. Die Depletion von Tim9 und Tim10 führt zu einem Defekt der Translokation von Carrierproteinen über die Außenmembran. Allerdings interagiert Tim9 mit Tim10 und Tim12 in einer stabilisierenden Art: Depletion von Tim9 resultiert in verminderten Mengen an Tim10 und Tim12 in

Mitochondrien. Somit ist nicht auszuschießen, daß der Importdefekt in Tim9-depletierten Mitochondrien auf die verminderten Mengen der anderen kleinen Tim-Proteine zurückzuführen ist.

4.5 Struktur und Stöchiometrie der Tim9-Komplexe

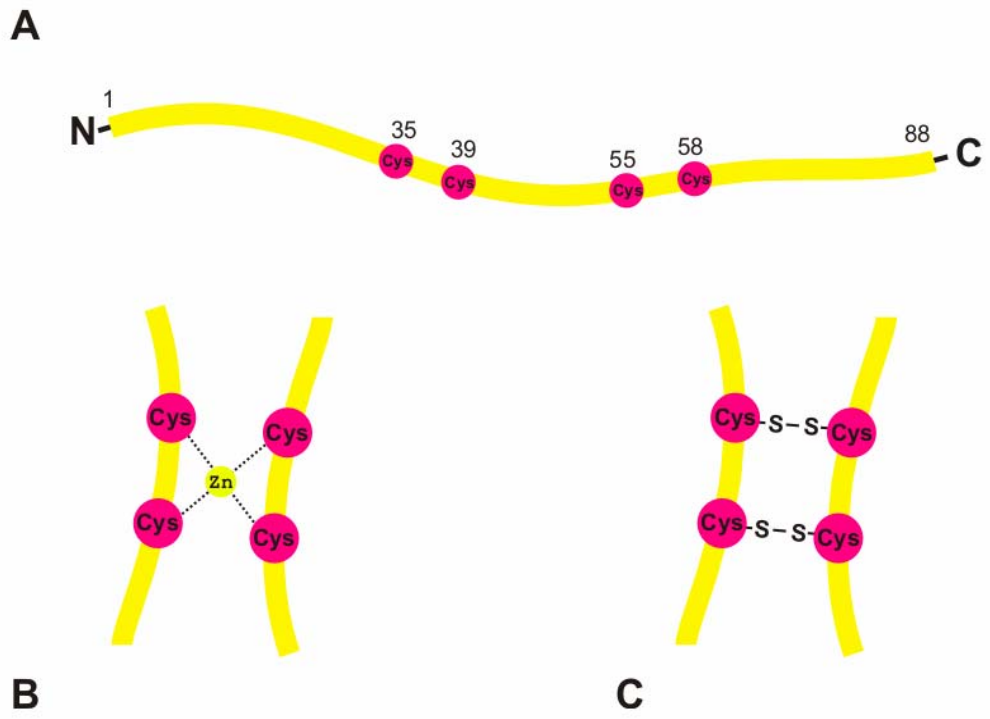


Abb. 41: **Bindung von Zn^{2+} durch Zinkfingerproteine**
Tim9 (88 AS) besitzt an den Positionen 35/38 und 55/58 jeweils zwei Cysteinreste mit drei Aminosäuren Abstand zueinander (A). Zwei mögliche Interaktionen dieser sogenannten CX_3C-Motive werden diskutiert: Die Cysteinreste könnten tetraedisch Zn^{2+} koordinieren und damit einen stabilen Metallokomplex bilden (B). Eine andere Möglichkeit ist die Reaktion zweier Thiolgruppen der Cysteine miteinander und die Ausbildung von Disulfidbrücken (C).

Wie Tim10 und Tim12 ist Tim9 im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. Diese drei Proteine interagieren miteinander. In der Säulenfiltration von Mitochondriensolubilisaten werden zwei unterschiedliche Komplexe dieser Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von jeweils 70 kDa nachgewiesen. Der eine Komplex enthielt in der Immunpräzipitation Tim9, Tim10 und Tim12, der andere Komplex jedoch nur Tim9 und Tim10. Unsere Ergebnisse und die anderer Gruppen [28, 85, 106, 186] zeigen, daß der TIM9-10-Komplex ein Hexamer aus jeweils drei Molekülen Tim9 und Tim10 ist. Er ist im Vergleich zum TIM9-10-12 Komplex in drei- bis vierfacher Menge vorhanden.

Die Formierung des heterohexameren Komplexes aus jeweils drei Molekülen Tim9 und Tim10 ist thermodynamisch sehr stabil und erlaubt keine Dynamik der gebundenen Tim-Proteine im IMS [186].
Der TIM9-10-12 Komplex besteht, ebenso wie der TIM9-10-Komplex, aus einem Hexamer der kleinen Tim-Proteine. Aus dem gemessenen Verhältnis von Tim12:Tim10:Tim9 ergibt sich eine Zusammensetzung Tim9:Tim10:Tim12 von 1:2:3. Der Komplex liegt in enger Assoziation mit der Innenmembran vor und bildet dort zusammen mit Tim18, Tim22 und Tim54 einen 300kDa großen Komplex. Er liegt in äquimolaren Konzentrationen zu Tim22 vor (C. Sirrenberg, unveröffentlicht).

4.6 Funktion der Tim9-Komplexe

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, liegen Tim9, Tim10 und Tim12 praktisch vollständig im Komplex vor, d.h. es gibt keinen freien Pool der einzelnen Moleküle. Es ist also immer der Komplex aus Tim9 und Tim10 oder Tim9, Tim10 und Tim12, der während des Imports mit den anderen Importkomponenten und dem Vorstufenprotein interagiert. Die bisherigen Beobachtungen der sequentiellen Wechselwirkung von Tim10 und Tim12 mit dem Vorstufenprotein während des Importes [171] sind die Wechselwirkung der jeweiligen Komplexe TIM9-10 bzw. TIM9-10-12 [47]. Als Voraussetzung für die Protein-Protein-Interaktion zwischen Tim10 oder Tim12 mit dem Vorstufenprotein wurde eine Zinkfinger-ähnliche Struktur von Tim10 und Tim12 vorgeschlagen. Beide Proteine binden äquimolare Mengen Zink und besitzen Zinkfinger-ähnliche Motive [171]. Zink ist auch für die Interaktion zwischen Tim10 und Tim12 mit dem Vorstufenprotein während dessen Translokation und für den Import notwendig [171].
Der gefaltete Bereich zwischen den CX_3C-Motiven weist ein konserviertes Muster geladener Aminosäurereste auf. Dieses Ladungsmuster ist in Tim10 und Tim12 komplementär zur sogenannten Carrier-Signatur, einem konservierten Element, das dreimal innerhalb der Sequenz aller Mitglieder der Carrierfamilie wiederholt wird [129, 135, 157]. Allerdings ist nicht eindeutig geklärt, ob eine spezifische Erkennung der Vorstufenproteine durch die kleinen Tim-Proteine aufgrund einer Interaktion dieser Muster geschieht oder ob die Interaktion mit den hydrophoben Bereichen im Vorstufenprotein ohne Verwendung der Signatur zustande kommt [28, 182].
Tim9 besitzt dieses Muster nicht und kann somit nicht mit dem Carrier über die Carrier-Signatur interagieren. In Quervernetzungsversuchen von Tim9 mit Zwischenstufen von importierten AAC [47] konnte eine Interaktion nicht nachgewiesen werden. Das schließt jedoch nicht aus, daß Tim9 ein anderes, bis jetzt noch nicht identifiziertes Sequenzmotiv im Vorstufenprotein erkennt. Tim9 könnte innerhalb der Komplexe, neben der stabilisierenden Funktion für Tim10 und Tim12, auch an einer Wechselwirkung mit der TOM-Maschinerie oder mit dem mit TIM9-10-12 assoziierten TIM22-Komplex beteiligt sein.

