

Das Disulfidbrücken-Transfer-System der Mitochondrien

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

vorgelegt von

Nikola Mesecke

aus

Göttingen

München 2008

Dissertation eingereicht am 20.02.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Proteinimport in Mitochondrien..... | 1 |
| 1.1.1 | Import von Proteinen in den mitochondrialen Intermembranraum | 3 |
| 1.1.2 | Mia40, ein Intermembranraumrezeptor | 5 |
| 1.2 | Erv1, die Sulphydryloxidase des Intermembranraums | 8 |
| 1.2.1 | Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven | 11 |
| 1.2.2 | Hot13, ein Assemblierungsfaktor im Intermembranraum? | 12 |
| 1.3 | Thiolredoxkontrolle in <i>S. cerevisiae</i> | 14 |
| 1.3.1 | Glutaredoxine..... | 15 |
| 1.3.2 | Proteinfaltung im sekretorischen Transportweg..... | 16 |
| 1.4 | Fragestellung und Zielsetzung | 18 |
| 2 | Material und Methoden..... | 20 |
| 2.1 | Molekularbiologische Methoden | 20 |
| 2.1.1 | Verwendete Plasmide | 20 |
| 2.1.2 | Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> | 21 |
| 2.1.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 21 |
| 2.1.4 | Restriktionsverdau von DNS | 22 |
| 2.1.5 | Ligation..... | 22 |
| 2.1.6 | Zwischenklonierung..... | 22 |
| 2.1.7 | Präparation elektrokompetenter Zellen..... | 23 |
| 2.1.8 | Präparation hitzeschockkompetenter Zellen..... | 23 |
| 2.1.9 | Transformation mittels Elektroporation..... | 23 |
| 2.1.10 | Transformation mittels Hitzeschock..... | 24 |
| 2.1.11 | Analytische und präparative Gelelektrophorese..... | 24 |
| 2.1.12 | Konzentrationsbestimmung | 24 |
| 2.1.13 | Klonierungsstrategien | 25 |
| 2.2 | Genetische Methoden..... | 26 |
| 2.2.1 | Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> | 26 |
| 2.2.2 | Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> | 27 |
| 2.2.3 | Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> | 28 |
| 2.2.4 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 28 |
| 2.2.5 | Isolierung genomischer DNS aus Hefe..... | 28 |
| 2.2.6 | Überprüfen eines Rekombinationsereignisses in <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 2.2.7 | Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 2.2.8 | Konstruktion der Hefestämme | 29 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden..... | 31 |
| 2.3.1 | SDS-Gelelektrophorese | 31 |
| 2.3.2 | Färben von Polyacrylamid-Gelen..... | 32 |
| 2.3.3 | Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot).. | 32 |
| 2.3.4 | Autoradiographie und Densitometrie..... | 32 |
| 2.3.5 | Synthese von ³⁵ S-markierten Proteinen <i>in vitro</i> | 33 |
| 2.3.6 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen..... | 33 |
| 2.3.7 | Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure | 33 |
| 2.3.8 | Überexpression und Reinigung von Proteinen | 34 |
| 2.3.8.1 | Reinigung von Cox17 | 34 |
| 2.3.8.2 | Reinigung von Grx6 und Grx7 | 35 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 35 |
| 2.4.1 | Isolierung von Mitochondrien aus Hefe | 35 |
| 2.4.2 | Erzeugung von Mitoplasten | 36 |
| 2.4.3 | Import von Proteinen in Mitochondrien | 36 |
| 2.4.4 | HEDS-Assay | 37 |
| 2.4.5 | RNase-Rückfaltungsassay | 37 |
| 2.4.6 | Sensitivitätsassays..... | 38 |
| 2.5 | Immunologische Methoden | 38 |
| 2.5.1 | Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen..... | 38 |
| 2.5.2 | Verwendete Antikörper..... | 38 |
| 2.5.3 | Affinitätsreinigung von Antikörpern | 39 |
| 2.5.4 | Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)..... | 40 |
| 2.5.5 | Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen | 41 |
| 2.6 | Puffer und Medien | 41 |
| 2.7 | Geräte..... | 43 |
| 3 | Ergebnisse..... | 44 |
| 3.1 | Import löslicher Proteine mit konservierten Cysteinmotiven in den Intermembranraum von Mitochondrien..... | 44 |
| 3.1.1 | Nachweis der Interaktion von Mia40 mit seinem Substrat Cox17 | 44 |
| 3.1.2 | Der Import von Cox17 und Tim13 wird durch hohe DTT-Konzentrationen inhibiert..... | 46 |
| 3.1.3 | Die Depletion von Erv1 beeinträchtigt die endogenen Level bestimmter Intermembranraumproteine | 47 |
| 3.1.4 | Die Expression löslicher Intermembranraumproteine ist Erv1-unabhängig | 49 |
| 3.1.5 | Die endogenen Erv1-Mengen beeinflussen die Sensitivität gegenüber DTT <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> | 50 |
| 3.1.6 | Erv1-abhängiger Import unter physiologischen Bedingungen | 54 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.7 | Die Mia40-Substrat-Interaktion ist abhängig von Erv1 | 56 |
| 3.1.8 | Der Redoxzustand von Mia40 ist entscheidend für den Import von Cox17 und Tim13 | 57 |
| 3.1.9 | Der Import von Cox17 überführt Mia40 in die reduzierte Konformation.. | 59 |
| 3.1.10 | Mia40 wird durch Erv1 oxidiert | 60 |
| 3.2 | Die Rolle von Hot13 beim Import löslicher Intermembranraum-proteine | 62 |
| 3.2.1 | Hot13 hat keinen Einfluss auf die endogenen Level von Intermembranraum-proteinen mit konservierten Cysteinmotiven | 62 |
| 3.2.2 | Die Toleranz gegenüber reduzierenden oder oxidierende Substanz ist unabhängig von Hot13 | 64 |
| 3.2.3 | Hot13 beeinflusst den Redoxzustand von Mia40 | 65 |
| 3.2.4 | Der Tim13-Import ist in $\Delta hot13$ -Mitochondrien nicht beeinträchtigt | 67 |
| 3.3 | Charakterisierung zweier neuartiger Glutaredoxine des sekretorischen Transportweges | 68 |
| 3.3.1 | Identifizierung zweier uncharakterisierter Gene putativer Glutaredoxine | 68 |
| 3.3.2 | Grx6 und Grx7 sind im <i>cis</i> -Golgi-Apparat lokalisiert | 70 |
| 3.3.3 | Grx7 exponiert seine lösliche Domäne zum Golgi-Lumen | 72 |
| 3.3.4 | Grx6 und Grx7 werden in Mikrosomen importiert..... | 74 |
| 3.3.5 | Grx6 und Grx7 zeigen Glutaredoxinaktivität <i>in vitro</i> | 75 |
| 3.3.6 | Grx6 kompensiert oxidativen Stress | 78 |
| 3.3.7 | Grx7 hat keinen Einfluss auf die Pdi1-Aktivität..... | 79 |
| 4 | Diskussion..... | 82 |
| 4.1 | Die Bedeutung von Mia40 und Erv1 im Importprozess löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven | 82 |
| 4.1.1 | Die Mia40-Substrat-Interaktion..... | 82 |
| 4.1.2 | Die stabile Faltung beruht auf der Bildung von Disulfidbrücken..... | 83 |
| 4.1.3 | Die Sulphydryloxidaseaktivität von Erv1 ist essentiell für die Biogenese von Intermembranraumproteinen..... | 83 |
| 4.1.4 | Die Oxidation von Mia40 durch Erv1 ist notwendig für den Import | 84 |
| 4.1.5 | Der Mia40-Erv1-Zyklus | 85 |
| 4.1.6 | Die Rolle der Atmungskette im Importprozess der Intermembranraumproteine | 87 |
| 4.1.7 | Vergleich verschiedener Systeme oxidativer Proteinfaltung..... | 88 |
| 4.1.8 | Substrate des Mia40-Erv1-abhängigen Importweges | 88 |
| 4.2 | Welche Funktion übernimmt Hot13 im Intermembranraum?..... | 89 |
| 4.2.1 | Hot13 hat keinen Einfluss auf die endogenen Mengen mitochondrialer Intermembranraumproteine..... | 89 |
| 4.2.2 | Hot13 unterstützt die Oxidation von Mia40 | 90 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2.3 | Die Rolle von Metallionen im Importprozess..... | 91 |
| 4.3 | Glutaredoxine im sekretorischen Transportweg..... | 93 |
| 4.3.1 | Die Entdeckung neuartiger Monothiolglutaredoxine | 93 |
| 4.3.2 | Lokalisation und Topologie von Grx6 und Grx7..... | 94 |
| 4.3.3 | Grx6 und Grx7 besitzen Glutaredoxinaktivität..... | 95 |
| 4.3.4 | Grx7 zeigt keinen Einfluss auf die oxidative Proteinfaltung durch Pdi1 | 96 |
| 5 | Zusammenfassung | 98 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 100 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis..... | 112 |
| | Danksagung | 112 |
| | Lebenslauf..... | 115 |

1 Einleitung

1.1 Proteinimport in Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen eukaryotischer Organismen, die unter anderem durch zwei Membranen charakterisiert sind. Die äußere Membran grenzt das Organell vom Zytosol ab, und die innere Membran führt zu einer Subkompartimentierung innerhalb der Mitochondrien. Zwischen innerer und äußerer Membran liegt der Intermembranraum, der nur ein geringes Volumen des Organells beansprucht. Von der Innenmembran wird die mitochondriale Matrix umschlossen. Die Innenmembran bildet Invaginationen in die Matrix aus, sogenannte *Cristae*, die zur Oberflächenvergrößerung führen (Mannella *et al.*, 2001; Gilkerson *et al.*, 2003). Evolutionär gehen Mitochondrien auf die Endosymbiose aerober α -Proteobakterien mit anaeroben Vorläuferzellen zurück (Margulis, 1971). So stellen sie durch Atmung und damit verbundene oxidative Phosphorylierung der Zelle Energie in Form von ATP zur Verfügung. Außerdem ist in Mitochondrien die für den Zellmetabolismus essentielle Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern lokalisiert (Mühlenhoff *et al.*, 2000). Sie besitzen aufgrund ihres evolutionären Ursprungs ein eigenes Genom, auf dem jedoch nur wenige mitochondriale Proteine kodiert sind (Borst *et al.*, 1978). Der Großteil ist in der nukleären DNS verschlüsselt und wird im Zytosol synthetisiert. Diese Proteine müssen anschließend in die Mitochondrien und dort in die verschiedenen Subkompartimente importiert werden. Dieser Prozess wurde in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* studiert (Herrmann und Neupert, 2000; Neupert, 1997; Pfanner *et al.*, 1997).

Aufgrund der mitochondrialen Subkompartimentierung wird für die kernkodierten Proteine ein komplexes Importsystem benötigt. Die Sortierung von Proteinen erfolgt in der Zelle unter anderem mit Hilfe von Sortierungssignalen. Dabei unterscheidet man zwischen N-terminalen und internen Sortierungssignalen. Mitochondriale N-terminale Sortierungssignale tragen viele positiv geladene Aminosäurereste und bilden eine amphipathische Helix aus, die nach Erreichen der Matrix abgespalten wird (Hurt *et al.*, 1984; von Heijne, 1986; Roise *et al.*, 1988). Interne Sortierungssignale sind innerhalb eines Proteins lokalisiert und werden in der Regel nicht prozessiert. Die äußere Membran der Mitochondrien ist zwar für niedermolekulare Substanzen durch

sogenannte Porine permeabel, Proteine können die Porine aber nicht passieren und sind auf eigene Translokasen angewiesen. Mittlerweile sind in Mitochondrien vier Komplexe bekannt, die für den Proteinimport verantwortlich sind: der TOM-, der TOB-, der TIM23- und der TIM22-Komplex.