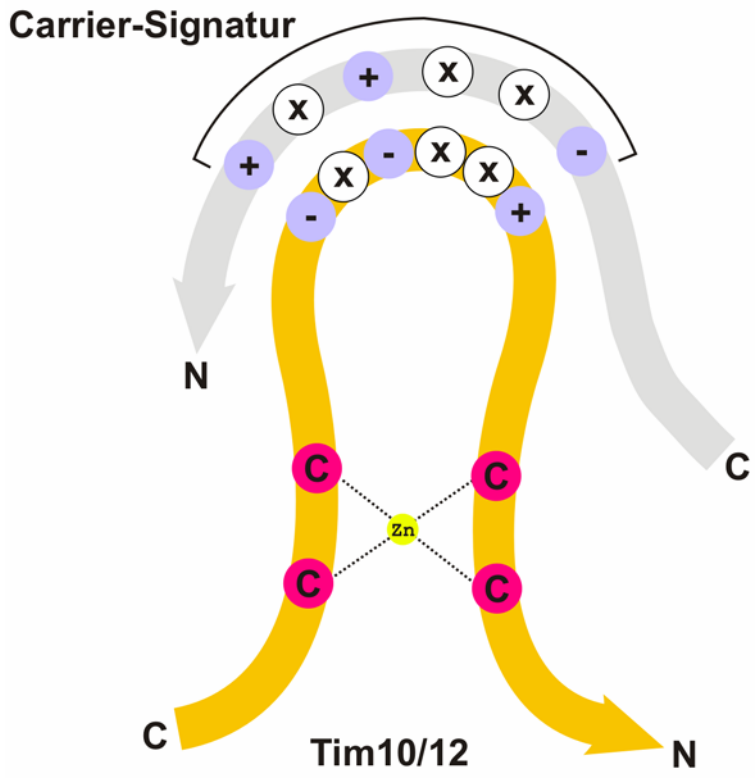


Abb. 42: **Theoretische Interaktion der Carriersignatur mit dem Zinkfinger der Tim10/Tim12**
Die Familie der mitochondrialen Carrierproteine besteht aus mehr als 30 Mitgliedern, die alle ein internes Importsignal enthalten. Diese Transporterproteine bestehen aus drei Abschnitten (Modulen), die jeweils ein matrixseitiges Sequenzelement, die Carriersignatur, enthalten. Das Muster dieser geladenen Aminosäuren ist komplementär und antiparallel zu einem Motiv im Zinkfinger von Tim10 und Tim12. Dies könnte die mögliche Basis für die Erkennung von Vorstufenproteinen durch Tim10 und Tim12 sein.

4.6.1 TIM9-10-Komplex

Der TIM9-10-Komplex liegt vermutlich löslich im Intermembranraum vor und ist im Vergleich zum TIM9-10-12 Komplex in mindestens 3- bis 4-facher Menge vorhanden. Eine feste Verbindung des TIM9-10-Komplexes mit der Innenmembran, wie es bei dem TIM9-10-12 der Fall ist, wurde nicht beobachtet.

Im Intermembranraum kooperiert er funktionell mit dem TOM-Komplex, um an ein Vorstufenproteinen zu binden, das den TIM22-Importweg benutzt. Hierbei bindet der TIM9-10-Komplex an das Carrierprotein. In diesem frühen Stadium des Imports hat eine teilweise Translokation über die Außenmembran stattgefunden (Stufe 3a). Für den weiteren Import des Proteins interagiert der TIM9-10 Komplex mit dem TIM9-10-12 Komplex auf der Außenseite der inneren Membran und übergibt das Vorstufenprotein zur $\Delta\psi$-abhängigen Insertion in die Innenmembran.

Zusammenfassend könnte die Aufgabe des TIM9-10-Komplexes darin bestehen eine Aggregation des Vorstufenproteins auf dem TIM22-Importweg im Intermembranraum zu verhindern und so den Import effizienter und schneller zu machen.

4.6.2 TIM9-10-12 Komplex

Während des Imports übernimmt der TIM9-10-12-Komplex die Carrier-Vorstufenproteine vom TIM9-10-Komplex des Intermembranraumes und leitet sie an Tim22 weiter, das die membranpotentialabhängige Insertion in die Innenmembran vermittelt [82, 169]. Vermutlich vermittelt dabei Tim12 die feste Bindung des TIM9-10-12 Komplexes an den integralen Membranteil des TIM22-Komplexes. Tim9 ist für die Stabilität des TIM9-10-12 Komplexes notwendig. Eine strukturelle Veränderung durch eingebrachte Mutationen im Bereich des ersten CX_3C-Motivs in Tim9 führt zum Verlust des 300kDa-Komplexes, sowie des im Intermembranraum gelösten 70kDa-Komplexes [102].
Zwei Möglichkeiten für den Transfer von Carrier-Vorstufenproteinen vom TIM9-10-Komplex zum TIM22-Komplex sind denkbar: Zum einen könnte der TIM9-10-Komplex das Vorstufenprotein an den TIM9-10-12-Komplex übergeben, indem beide Komplexe transient miteinander interagieren und dabei das vom TIM9-10-Komplex gebundene Protein an den TIM9-10-12-Komplex weitergegeben wird. Zum anderen könnten Tim9- und Tim10-Moleküle zusammen mit dem Vorstufenprotein in den TIM9-10-12-Komplex transferiert werden und Tim9 und Tim10 Moleküle aus dem TIM9-10-12-Komplex ersetzen.

4.7 Weitere kleine Tim-Proteine: Tim8, Tim13

In dieser Arbeit ist bei der Suche nach neuen Importkomponenten neben dem charakterisierten Tim9 mit Tim8 noch ein weiteres kleines Tim-Protein gefunden worden, das eine signifikante Homologie zu Tim10 und Tim12 aufweist. Erste Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, daß Tim8 im Gegensatz zu Tim9 keine essentielle Funktion in der Hefezelle ausübt.