Der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane of mitochondria*) ist in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert und ermöglicht den Transport von Proteinen über und in diese Membran. Er besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Tom20 und Tom70 bilden die primären Rezeptoren, die jeweils N-terminale bzw. interne Sortierungssignale mitochondrialer Proteine erkennen. Von Tom20 und Tom70 werden erkannte Proteine durch sequentielle Interaktion über das Rezeptorprotein Tom22 mit Hilfe der kleinen Tom-Proteine an Tom40 übergeben, das die zentrale Importpore bildet (Herrmann *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 2003; Pfanner *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004; van der Laan *et al.*, 2006; Rehling *et al.*, 2004; Hoogenraad *et al.*, 2002). Der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer-membrane β -barrel proteins*) befindet sich ebenfalls in der Außenmembran und ist dort zusammen mit dem TOM-Komplex für die Insertion von β -barrel-Proteinen verantwortlich (Pfanner, 2004 *et al.*; Paschen *et al.*, 2005; Waizenegger *et al.*, 2004).

In der Innenmembran befinden sich zwei weitere auf Proteintranslokation und Proteininsertion spezialisierte Komplexe. Der TIM23-Komplex (*translocase of the inner membrane of mitochondria*) ermöglicht den Transport von Proteinen mit N-terminalen Sortierungssignalen vom Intermembranraum entweder in die Matrix oder direkt in die Innenmembran, wenn dem Sortierungssignal eine hydrophobe Domäne folgt (Glick *et al.*, 1992). Dieser Importweg ist abhängig vom Membranpotential und der Hydrolyse von ATP. Das Membranpotential wird für die Translokation des positiv geladenen Sortierungssignals auf die negativ geladene *trans*-Seite der Innenmembran benötigt (Martin *et al.*, 1991). Anschließend kommt es zur ATP-abhängigen Bindung von Chaperonen der Hsp70-Familie an das Polypeptid in der Matrix, die eine Rückdiffusion verhindern (Manning-Krieg *et al.*, 1991; Bauer *et al.*, 2000).

Der TIM22-Komplex katalysiert die Insertion polytooper Innenmembranproteine Membranpotential-abhängig (Jensen *et al.*, 2002; Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004). Typischerweise verfügen seine Substrate über interne Sortierungssignale (Pfanner *et al.*, 1987; Smagula *et al.*, 1988; Palmisano *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer starken Hydrophobizität werden TIM22-Substrate von bestimmten Chaperonen durch das wässrige Milieu des Intermembranraums zu ihrem Insertionsort, dem TIM22-Komplex,

geleitet. Diese Intermembranraumchaperone werden als TIM9-TIM10- und TIM8-TIM13-Komplex bezeichnet (Webb *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2006; van der Laan *et al.*, 2006; Adam *et al.*, 1999; Paschen *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 1998).

Mono- oder polytope Innenmembranproteine mit mitochondrialen Sortierungssignalen können auch mit Hilfe von TIM23 und Oxa1, einer weiteren Komponente der Innenmembran, über den sogenannten „konservativen Sortierungsweg“ inseriert werden. Oxa1 ist allerdings spezifisch für die Proteininsertion von der Matrixseite aus. Zu seinen Substraten zählen neben kernkodierten Proteinen auch mitochondrial kodierte Proteine wie z.B. einige Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Herrmann *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 2003; Rehling *et al.*, 2004).

Über den Import in den Intermembranraum ist nur wenig bekannt. Im folgenden Kapitel wird auf den Proteinimport in dieses Kompartiment gesondert eingegangen.

1.1.1 Import von Proteinen in den mitochondrialen Intermembranraum

Obwohl der Intermembranraum nur einen sehr geringen Teil des mitochondrialen Volumens ausmacht, laufen hier grundlegende zelluläre Prozesse ab. Teile der Zellatmung, wie z.B. der Transfer von Elektronen durch das lösliche Cytochrom *c* von der Cytochrom *c*-Reduktase auf die Cytochrom *c*-Oxidase, sind hier lokalisiert. Hydrophobe Proteine der Innenmembran, die über die TIM22-Translokase inseriert werden, gelangen mit Hilfe der kleinen TIM-Komplexe trotz des wässrigen Milieus an ihren Bestimmungsort. Cox17 transportiert Metallionen zur Cytochrom *c*-Oxidase, wo sie für die Assemblierung des Atmungskettenkomplexes benötigt werden. Außerdem sind einige Apoptosefaktoren im Intermembranraum lokalisiert, bevor sie nach Induktion der Apoptose freigesetzt werden. Während viele dieser Komponenten bezüglich ihrer Funktion weitreichend charakterisiert worden sind, ist über den Import insbesondere der löslichen Proteine nur sehr wenig bekannt.

Alle mitochondrialen Intermembranraumproteine sind im Nukleus kodiert und gelangen über einen spezifischen Importmechanismus an ihr Ziel in den Mitochondrien. Viele von ihnen weisen jedoch keine typischen N-terminalen Sortierungssignale auf und müssen anderweitig als Intermembranraumproteine gekennzeichnet werden. Auf Grundlage ihrer Sortierungssignale, strukturellen Merkmale und Energieanforderungen während des Imports wurden sie bisher in drei Klassen unterteilt (Herrmann und Hell,

2005; Koehler, 2004; Stuart *et al.*, 1996).

Proteine der Klasse I tragen sogenannte zweiteilige N-terminale Präsequenzen. Sie bestehen aus einigen positiv geladenen Aminosäureresten gefolgt von einer hydrophoben Domäne. Wie bereits erwähnt, werden diese Proteine membranpotential- und ATP-abhängig durch die TIM23-Translokase lateral in die Innenmembran inseriert. Mit der Insertion geht zunächst die Prozessierung des positiv geladenen Matrixsortierungssignals durch MPP (*mitochondrial processing peptidase*) auf der Matrixseite einher. Anschließend findet die proteolytische Spaltung durch IMP (*inner membrane peptidase*) auf der Intermembranraumseite statt. So wird das maturierte Protein in den Intermembranraum freigesetzt. Beispiele für solche Proteine sind Cytochrom b_2 (Glick *et al.*, 1992), Cytochrom c -Peroxidase (Michaelis *et al.*, 2005) und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (Haucke *et al.*, 1997).