4.7.1 Der TIM8-13-Komplex

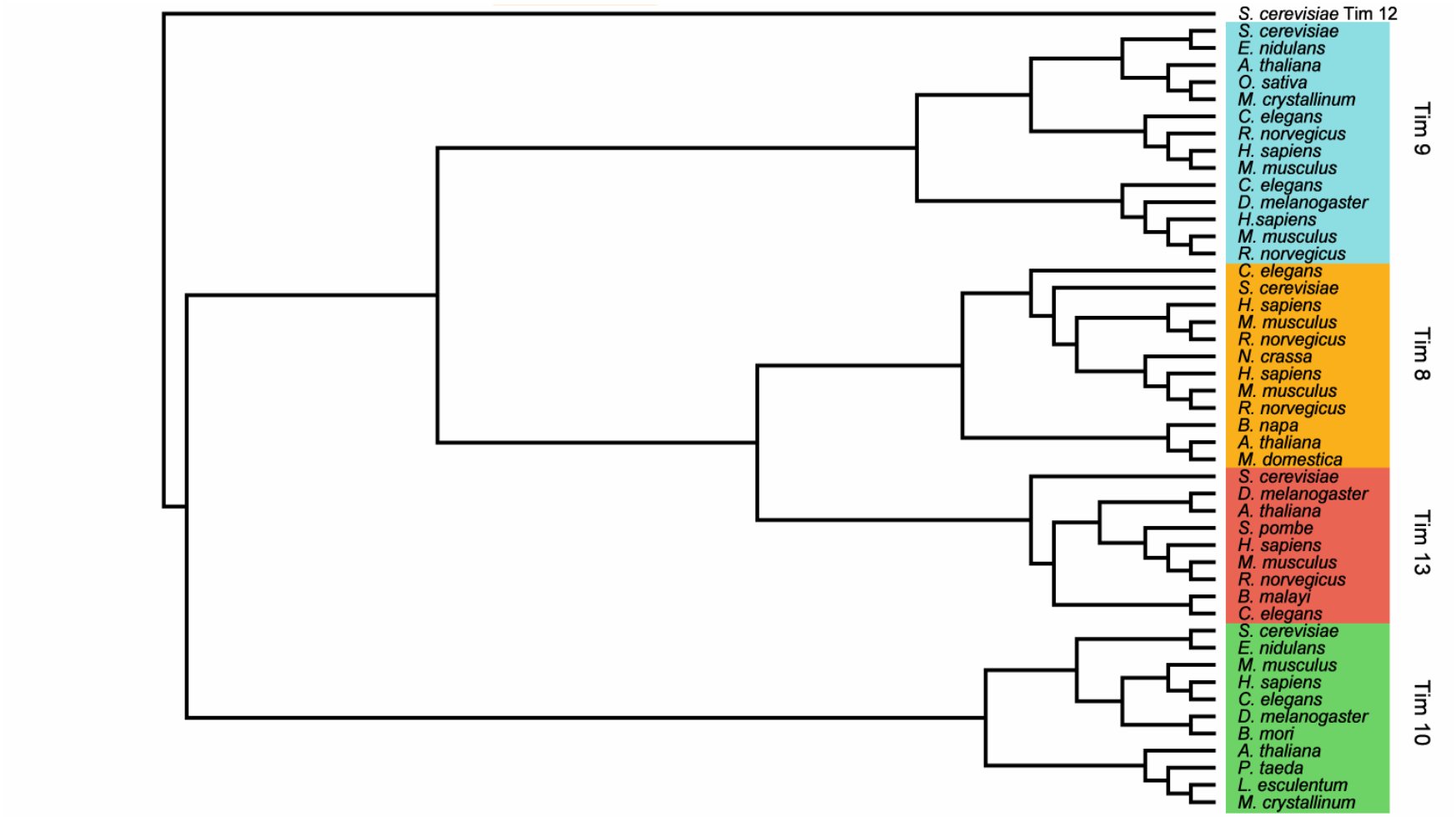
Wie später gezeigt werden konnte, bildet Tim8 mit Tim13 einen hetero-oligomeren Komplex im Intermembranraum, der ebenfalls wie der TIM9-10-Komplex eine Größe von etwa 70kDa besitzt [8, 30, 85, 87, 101, 127]. Der Komplex besteht aus je drei Molekülen Tim8 und Tim13. Eine Zusammensetzung mit anderen Tim-Proteinen oder in einem anderen Verhältnis wurde nicht beobachtet [28]. Ebenso wie Tim10 und Tim12 scheinen Tim8 und Tim13 aufgrund der beiden CX_3C-Motive Zn^{2+}-Ionen binden zu können [137, 171].
Im Gegensatz zu dem TIM9-10-Komplex, der notwendig für den Import von Carrierproteinen ist, bindet TIM8-13 nicht an die membranspannenden Domänen des AAC-Vorstufenproteins [47, 85, 137, 171]. Er zeigt jedoch eine spezifische Bindung zur ersten Transmembrandomäne des importierten Tim23 [27, 137]. Obwohl der TIM8-13-Komplex nicht für den Import von

Tim23 unter normalen Bedingungen notwendig ist, wird seine Funktion bei geringem oder fehlendem Membranpotential für die effiziente Translokation von Tim23 über die mitochondriale Außenmembran essentiell [137].

4.7.2 Humane Homologe: Deafness Dystonia Proteine

Bei der Untersuchung der Expression der kleinen Tim-Proteine in verschiedenen Organismen mittels der Expressed-Sequence-Tags-Datenbank des NCBI und der Homologiesuche im Hefegenom (3.1.2, 3.1.3.2), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zu Tim8 ähnliches menschliches Protein gefunden, das DDP1 (Deafness Dystonia Protein). Mutationen in diesem Protein sind als Auslöser für das *Mohr-Tranebjaerg-Syndrom* beschrieben [79]. Jedoch ist seine Lokalisation und Funktion bislang unklar gewesen. Mit der Erkennung der Homologie zu Tim10, Tim12 und Tim13 lag der Verdacht nahe, daß eine Komponente des mitochondrialen Imports dieses Krankheitsbild verursachen könnte. Wie gezeigt werden konnte, ist das menschliche Homolog zu Tim8, DDP1, tatsächlich auch an der Bildung eines Komplexes mit dem humanen Homolog vom Tim13 beteiligt [149]. Dieser Komplex scheint, ebenso wie in Hefe, den Import der essentiellen Importkomponente Tim23 zu vermitteln (siehe 4.7.1).
Neben diesem Tim8-Homolog wurden weitere Proteine mit Ähnlichkeit zu den aus Hefe bekannten Tim8, Tim9, Tim10 und Tim13 gefunden: DDP2/TIMM8b, TIMM10, TIMM9a, TIMM9b, TIMM13 [79, 86]. Die Gruppe der kleinen Tim-Proteine scheint sich während der Evolution nur gering verändert zu haben [9, 79, 88]. Das läßt auf eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle und der Mitochondrien schließen.
Das menschliche Homolog von Tim8 ist das erste Protein des mitochondrialen Importsystems für das ein direkter Zusammenhang mit einer menschlichen Erbkrankheit gezeigt werden konnte.