Die Klasse II umfasst Proteine von relativ geringem Molekulargewicht, die normalerweise nur eine Faltungsdomäne aufweisen. Ihr Import ist unabhängig von den Rezeptorproteinen des TOM-Komplexes und sie können die Außenmembran in beide Richtungen durch die zentrale Importpore passieren (Kurz *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 2003). Da diese Proteine keine klassischen Sortierungssignale tragen und membranpotential- und ATP-unabhängig importiert werden, muss die Energie die benötigt wird, um sie gegen das Konzentrationsgefälle im Intermembranraum zu halten, in anderer Form zur Verfügung gestellt werden. Diese Proteine zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Kofaktoren zu komplexieren oder Disulfidbrücken zu bilden. Die Faltung setzt das Energieniveau der Proteine herab und stabilisiert so ihr Verbleiben im Intermembranraum („*folding trap*-Mechanismus“, Lutz *et al.*, 2003). Ein gut studiertes Beispiel dieser Gruppe ist Cytochrom c . Das Apoprotein überquert die Außenmembran über den TOM-Komplex und interagiert dann auf der *trans*-Seite mit der Cytochrom c -Hämlyase. Dieses Enzym transferiert eine Hämgruppe auf Cytochrom c und setzt es als Holoprotein frei. Das stabil gefaltete Protein kann die TOM-Pore nicht mehr passieren und bleibt im Intermembranraum zurück (Nicholson *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1991; Diekert *et al.*, 2001). Ein ähnliches Beispiel ist Sod1, die Cu/Zn-Superoxiddismutase des Intermembranraums. Sie gelangt ungefaltet in den Intermembranraum, wo sie mit ihrem Kupferchaperon Ccs1 interagiert, das ein Kupferion und gleichzeitig eine Disulfidbrücke überträgt (Field *et al.*, 2003). Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind relativ kleine Proteine, deren Aminosäuresequenz konservierte Cysteinmotive aufweist. Es wird diskutiert, ob die

Klasse II steht (Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005, Chacinska *et al.*, 2004). Dieses Protein wurde Mia40 für *mitochondrial intermembrane space import and assembly* genannt. Die Depletion von Mia40 hemmt die Biogenese einiger Intermembranraumproteine wie die der kleinen Tim-Proteine, Cox17 und Cox19 hemmt (Chacinska *et al.*, 2004, Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005). Mia40 interagiert direkt mit einigen Substratproteinen während deren Import in den Intermembranraum (Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005, Chacinska *et al.*, 2004).

Homologe von Mia40 findet man in allen Eukaryoten von Pilzen über Pflanzen bis zu Säugern einschließlich des Menschen. Sie sind vor allem in ihrer C-terminalen Domäne hoch konserviert und weisen dort sechs Cysteinreste auf, die in allen Spezies in identischen Mustern angeordnet sind (Herrmann *et al.*, 2007). Proteine aus Pilzen mit Homologie zu Mia40 werden mit einem mitochondrialen Sortierungssignal, gefolgt von einer Transmembrandomäne synthetisiert. Während zunächst vermutet wurde, dass es sich dabei um eine zweiteilige Präsequenz handelt (Chacinska *et al.*, 2004) konnte später gezeigt werden, dass keine proteolytische Spaltung des Transmembransegments stattfindet und Mia40 permanent in der Innenmembran verankert wird (Terziyska *et al.*, 2005). Die Membranbindung ist allerdings nicht essentiell für die Funktion von Mia40, wie durch die Fusion der konservierten C-terminalen Domäne mit der zweiteiligen Präsequenz von Cytochrom *b*₂ gezeigt werden konnte. Dieses Konstrukt konnte die Deletion von Mia40 komplementieren (Naoé *et al.*, 2004). Für Bäckerhefe spezifisch ist eine weitere Domäne, die zwischen dem Membrananker und dem konservierten C-Terminus liegt. Sie enthält viele saure Aminosäurereste und ihre Funktion ist ungeklärt. Interessanterweise findet man im Genom von *S. cerevisiae* selbst einen homologen Bereich, der auf Chromosom XII (Nukleotide 351207- 351591) liegt. Möglicherweise kam es während der Evolution zur Duplikation dieses DNS-Bereiches und zu seiner Insertion in den offenen Leserahmen von *MIA40* (Herrmann *et al.*, 2007).

Der konservierte C-Terminus umfasst ungefähr 60 Aminosäurereste. Die sechs hochkonservierten Cysteinreste sind in folgendem Muster angeordnet: CPC-X₈-CX₉C-X₁₂-CX₉C. Die Funktion der einzelnen Cysteinreste ist zwar bisher noch nicht bekannt, aber der Austausch des ersten, zweiten oder dritten Paares gegen Serinreste ist letal für die Zelle (Terziyska *et al.*, 2005; Naoé *et al.*, 2004). Bemerkenswerterweise gleicht das Muster der letzten beiden Cysteinpaare dem einiger Substratproteine. Der Grund für diese Übereinstimmung ist allerdings unbekannt.

Rekombinant exprimiertes Mia40 kann Zink- und Kupferionen komplexieren

(Terziyska *et al.*, 2005). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Entfernen von Metallionen durch Chelatoren zur proteolytischen Instabilität von Mia40 führt. Dabei waren die Cysteinreste maßgeblich für die Komplexierung der Ionen verantwortlich (Kai Hell, persönliche Mitteilung). Ob Mia40 dennoch *in vivo* Metallionen komplexiert oder ausschließlich in oxidierter Konformation vorliegt, bleibt zu untersuchen.

Da Hefen, in denen *MIA40* deletiert wurde, nicht mehr lebensfähig sind, wurden für alle bisher zur Funktion von Mia40 durchgeführten Experimente Temperatursensitive (*ts*) Mutanten oder Mia40-depletierbare Stämme verwendet. Die Depletion von Mia40 führte in beiden Fällen zum Verlust bestimmter Intermembranraumproteine. Außerdem zeigten Importexperimente in isolierte Mitochondrien, dass Mia40 direkt mit neu importierten Proteinen interagiert, bevor sie in ihre Komplexe assemblieren. Diese Beobachtungen sind spezifisch für Proteine mit konservierten CX₃C- oder CX₉C-Motiven, denn andere Proteine der Klasse II wie Cytochrom *c* sind nicht von der Mia40-Depletion betroffen. Für seine Substrate aber scheint Mia40 eine Rezeptorfunktion zu übernehmen, die essentiell für ihre Biogenese ist (Chacinska *et al.*, 2004; Naoé *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005).