Abb. 43 (nächste Seite): **Cladogramm der Familie der kleinen Tim-Proteine**
Erstellt aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen durch CLUSTAL mit TreeView.
a, b: Vermutete Isoformen gleicher Proteine in Hefe.



Tim 9

Saccharomyces cerevisiae	AF093244
Emericella nidulans	AF150110
Arabidopsis thaliana	AF150111
Oryza sativa	AF150113
Mesembryantherum crystallinum	AF150112
Caenorhabditis elegans[b]	AF150108
Rattus norvegicus[a]	AF150102
Homo sapiens[a]	AF150100
Mus musculus[a]	AF150101
Caenorhabditis elegans[a]	AF150109
Drosophila melanogaster	AF150104
Homo sapiens[b]	AF150105
Mus musculus[b]	AF150103
Rattus norvegicus[b]	AF150106

Tim 8

Caenorhabditis elegans	AF150086
Saccharomyces cerevisiae	AF143537
Homo sapiens DDP1	U66035
Mus musculus[a]	AF150081
Rattus norvegicus[a]	AF150082
Neurospora crassa	AF142424
Homo sapiens DDP2	AF150087
Mus musculus[b]	AF196314
Rattus norvegicus[b]	AF196315
Brassica napa	AF150085
Arabidopsis thaliana	AF150083
Malus domestica	AF150084

Tim 13

Saccharomyces cerevisiae	Z72966
Drosophila melanogaster	AF150080
Arabidopsis thaliana	AF144703
Saccharomyces pombe	AF143538
Homo sapiens	AF144700
Mus musculus	AF144702
Rattus norvegicus	AF144701
Brugia malayi	AF144705
Caenorhabditis elegans	AF144704

Tim 12

Saccharomyces cerevisiae	Z35960

Tim 10

Saccharomyces cerevisiae	U10555
Emericella nidulans	AF150097
Mus musculus	AF150090
Homo sapiens	AF150089
Caenorhabditis elegans	AF150091
Drosophila melanogaster	AF150092
Bombyx mori	AF150098
Arabidopsis thaliana	AF150093
Pinus taeda	AF144706
Licopersicon esculentum	AF150096
Mesembryanthenum crystallinum	AF150099

4.8 Ein aktualisiertes Modell des mitochondrialen Proteinimports

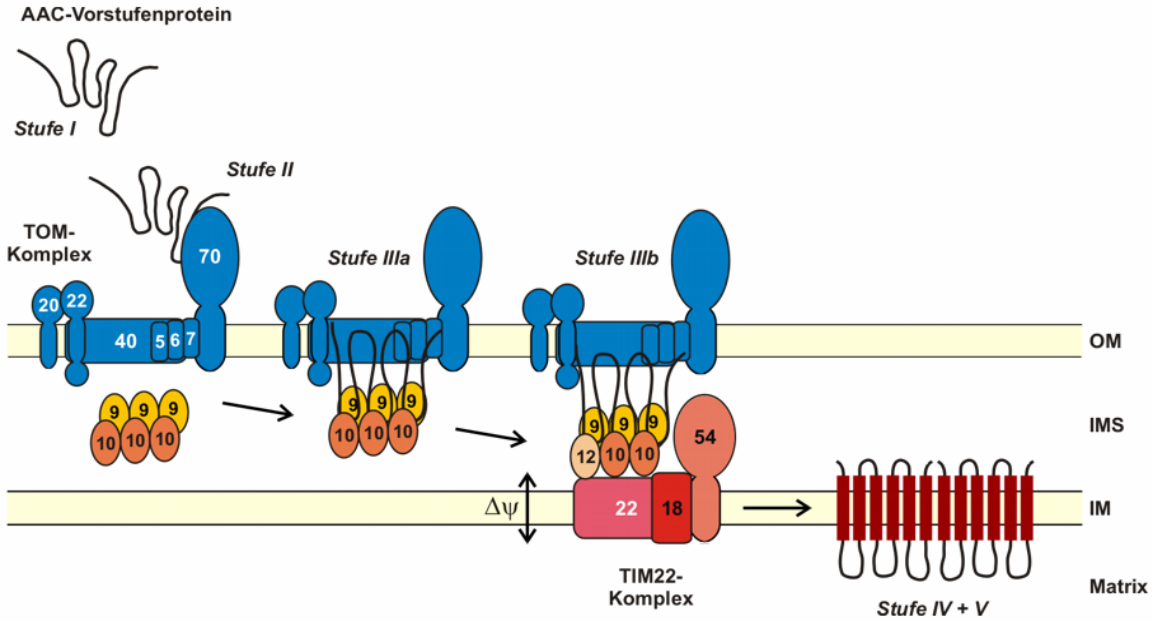


Abb. 44: **Die Stufen des mitochondrialen Imports über die TIM22-Präproteintranslokase** (aus [136])

Aufgrund der neuen Erkenntnisse kann das bisherige Modell des mitochondrialen Proteinimports über die TIM22-Translokase zu Folgendem ergänzt werden:
Kernkodierte Vorstufenproteine ohne eine mitochondriale abspaltbare Präsequenz, die über den TIM22-Komplex importiert werden, erreichen nach Synthese im Cytosol und Transport zu den Mitochondrien (Importstufe I) die Rezeptoren des TOM-Komplexes (Importstufe II). Es folgt die Translokation über die Außenmembran durch den TOM-Komplex. Der im Intermembranraum lösliche hexamere 70kDa-Komplex aus Tim9 und Tim10 nimmt Kontakt zum Vorstufenprotein auf (Importstufe IIIa) und verhindert das Zurückgleiten des Vorstufenproteins durch den TOM-Komplex. Wie sich später zeigen ließ, agiert ein zweiter im IMS löslicher 70kDa-Komplex aus TIM8-13 praktisch ebenso [28, 89], jedoch mit einer Spezifität für transloziertes Tim23 [137]. Die löslichen 70 kDa-Komplexe vermitteln die weitere Translokation der Vorstufenproteine über den IMS zum TIM22-Komplex der Innenmembran. Dabei erfolgt eine Interaktion des Komplexes im IMS mit dem TIM22-assoziierten [170] TIM9-10-12-Komplex an der Außenseite der Innenmembran (Importstufe IIIb).
Zwei mögliche Prinzipien sind dafür denkbar: Einerseits könnten die im IMS löslichen 70kDa-Komplexe über die Bindung an das im TOM-Komplex festgehaltene Vorstufenprotein eine Rekrutierung des TIM22-Komplexes direkt in den Bereich der trans-Seite des TOM-Komplexes vermitteln. Dabei könnte es zu einer Verbindung der Translokasen der Innen- und

Außenmembran unter Ausbildung einer Kontaktstelle kommen. Die weitere Translokation würde dann nicht als lösliches Intermediat im IMS, sondern innerhalb des Kanals des neu gebildeten Komplexes, bestehend aus dem TIM22- und TOM-Komplex, stattfinden.
Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die 70kDa-Komplexe nach Bindung an das Vorstufenprotein keine Verbindung zum TOM-Komplex behalten und lediglich das Vorstufenprotein durch den IMS zum TIM22-Komplex der Innenmembran dirigieren, dort am TIM22-Komplex andocken und die weitere Translokation ermöglichen. Dabei verläuft ein Teil des Importweges als lösliches Intermediat im IMS.
Mit Übergabe des Vorstufenproteins an die TIM22-Translokase der Innenmembran erfolgt die Membranpotential-abhängige Insertion des Vorstufenproteins in die Innenmembran (Importstufe IV) und dessen Dimerisierung (Importstufe V).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den kleinen Tim-Proteinen Tim8 und Tim9 neue Komponenten des mitochondrialen TIM22-Importweges identifiziert.

Über den TIM22-Importweg wird eine Gruppe von Membranproteinen, die keine klassische Präsequenz besitzen (z.B. die Carrierproteine AAC und PiC), in die mitochondriale Innenmembran transportiert. Die für diesen Importweg essentiellen kleinen Tim-Proteine, Tim10 und Tim12, besitzen jeweils zwei konservierte Bereiche mit einem CX_3C-Motiv. Ein zum Auffinden dieser Bereiche speziell entwickeltes Suchprogramm fand im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* zwei weitere Gene, die für die mitochondrialen Proteine Tim8 und Tim9 kodieren. Ihre Aminosäuresequenzen besitzen eine Ähnlichkeit von etwa 27% zu den bereits identifizierten Tim-Proteinen Tim10 und Tim12.

Tim9 ist ein essentielles Protein. Es ist im Intermembranraum lokalisiert und liegt in zwei hexameren Komplexen vor. Der eine Komplex enthält drei Tim9-Moleküle und drei Tim10-Moleküle. Der andere Komplex enthält drei Tim9-, zwei Tim10-Moleküle und ein Tim12-Molekül und ist mit der Außenseite der Innenmembran assoziiert. Der TIM9-10-Komplex ist in etwa doppelter Menge im Vergleich zum TIM9-10-12-Komplex vorhanden. Er ist löslich im IMS lokalisiert. Der TIM9-10-12-Komplex liegt nur in Assoziation mit dem TIM22-Komplex vor. Beide Komplexe vermitteln innerhalb des IMS sequentiell die Translokation mitochondrialer Vorstufenproteine vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex.

Tim8 ist in Hefe ein nicht essentielles Protein. Das humane Homolog, DDP1 (deafness-dystonia-protein), ist mit dem *Mohr-Tranjebærg-Syndrom* assoziiert. Als erste Verbindung zwischen dem mitochondrialen Proteinimport und einer erblichen Krankheit, zeigt dies die zunehmende Bedeutung von Mutationen in nukleär kodierten, mitochondrialen Proteinen, für bisher meist nur in Ansätzen verstandenen neurodegenerativen Syndromen.

6 Literatur

1. Adams, M., et al., *Sequence identification of 2375 human brain genes.* Nature, 1992. **355**: p. 632-634.
2. Adams, M., et al., *Complement DNA sequencing: Expressed sequence tags and the human genome project.* Science, 1991. **252**: p. 1651-1656.
3. Ahting, U., et al., *The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria.* J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 959-68.
4. Alconada, A., et al., *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, 1995. **15**(11): p. 6196-205.
5. Altschul, S., *Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective.* J Mol Biol, 1991. **219**: p. 555-565.
6. Atencio, D.P. and M.P. Yaffe, *MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 283-91.
7. Banfi, S., et al., *Identification and mapping of human cDNAs homologous to Drosophila mutant genes through EST database searching.* Nat Genet, 1996. **13**: p. 167-174.
8. Bauer, M.F., et al., *Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase.* J Mol Biol, 1999. **289**(1): p. 69-82.
9. Bauer, M.F., et al., *The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom.* FEBS Lett, 1999. **464**(1-2): p. 41-7.
10. Berthold, J., et al., *The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system.* Cell, 1995. **81**(7): p. 1085-93.
11. Birnboim, H.C.u.D., J., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res, 1979. **7**: p. 1513-23.
12. Blom J, D.P., Meijer M, *Functional and physical interactions of components of the yeast mitochondrial inner-membrane import machinery (MIM).* Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 309-14.
13. Blom, J., et al., *The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7364-71.
14. Boguski, M., T. Lowe, and C. Tolstoshev, *dbEST-database for expressed sequence tags.* Nat Genet, 1993. **4**: p. 332-333.
15. Boguski MS, L.T., Tolstoshev CM., *dbEST--database for "expressed sequence tags".* Nat Genet., 1993. **4**(4): p. 332-3.
16. Bolliger, L., et al., *A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability.* EMBO J, 1994. **13**(8): p. 1998-2006.
17. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
18. Braren, R., et al., *Use of the EST database resource to identify ans clone novel mono (ADP-ribosyl) transferase gene family members.* Adv Exp Med Biol, 1997. **419**: p. 163-168.
19. Brix, J., et al., *Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein.* J Biol Chem, 1999. **4**(274 (23)): p. 16522-30.
20. Brown, J.R. and W.F. Doolittle, *Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition.* Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(4): p. 456-502.

21. Brunner M, S.H., Lill R, Neupert W, *Dissection of protein translocation across the mitochondrial outer and inner membranes.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 1995. **60**: p. 619-27.
22. Bull, P.C., et al., *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene.* Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 327-37.
23. Canafoglia, L., et al., *Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders.* Neurology, 2001. **56**(10): p. 1340-6.
24. Caplan, A.J. and M.G. Douglas, *Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein.* J Cell Biol, 1991. **114**(4): p. 609-21.
25. Chirico, W.J., M.G. Waters, and G. Blobel, *70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes.* Nature, 1988. **332**(6167): p. 805-10.
26. Cox, E.H.a.M., G.L., *Zinc-dependent protein folding.* Curr. Opin. Chem. Biol., 2000. **4**: p. 162-165.
27. Curran, S.P., et al., *The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier.* Embo J, 2002. **21**(5): p. 942-53.
28. Curran, S.P., et al., *The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins.* J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1017-27.
29. Daum, G., P.C. Bohni, and G. Schatz, *Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria.* J Biol Chem, 1982. **257**(21): p. 13028-33.
30. Davis AJ, S.N., Holder J, Johnson AE, Jensen RE, *Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria.* J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1271-82.
31. Dayhoff, M., R. Schwartz, and B. Orcutt, *A model of evolutionary change in proteins*, in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, M.O. Dayhoff, Editor. 1978, Natl.Biomed. Res. Found: Washington, DC. p. 345-352.
32. Dekker PJ, K.P., Rassow J, Maarse AC, Pfanner N, Meijer M, *Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane.* FEBS Lett., 1993. **330**(1): p. 66-70.
33. Dekker, P.J., et al., *Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6515-24.
34. Delatycki, M.B., R. Williamson, and S.M. Forrest, *Friedreich ataxia: an overview.* J Med Genet. **37**(1): p. 1-8.
35. Delettre, C., et al., *Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.* Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 207-10.
36. Desagher, S. and J.C. Martinou, *Mitochondria as the central control point of apoptosis.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(9): p. 369-77.
37. Deshaies, R.J., B.D. Koch, and R. Schekman, *The role of stress proteins in membrane biogenesis.* Trends Biochem Sci, 1988. **13**(10): p. 384-8.
38. Dietmeier K, H.A., Bomer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kubrich M, Pfanner N., *Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore.* Nature, 1997. **388**(6638): p. 195-200.
39. DiMauro S, K.R., Tanji K, Bonilla E, Hirano M., *Mitochondrial genes for generalized epilepsies.* Adv Neurol, 1999. **79**: p. 411-9.
40. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases.* N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
41. DiMauro S, S.E., *Nuclear power and mitochondrial disease.* Nat Genet., 1998. **19**(3): p. 214-5.