Das menschliche Homolog von Mia40 besteht nur aus einer löslichen Domäne, die 75% Sequenzähnlichkeit zum hochkonservierten C-terminalen Bereich des Hefeproteins aufweist. Die Depletion des menschlichen MIA40 hatte ebenfalls den Verlust von Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven zur Folge. Außerdem konnte sowohl für Mia40 aus Hefe als auch für das menschliche Homolog oxidierte und reduzierte Konformere nachgewiesen werden (Hofmann *et al.*, 2005; Mesecke *et al.*, 2005). Somit scheinen beide Proteine aus Mensch und Hefe trotz der strukturellen Unterschiede vergleichbare Funktionen zu übernehmen.

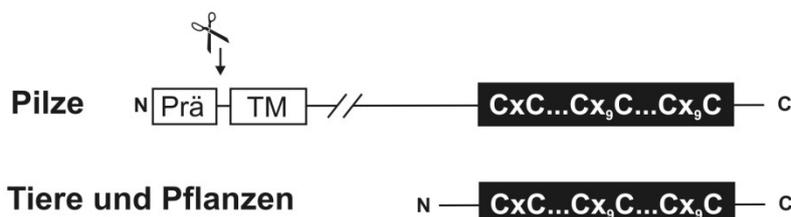


Abbildung 1.2 Struktureller Aufbau von Mia40

Die schematische Darstellung von Mia40 zeigt die C-terminale Domäne mit den konservierten Cysteinresten als schwarzen Kästen. In Pilzen ist das Protein N-terminal verlängert und trägt eine spaltbare Präsequenz, gefolgt von einer Transmembrandomäne, die das Protein in der Innenmembran verankert. Zwischen der Transmembrandomäne und dem konservierten C-Terminus befindet sich ein für *S. cerevisiae* spezifischer, stark negativ geladener Bereich.

1.2 Erv1, die Sulphydryloxidase des Intermembranraums

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde Erv1 ursprünglich identifiziert als ein Protein *essential for respiration and vegetative growth* (Lisowsky, 1992). Das mitochondriale Hefeprotein repräsentierte als erstes Mitglied eine in allen Eukaryoten verbreitete Proteinfamilie (Hagiya *et al.*, 1994; Coppock *et al.*, 2006; Polimeno *et al.*, 1999). Alle Proteine dieser Familie weisen eine konservierte FAD-Bindedomäne auf, die ein ebenfalls konserviertes Cysteinmotiv (CXXC) enthält. Dieses Motiv ist charakteristisch für redoxaktive Proteine und normalerweise in Domänen zu finden, die die sogenannte Thio-redoxinfaltung aufweisen. Übereinstimmend konnte auch für Proteine der Erv1-Familie Sulphydryloxidaseaktivität nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001; Farrel *et al.*, 2005). Das bestcharakterisierte Mitglied ist Erv2, eine Sulphydryloxidase des endoplasmatischen Retikulums (ER) in Pilzen (Gerber *et al.*, 2001; Sevier *et al.*, 2001), und viele Annahmen über den Reaktionsmechanismus von Erv1 resultieren aus Erkenntnissen über Erv2.

Erv1 aus Hefe besteht aus zwei strukturellen Segmenten (Abb. 1.4). Die N-terminale Domäne umfasst 72 Aminosäurereste und ist reich an Glyzin- und Prolinresten, die dem Bereich eine besondere Flexibilität verleihen. Er enthält außerdem ein CXXC-Motiv, das essentiell für die Funktion des Proteins ist (Hofhaus *et al.*, 1999). Der C-terminale Bereich ist konserviert und stellt die FAD-Bindedomäne dar, die aus 117 Aminosäureresten besteht. Dieser Bereich weist 30% Sequenzidentität zur FAD-Bindedomäne von Erv2 auf und gerade die funktionell wichtigen Aminosäurereste stimmen überein. Durch spektroskopische Untersuchungen und zusätzlich durch Röntgenstrukturanalysen von Erv2 (Gross *et al.*, 2002) konnte der nicht-kovalent gebundene Kofaktor FAD in Erv1 und Erv2 (Lee *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001) nachgewiesen werden.

Die Faltung der FAD-Bindedomäne wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, deren beteiligte Cysteinreste zwar in keinem spezifischen Motiv angeordnet, aber konserviert sind. Sowohl Erv1 als auch Erv2 bilden Homodimere, deren Untereinheiten transient durch Disulfidbrücken verbunden sind (Lee *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2002; Vala *et al.*, 2005). Die Strukturaufklärung der C-terminalen Domäne von Erv2 konnte dieses Phänomen und damit den Mechanismus des Elektronentransfers vom Substrat auf den Kofaktor FAD über die verschiedenen Disulfidbrücken weitgehend erklären (Gross *et al.*, 2002).