42. DiMauro S., B.E., in *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*, P.S.B. Rosenberg R.N., DiMauro S., Barchi R.L., Editor. 1997, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 201-235.
43. Donzeau, M., et al., *Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes.* Cell. **101**(4): p. 401-12.
44. Dower, W.J., Miller J.F. und Ragsdale, C.W., *High efficiancy transformation of E. coli. by high voltage electroporation.* Nucl. Acids Res., 1988. **16**: p. 1627-45.
45. Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam, *Mammalian mitochondrial beta-oxidation.* Biochem J, 1996. **320**(Pt 2)): p. 345-57.
46. Emtage, J.L. and R.E. Jensen, *MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway.* J Cell Biol, 1993. **122**(5): p. 1003-12.
47. Endres, M., W. Neupert, and M. Brunner, *Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex.* Embo J, 1999. **18**(12): p. 3214-21.
48. Erickson, F.L. and E.M. Hannig, *Characterization of Schizosaccharomyces pombe his1 and his5 cDNAs.* Yeast, 1995. **11**(2): p. 157-67.
49. Feng, D., M. Johnson, and R. Doolittle, *Aligning aminoacid sequences: comparison of commonly used methods.* J Mol Evol, 1984. **21**: p. 112-125.
50. Fujiki, M. and K. Verner, *Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import in vivo.* J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1914-20.
51. Fujiki, Y., et al., *Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum.* J Cell Biol, 1982. **93**(1): p. 97-102.
52. Geissler A, C.A., Truscott KN, Wiedemann N, Brandner K, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P, *The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel.* Cell, 2002. **111**(4): p. 507-18.
53. Gietz, D., et al., *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(6): p. 1425.
54. Gietz, R.D. and R.H. Schiestl, *Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier.* Yeast, 1991. **7**(3): p. 253-63.
55. Gietz, R.D., et al., *Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure.* Yeast, 1995. **11**(4): p. 355-60.
56. Gonnet, G., M. Cohen, and S. Benner, *Exhaustive matching of the entire protein sequence database.* Science, 1992. **256**: p. 1443-1445.
57. Gratzer, S., et al., *Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria.* J Cell Biol, 1995(129 (1)): p. 25-34.
58. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution.* Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
59. Guthrie Ch., F.G.R., *Methods in Enzymology : Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, ed. Fink. 1991: Academic Press.
60. Harkness, T.A., et al., *A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria.* J Cell Biol, 1994. **124**(5): p. 637-48.
61. Harlow, E.a.L., D., *Antibodies. A laboratory manual*. 1988, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Hartl, D., *EST! EST!! EST !!!* Bioassay, 1996. **18**: p. 1021-1023.
63. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl, *The role of molecular chaperones in protein folding.* FASEB J, 1995. **9**(15): p. 1559-69.
64. Henikoff, S. and J. Henikoff, *Amino acid substitution matrices from protein blocks.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 10915-10919.

65. Heytler PG, P.W., *A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones.* Biochem Biophys Res Commun, 1962. **4**(7): p. 272-5.
66. Hill, J., et al., *DMSO-enhanced whole cell yeast transformation.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(20): p. 5791.
67. Hines, V. and G. Schatz, *Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p.* J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 449-54.
68. Hofmann, S., et al., *The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space.* J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23287-93.
69. Höhfeld, J. and F.U. Hartl, *Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria.* J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 305-15.
70. Honlinger, A., et al., *Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import.* EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2125-37.
71. Horst, M., et al., *Protein import into yeast mitochondria: the inner membrane import site protein ISP45 is the MPI1 gene product.* EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3035-41.
72. Horvath, A. and H. Riezman, *Rapid protein extraction from Saccharomyces cerevisiae.* Yeast, 1994. **10**(10): p. 1305-10.
73. Hovland, P., et al., *Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose.* Gene, 1989. **83**(1): p. 57-64.
74. Hua-Chien, C., K. Hsing-Jien, and R. Dan, *Digital cloning: Identification of human cDNA homologous to novel kinase through expressed sequence tag database search.* J Biomed Sci, 1998. **5**: p. 86-92.
75. Huxley, C., E.D. Green, and I. Dunham, *Rapid assessment of S. cerevisiae mating type by PCR.* Trends Genet, 1990. **6**(8): p. 236.
76. Isaya, G., F. Kalousek, and L.E. Rosenberg, *Sequence analysis of rat mitochondrial intermediate peptidase: similarity to zinc metallopeptidases and to a putative yeast homologue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 8317-21.
77. Jarosch, E., G. Rodel, and R.J. Schweyen, *A soluble 12-kDa protein of the mitochondrial intermembrane space, Mrs11p, is essential for mitochondrial biogenesis and viability of yeast cells.* Mol Gen Genet, 1997. **255**(2): p. 157-65.
78. Jarosch, E., et al., *Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria.* J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17219-25.
79. Jin H, M.M., Tranebjaerg L, Kendall E, Fontan G, Jackson J, Subramony SH, Arena F, Lubs H, Smith S, Stevenson R, Schwartz C, Vetrie D, *A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness.* Nat Genet., 1996. **14**(2): p. 177-80.
80. Jones, D., W. Taylor, and J. Thornton, *The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences.* Comput Appl Biosci, 1992. **8**: p. 275-282.
81. Kalousek, F., J.P. Hendrick, and L.E. Rosenberg, *Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(20): p. 7536-40.
82. Kerscher, O., et al., *The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane.* J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1663-75.
83. Kerscher, O., N.B. Sepuri, and R.E. Jensen, *Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane.* Mol Biol Cell. **11**(1): p. 103-16.
84. Kiebler, M., et al., *Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins.* Nature, 1990. **348**(6302): p. 610-6.

85. Koehler, C.M., et al., *Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space.* Science, 1998. **279**(5349): p. 369-73.
86. Koehler, C.M., et al., *Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2141-6.
87. Koehler, C.M., et al., *Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins.* Embo J, 1998. **17**(22): p. 6477-86.
88. Koehler, C.M., S. Merchant, and G. Schatz, *How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space.* Trends Biochem Sci, 1999. **24**(11): p. 428-32.
89. Koehler, C.M., et al., *Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1187-93.
90. Kozany, C., et al., *The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase.* Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(3): p. 234-41.
91. Krimmer, T., et al., *Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex.* J Cell Biol, 2001. **152**(2): p. 289-300.
92. Kronidou, N.G., et al., *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, 1994. **91**(26): p. 12818-22.
93. Künkele, K.P., et al., *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.* Cell, 1998. **93**(6): p. 1009-19.
94. Kunz, W.S., *The role of mitochondria in epileptogenesis.* Curr Opin Neurol, 2002. **15**(2): p. 179-84.
95. Kushner, S.H., *An improved method for transformation of Escherichia coli with ColE1-derived plasmids*, H.W. Boyer, and Nicosia, S., Editor. 1978, Elsevier/North Holland Biomedical Press: New York. p. 173.
96. Kyhse-Anderson, J., *Elektroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose.* J. Biochem. Biophys. Meth., 1984. **10**: p. 203-7.
97. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.* J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
98. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**: p. 680-5.
99. Lang, B.F., M.W. Gray, and G. Burger, *Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes.* Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 351-97.
100. Leber, T., *Über hereditäre und congenitale Sehnervenleiden.* Graefes Arch. Ophthal., 1871. **17**: p. 249-291.
101. Leuenberger, D., et al., *Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins.* Embo J, 1999. **18**(17): p. 4816-22.
102. Leuenberger D, C.S., Wong D, Koehler CM., *The Role of Tim9p in the Assembly of the TIM22 Import Complexes.* Traffic, 2003. **4**(5): p. 144-52.
103. Lill, R.u.N., W., *Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane.* Trends Cell Biology, 1996. **6**: p. 56-61.
104. Lister, R., Mowday,B., Whelan,J. and Millar,A.H., *Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria.* Plant J., 2002. **30**: p. 555-566.
105. Lithgow, T., et al., *The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11973-7.

106. Luciano P, V.S., Vergnolle MA, Dyall SD, Robinson DR, Tokatlidis K., *Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex.* EMBO J., 2001. **20**(15): p. 4099-4106.
107. Luft R, I.D., Palmieri G, Ernster L, Afzelius B, *A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study.* J Clin Invest., 1962. **41**: p. 1776-1804.
108. Lutz T., N.W.a.H.J.M., *Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space.* EMBO Journal, 2003. **22**(17): p. 4400-8.
109. M.D. Rose, F.W., P. Hieter, *Methods in Yeast Genetics*. 1990, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
110. Maarse AC, B.J., Grivell LA, Meijer M, *MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria.* EMBO J, 1992. **11**(10): p. 3619-28.
111. Maarse, A.C., et al., *MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria.* EMBO J, 1992. **11**(10): p. 3619-28.
112. Maarse, A.C., et al., *Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import.* FEBS Lett, 1994. **349**(2): p. 215-21.
113. Madden, T., R. Tatusov, and J. Zhang, *Applications of network BLAST server.* Methods Enzymol, 1996. **266**: p. 131-141.
114. Maechler, P., *Novel regulation of insulin secretion: the role of mitochondria.* Curr Opin Investig Drugs, 2003. **4**(10): p. 1166-72.
115. Margulis, L., *The origin of eucaryotic cells*. 1970, New Haven: Yale University Press.
116. Martin, W., et al., *An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle.* Biol Chem, 2001. **382**(11): p. 1521-39.
117. Mayer, A., R. Lill, and W. Neupert, *Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria.* J Cell Biol, 1993. **121**(6): p. 1233-43.
118. Mayer, A., et al., *MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19.* Embo J, 1995. **14**(17): p. 4204-11.
119. Mayer, A., W. Neupert, and R. Lill, *Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding.* Cell, 1995. **80**(1): p. 127-37.
120. McLachlan, A., *Tests for comparing related amino-acidsequences. Cytochrome c and cytochrome c-551.* J Mol Biol, 1971. **61**: p. 409-424.
121. Melton, D.A., et al., *Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.* Nucleic Acids Res, 1984. **12**(18): p. 7035-56.
122. Mihara, K. and T. Omura, *Cytosolic factors in mitochondrial protein import.* Experientia, 1996. **52**(12): p. 1063-8.
123. Modrow, S., et al., *Carrier-bound synthetic peptides. Use as antigen in HIV-1 ELISA tests and in antiserum production.* J Immunol Methods, 1989. **118**(1): p. 1-7.
124. Mokranjac D, P.S., Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W, Hell K, *Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria.* EMBO J., 2003. **22**(4): p. 816-25.
125. Mokranjac, D., et al., *Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria.* EMBO J. **22**(19): p. 4945-56.
126. Moro, F., et al., *The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix.* Embo J, 1999. **18**(13): p. 3667-75.

127. Murphy, M.P., et al., *The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6132-8.
128. Nangaku, M., et al., *Cloning of a new human gene with short consensus repeats using the EST database.* Immunogenetics, 1997. **46**: p. 99-103.
129. Nelson, D.R., C.M. Felix, and J.M. Swanson, *Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family.* J Mol Biol, 1998. **277**(2): p. 285-308.
130. Neupert, W., *Protein import into mitochondria.* Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 863-917.
131. Neuwald, A.F., *Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency.* Curr Biol, 1997. **7**(8): p. R465-6.
132. Okamoto K, B.A., Paschen SA, Moarefi I, Hayer-Hartl M, Neupert W, Brunner M, *The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation.* EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3659-71.
133. Okubo K, H.N., Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K, *Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression.* Nat Genet, 1992. **2**: p. 173-179.
134. Overington, J., et al., *Environment-specific amino acid substitution tables: Tertiary templates and prediction of protein folds.* Prot Sci, 1992. **1**: p. 216-226.
135. Palmieri, F., *Mitochondrial carrier proteins.* FEBS Lett, 1994. **346**(1): p. 48-54.
136. Paschen, S.A. and W. Neupert, *Protein import into mitochondria.* IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 101-12.
137. Paschen, S.A., et al., *The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria.* Embo J, 2000. **19**(23): p. 6392-400.
138. Paschen SA, W.T., Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W, *Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins.* Nature, 2003. **426**(6968): p. 862-6.
139. Pelham, H.R. and R.J. Jackson, *An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.* Eur J Biochem, 1976. **67**(1): p. 247-56.
140. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes.*
141. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes.* Trends Biochem Sci, 1996. **21**(2): p. 51-2.
142. Pfanner, N., et al., *Mitochondrial precursor proteins are imported through a hydrophilic membrane environment.* Eur J Biochem, 1987. **169**(2): p. 289-93.
143. Pfanner, N., et al., *Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites.* Embo J, 1987. **6**(11): p. 3449-54.
144. Pfanner, N. and W. Neupert, *Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria.* J Biol Chem, 1987. **262**(16): p. 7528-36.
145. Rao, J., *New scoring matrix for amino acid residue exchanges based on residue characteristic physical parameters.* Int J Peptide Protein Res, 1987. **29**: p. 276-281.
146. Rapaport, D., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex.* Trends Biochem Sci., 2002. **27**(4): p. 191-7.
147. Rapaport, D., W. Neupert, and R. Lill, *Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence.* J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18725-31.
148. Risler, J., et al., *Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix.* J Mol Biol, 1988. **204**: p. 1019-1029.
149. Roesch, K., et al., *Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(5): p. 477-86.