Das essentielle CXXC-Motiv der FAD-Bindedomäne ist in räumlicher Nähe zum Isoalloxazinring des FAD angeordnet. Dadurch wird der Elektronentransfer zwischen beiden Redoxpartnern erleichtert. Während Erv1 und Erv2 sich innerhalb dieser Domäne stark ähneln, unterscheiden sie sich in den flankierenden Bereichen voneinander. Erv2 trägt C-terminal der FAD-Bindedomäne ein weiteres CXC-Motiv, das in Erv1 nicht vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv Teil eines flexiblen Arms ist, der mit dem CXXC-Motiv der gegenüberliegenden Untereinheit in Kontakt treten kann. Es kommt dabei vorübergehend zur kovalenten Bindung der beiden Untereinheiten des Dimers, bei der das CXC-Motiv oxidiert wird. Das auf diese

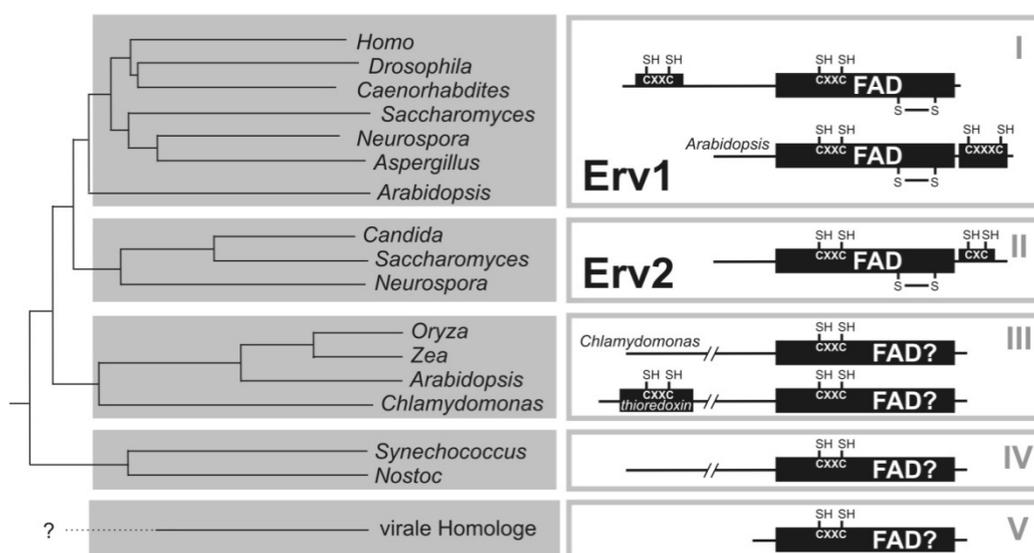


Abbildung 1.3 Phylogenetische Analyse der Mitglieder der Erv1-Familie

Ein phylogenetischer Stammbaum wurde auf Basis der Proteine mit Homologie zu Erv1 mit Hilfe der DNAMAN Software (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) berechnet. Die strukturelle Organisation der Mitglieder verschiedener Äste ist dargestellt wie in Abb. 1.4. Die viralen Proteine sind hoch variabel und können daher nicht zuverlässig zugeordnet werden. Die Sequenzen, die für die Analyse verwendet wurden, sind für Gruppe I *Homo sapiens* (NP_005253), *Drosophila melanogaster* (AY094854.1), *Caenorhabditis elegans* (AAB97554), *S. cerevisiae* (NP_075527), *Neurospora crassa* (XP_959716), *Aspergillus nidulans* (XP_660631), *Arabidopsis thaliana* (AAM63908), für Gruppe II *Candida albicans* (XP_720875), *S. cerevisiae* (NP_015362), *N. crassa* (NP_015362), für Gruppe III *Oryza sativa* (AAT85195), *Zea mays* (AAW66880), *A. thaliana* (AAF31025), *Chlamydomonas reinhardtii* (AAV32452), für Gruppe IV *Synechococcus sp.* CC9605 (ABB34539), *Nostoc punctiforme* (ZP_00107616) und für Gruppe V *African swine fever virus* (NP_042767).

Weise aktivierte CXC-Motiv des flexiblen Arms ist nun wiederum in der Lage Disulfidbrücken in Substrate einzuführen (Gross *et al.*, 2002; Vala *et al.*, 2005). Möglicherweise spielt in Erv1 das N-terminale CXXC-Motiv, das wiederum nicht in Erv2 auftritt, eine analoge Funktion im Elektronentransfer vom Substrat zum FAD-Zentrum.

Das menschliche Homolog von Erv1 wird als *augmenter of liver regeneration* (ALR) bezeichnet, da es in einer systematischen Suche nach hepatotropen Wachstumsfaktoren identifiziert wurde (Hagiya *et al.*, 1994). Dennoch ist nichts Weiteres über die Funktion von ALR bekannt und sein Wirkungsmechanismus bleibt ungeklärt.

In *S. cerevisiae* ist Erv1 im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Lange *et al.*, 2001). Anhand von Experimenten mit einem Hefestamm, der ein temperatursensitives Allel von *ERV1* exprimiert, wurden dem Protein Funktionen bei der Assemblierung der Atmungskette und der Verteilung der Mitochondrien in der Zelle zugeschrieben (Lisowsky, 1992; Becher *et al.*, 1999; Lisowsky, 1994). Desweiteren wurde gezeigt, dass Erv1 für die Biogenese zytosolischer Eisen-Schwefel-Cluster, nicht aber für die der mitochondrialen notwendig ist (Lange *et al.*, 2001). Ob diese Effekte direkt oder indirekt von Erv1 abhängen, ist allerdings noch unklar, da bisher kein Substrat identifiziert werden konnte.

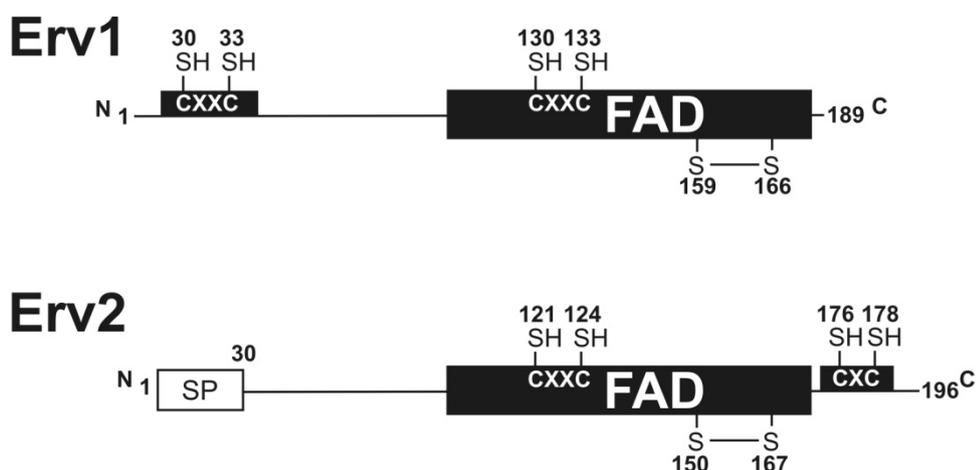


Abbildung 1.4 Strukturelle Organisation von Erv1 und Erv2

Der schematische Aufbau von Erv1 und Erv2 ist dargestellt. Die Zahlen geben die Positionen bestimmter Aminosäurereste an. Die konservierten Domänen sind als schwarze Kästen dargestellt. Die katalytisch aktiven Cysteinmotive und die strukturellen Disulfidbrücken sind hervorgehoben. SP, Signalpeptid für die Sortierung von Erv2 ins endoplasmatische Retikulum.