150. Rose, M.D., *Methods in yeast genetics: a laboratory course*. 1990, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 198.
151. Rowley, N., et al., *Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding.* Cell, 1994. **77**(2): p. 249-59.
152. Ryan, K.R., et al., *SMS1, a high-copy suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import.* Mol Biol Cell, 1994. **5**(5): p. 529-38.
153. Ryan Lister, B.M., James Whelan and A. Harvey Millar, *Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria.* The Plant Journal, 2002. **30**(5): p. 555.
154. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
155. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
156. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Press.
157. Saraste, M. and J.E. Walker, *Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase.* FEBS Lett, 1982. **144**(2): p. 250-4.
158. Sastre, J., F.V. Pallardo, and J. Vina, *Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis.* IUBMB Life. **49**(5): p. 427-35.
159. Scherer, P.E., et al., *Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11930-4.
160. Schiestl, R.H. and R.D. Gietz, *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.* Curr Genet, 1989. **16**(5-6): p. 339-46.
161. Schleyer, M. and W. Neupert, *Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes.* Cell, 1985. **43**(1): p. 339-50.
162. Schlossmann, J., et al., *Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72.* J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11893-901.
163. Schneider, H.C., et al., *Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import.* Nature, 1994. **371**(6500): p. 768-74.
164. Schneider, H.C., et al., *The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import.* Embo J, 1996. **15**(21): p. 5796-803.
165. Schwartz, R. and M. Dayhoff, *Matrices for detecting distant relationships*, in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, M.O. Dayhoff, Editor. 1978, Natl. Biomed. Res. Found.: Washington, DC. p. 353-358.
166. Sellers, P., *Pattern recognition in genetic sequences by mismatch density.* Bull Math Biol, 1984. **46**: p. 501-514.
167. Shoffner J.M., W.D.C., in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, S.W.S. Beaudet A.L., Valle D., Editor. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 1535-1609.
168. Singh, G., M.T. Lott, and D.C. Wallace, *A mitochondrial DNA mutation as a cause of Leber's hereditary optic neuropathy.* N Engl J Med, 1989. **320**(20): p. 1300-5.
169. Sirrenberg, C., et al., *Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22.* Nature, 1996. **384**(6609): p. 582-5.
170. Sirrenberg, C., et al., *Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membranes of mitochondria.* J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29963-6.

171. Sirrenberg, C., et al., *Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5.* Nature, 1998. **391**(6670): p. 912-5.
172. Smith, T. and M. Waterman, *Identification of common molecular subsequences.* J Mol Biol, 1981. **147**: p. 195-197.
173. Söllner, T., et al., *Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates.* Nature, 1992. **355**(6355): p. 84-7.
174. States, D., W. Gish, and S. Altschul, *Improved sensitivity of nucleic acid database searches using application-specific scoring matrices.* Methods, 1991. **3**: p. 66-70.
175. Steger, H.F., et al., *Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel.* J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2353-63.
176. Steiner, S. and P. Philippsen, *Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus Ashbya gossypii.* Mol Gen Genet, 1994. **242**(3): p. 263-71.
177. Stueber, D., et al., *A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences.* Embo J, 1984. **3**(13): p. 3143-8.
178. Tanzi, R.E., et al., *The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene.* Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 344-50.
179. Tatusov, R. and E. Koonin, *A simple tool to search for sequence motifs that are conserved in BLAST outputs.* Appl Biosci, 1994. **10**: p. 457-459.
180. Taylor, W., *The classification of amino acid conservation.* J Theor Biol, 1986. **119**: p. 205-218.
181. Thomas BJ, R.R., *The genetic control of direct-repeat recombination in Saccharomyces: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene.* Genetics, 1989. **123**(4): p. 725-38.
182. Tokatlidis K, S.G., *Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins.* J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35285-8.
183. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
184. Tranebjaerg, L., et al., *A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22.* J Med Genet, 1995. **32**(4): p. 257-63.
185. Vestweber, D., et al., *A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site.* Nature, 1989. **21**(341 (6239)): p. 205-9.
186. Vial S, L.H., Allen S, Savory P, Thornton D, Sheehan J, Tokatlidis K, *Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone.* J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36100-8.
187. von Heijne, G., *Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices.* Embo J, 1986. **5**(6): p. 1335-42.
188. Wach, A., et al., *Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in Saccharomyces cerevisiae.* Yeast, 1997. **13**(11): p. 1065-75.
189. Wach, A., et al., *New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae.* Yeast, 1994. **10**(13): p. 1793-808.
190. Wallace, D.C., Brown, M. D., and Lott, M. T., in *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, D.L. Rimoin, Connor, J. M. , Pyeritz, R. E. , Emery, A. E. H., Editor. 1996, Churchill Livingstone: London. p. 277-332.
191. Westermann, B., et al., *Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 7063-71.

192. Wiesenberger G, L.T., von Ahsen U, Waldherr M, Schweyen RJ, *MRS3 and MRS4, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family.* J Mol Biol., 1991. **217**(1): p. 23-37.
193. Wilbur, W., *On the PAM matrix model of protein evolution.* Mol Biol Evol, 1985. **2**: p. 434-447.
194. Witte, C., et al., *MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease.* EMBO J, 1988. **7**(5): p. 1439-47.
195. Wolfsberg, T. and D. Landsman, *A comparison of expressed sequence tags (ESTs) to human genomic sequences.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**: p. 1626-1632.
196. Yamamoto H, E.M., Kanamori T, Tamura Y, Nishikawa S, Endo T, *Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes.* Cell, 2002. **111**(4): p. 519-28.
197. Yang, M., et al., *Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes.* EMBO J, 1988. **7**(12): p. 3857-62.
198. Yuan, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis in the nervous system.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 802-9.
199. Zhang, J. and T. Madden, *PowerBLAST: A new network BLAST application fpr interactive or automated sequence analysis and annotation.* Genome Res, 1997. **7**: p. 649-656.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander C. Adam
Geburtsdatum	23. März 1974
Geburtsort	München

Schulbildung

1984 bis 1993	Gymnasium Starnberg
Mai 1993	Abitur in den Fächern Physik, Chemie, Englisch und Religion

Hochschulbildung

seit November 1993	Medizinstudium an der LMU München
September 1995	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1997	USMLE Step 1
September 1997 – 2000	Dissertation am Adolf-Butenandt Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2000 – Oktober 2001	Praktisches Jahr in den Bereichen Innere Medizin, Chirurgie und Gynäkologie
November 2001	Dritter Abschnitt der Ärztliche Prüfung
Nov. 2001 – Nov. 2002	Arzt im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik des Klinikums Innenstadt der LMU München
seit Nov. 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Adolf-Butenandt Instituts für Physiologische Chemie der LMU München