1.2.1 Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven

Einige Proteine der Klasse II, wie z.B. Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, Tim13, die Assemblierungsfaktoren des Komplex IV Cox17, Cox19, Cox23 und Mdm35 tragen hochkonservierte Cysteinsignaturen in ihrer Aminosäuresequenz. Sie sind dort entweder in CX₃C-, wie bei den kleinen Tim-Proteinen, oder CX₉C-, „Twin“-Motiven angeordnet (Koehler, 2004; Bauer *et al.*, 2000). Jeder der vier Cysteinreste der beiden CX₃C-Motive ist notwendig für den Import, die Faltung und die Assemblierung der kleinen Tim-Proteine in ihre Komplexe (Lutz *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2002; Roesch *et al.*, 2002). Röntgenstrukturanalyse des TIM9-TIM10-Komplexes zeigte eine Haarnadelstruktur der Untereinheiten, die auf der Bildung intramolekularer Disulfidbrücken beruht (Webb *et al.*, 2006). Mehrere Studien postulieren, dass die assemblierten Proteine in oxidiertem Konformation vorliegen (Allen *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; Curran *et al.*, 2002a; Curran *et al.*, 2002b). Auf der anderen Seite gibt es Evidenz für die Bindung von Zinkionen durch Tim13 in Abhängigkeit von den Cysteinmotiven *in vitro* (Hofmann *et al.*, 2002; Sirrenberg *et al.*, 1998; Paschen *et al.*, 2000), und *in vivo* konnte ebenfalls die reduzierte Konformation nachgewiesen werden (Lutz *et al.*, 2003). Interessanterweise würde das Redoxpotential dieser Proteine eine Oxidation ihrer Cysteinreste direkt nach der Synthese im Zytosol zulassen. Daher wurde vorgeschlagen, dass sie dort bereits Zinkionen binden, um die für den Import notwendige reduzierte Konformation zu stabilisieren (Lu *et al.*, 2005). Eventuell werden die Ionen nach dem Import abgegeben und die Cysteinreste oxidiert.

Proteine mit CX₉C-Motiven bilden zwei antiparallele Helices, in denen die Cysteinmotive angeordnet sind. Diese Konformation kann durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden Helices stabilisiert werden. Das bestbeschriebene Mitglied dieser Gruppe ist Cox17, das als lösliches Metallochaperon des Intermembranraums Kupfer für die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase bereitstellt. Strukturelle Analysen von Cox17 zeigten das Protein in drei verschiedenen Konformationen. Bei vollständiger Oxidation der CX₉C-Motive bindet Cox17 keine Metallionen (Arnesano *et al.*, 2005). Vollständig reduziertes Cox17 bindet bis zu vier Kupferionen im Monomer (Srinivasan *et al.*, 1998). Ob beide Konformationen physiologisch relevant sind, bleibt allerdings fraglich.

Tabelle 1.1 Einige bekannte Substrate des Mia40-Erv1-abhängigen Importweges

| Substrat | Cysteinmotiv | Funktion | Literatur |
|-----------------|--------------------------------------|---|---|
| Cox17 | <i>twin</i> CX ₉ C | Kupferchaperon zur COX-Assemblierung | Abajian <i>et al.</i> , 2004; Hornig <i>et al.</i> , 2004; Mesecke <i>et al.</i> , 2005 |
| Cox19 | <i>twin</i> CX ₉ C | COX-Assemblierungsfaktor (putatives Kupferchaperon) | Nobrega <i>et al.</i> , 2002; Rigby <i>et al.</i> , 2007; Chacinska <i>et al.</i> , 2004 |
| Tim8 | <i>twin</i> CX ₃ C | Untereinheit des TIM8-TIM13-Komplexes | Davis <i>et al.</i> , 2000; Chacinska <i>et al.</i> , 2004 |
| Tim9 | <i>twin</i> CX ₃ C | Untereinheit des TIM9-TIM10-Komplexes | Koehler <i>et al.</i> , 1998; Chacinska <i>et al.</i> , 2004 |
| Tim10 | <i>twin</i> CX ₃ C | Untereinheit des TIM9-TIM10-Komplexes | Luciano <i>et al.</i> , 2001; Terziyska <i>et al.</i> , 2005; Milenkovic <i>et al.</i> , 2007 |
| Tim12 | CX ₉ C-CCX ₃ C | Untereinheit der TIM22-Translokase | Sirrenberg <i>et al.</i> , 1998; Naoé <i>et al.</i> , 2004 |
| Tim13 | <i>twin</i> CX ₃ C | Untereinheit des TIM8-TIM13-Komplexes | Davis <i>et al.</i> , 2000; Lutz <i>et al.</i> , 2003; Terziyska <i>et al.</i> , 2005 |
| Mic14 | <i>twin</i> CX ₉ C | unbekannt | Gabriel <i>et al.</i> , 2006 |
| Mic17 | <i>twin</i> CX ₉ C | unbekannt | Gabriel <i>et al.</i> , 2006 |
| Mdm35 | <i>twin</i> CX ₉ C | beeinflusst mitochondriale Morphologie; Mechanismus unbekannt | Gabriel <i>et al.</i> , 2006; Dimmer <i>et al.</i> , 2002 |

1.2.2 Hot13, ein Assemblierungsfaktor im Intermembranraum?

Hot13 steht für *helper of Tim* mit einer berechneten molekularen Masse von 13,6 kDa und wurde zunächst als Interaktionspartner der kleinen Tim-Proteine identifiziert (Curran *et al.*, 2004). Es besitzt eine charakteristische zf-CHY-Domäne, die hohe

Ähnlichkeit zu einer RING-Finger-Domäne aufweist (Mulder *et al.*, 2003, Curran *et al.*, 2004), und ist von Prokaryoten bis zur Mensch konserviert (Abb. 1.6). Solche RING-Motive koordinieren zwei Zinkionen und sollen Protein-Protein-Interaktionen begünstigen (Matthews und Sunde, 2002). Hot13 enthält 11 Cysteinreste, die unter anderem an der Koordination von Metallionen beteiligt sein können. In Hefe wurde Hot13 im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert, wo es mit der äußeren oder inneren Membran assoziiert vorliegt. Im Gegensatz zu Mia40 und Erv1 ist es nicht essentiell für die Hefe, verleiht den Zellen aber erhöhte Toleranz gegenüber dem Oxidationsmittel t-Butylhydroperoxid (Curran *et al.*, 2004). Über die tatsächliche Funktion von Hot13 ist allerdings wenig bekannt. In isolierten Mitochondrien einer Hot13-Deletionsmutante sind im Vergleich zum Wildtyp geringere Mengen der kleinen Tim-Proteine und Tim22 vorhanden. Insbesondere die Assemblierung der kleinen Tim-Proteine in ihre Komplexe scheint durch die Deletion von Hot13 beeinträchtigt zu sein. Durch Quervernetzungsexperimente mit neu importiertem Tim13 konnte eine Interaktion von Hot13 mit neu importiertem Tim13 nachgewiesen werden (Curran *et al.*, 2004). Unklar ist allerdings ob es sich dabei um eine tatsächliche Interaktion oder nur um die räumliche Nähe handelt.

Sowohl in Säuger- als auch in Hefemitochondrien konnte nach Zugabe verschiedener Oxidationsmittel eine Beeinträchtigung des TIM22-Importweges beobachtet werden. Es kam dabei zur Akkumulation der Carriervorläufer im Intermembranraum, nicht aber zu ihrer Insertion in die Innenmembran. Durch anschließende Zugabe von DTT konnte die vollständige Integration des Vorläufers in die Membran erzielt werden. Daher wurde vermutet, dass der Import von TIM22-Substraten durch Redoxveränderungen in den Intermembranraumchaperonen vermittelt wird. Da in Hot13-depletierten Mitochondrien dieser Effekt im TIM22-Importweg in Gegenwart des Oxidationsmittels t-Butylhydroperoxid verstärkt auftrat, könnte Hot13 einen Reduktionsschritt im Importprozess des Carriers durch die TIM9-10- und TIM8-13-Komplexe katalysieren. Die endogenen Level von AAC waren in Hot13-depletierten Mitochondrien allerdings unbeeinträchtigt und eine Veränderung des Redoxstatus der kleinen Tim-Proteine durch Hot13 wurde nicht nachgewiesen (Curran *et al.*, 2004).

intermolekulare Disulfidbrücken auszubilden beeinflusst die Faltung von Proteinen und damit auch deren Funktionalität. Redoxprozesse ermöglichen somit die Regulation der Proteinaktivität in Abhängigkeit der vorherrschenden Bedingungen in der Zelle.

Ursprünglich wurde angenommen, dass die in einem Kompartiment vorherrschende Glutathionkonzentration verantwortlich für den Redoxzustand der in ihm lokalisierten Proteine ist. Reduziertes und oxidiertes Glutathion bilden einen Redoxpuffer, in dem das Verhältnis der beiden Formen die Redoxeigenschaften eines Kompartiments bestimmen sollte. Tatsächlich ist der Großteil der zytosolischen Proteine mit Cysteinresten reduziert und im Zytosol wurden GSH-Konzentrationen bis zu 13 mM nachgewiesen (Østergaard *et al.*, 2004) und das Verhältnis GSH:GSSG liegt bei ca. 60, während im ER nur ein zweifacher Überschuss der reduzierten Form vorliegt und hier auch nachgewiesener Weise oxidative Proteinfaltung stattfindet. Dennoch reicht Glutathion selbst nicht aus, um Proteine *in vivo* zu reduzieren oder oxidieren, sondern es bedarf bestimmter Enzyme, die z.T. mit Hilfe von Glutathion andere Proteine reduzieren oder oxidieren können. Im Zytosol gibt es zwei miteinander verknüpfte Systeme, das Thioredoxin- und das Glutaredoxinsystem, während im ER ein Sulfhydryloxidase/-isomeresystem lokalisiert ist. Da das Thioredoxinsystem im Laufe dieser Arbeit nicht weiter behandelt wird, soll an dieser Stelle nur das Glutaredoxinsystem näher erörtert werden.

1.3.1 Glutaredoxine

Unter bestimmten Bedingungen kann die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten oder sogar eine weitere Oxidation zu Sulfensäure zur unerwünschten Inaktivierung eines Proteins führen. Eine Möglichkeit Cysteinylgruppen vor Oxidation zu schützen besteht in Ihrer Glutathionylierung (Cotgreave *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2006; Linke *et al.*, 2003; Ghezzi, 2005), da diese oxidative Modifikation reversibel ist. Glutathionylierung kann außerdem auch einen Regulationsmechanismus darstellen, der die zellulären Prozesse an die äußeren Gegebenheiten anpasst (Cotgreave *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2006).

Glutaredoxine sind relativ kleine Proteine, die Thiolreduktaseaktivität besitzen. Sie sind durch eine Thioredoxin-ähnliche Struktur charakterisiert und tragen redoxaktive CXXC- oder CXXS-Motive im aktiven Zentrum. Sie nutzen reduziertes Glutathion, um Substrate zu reduzieren, das mit Hilfe von NADPH und der Glutathion-Reduktase regeneriert wird (Holmgren, 1989; Fernandes *et al.*, 2004). Anhand der

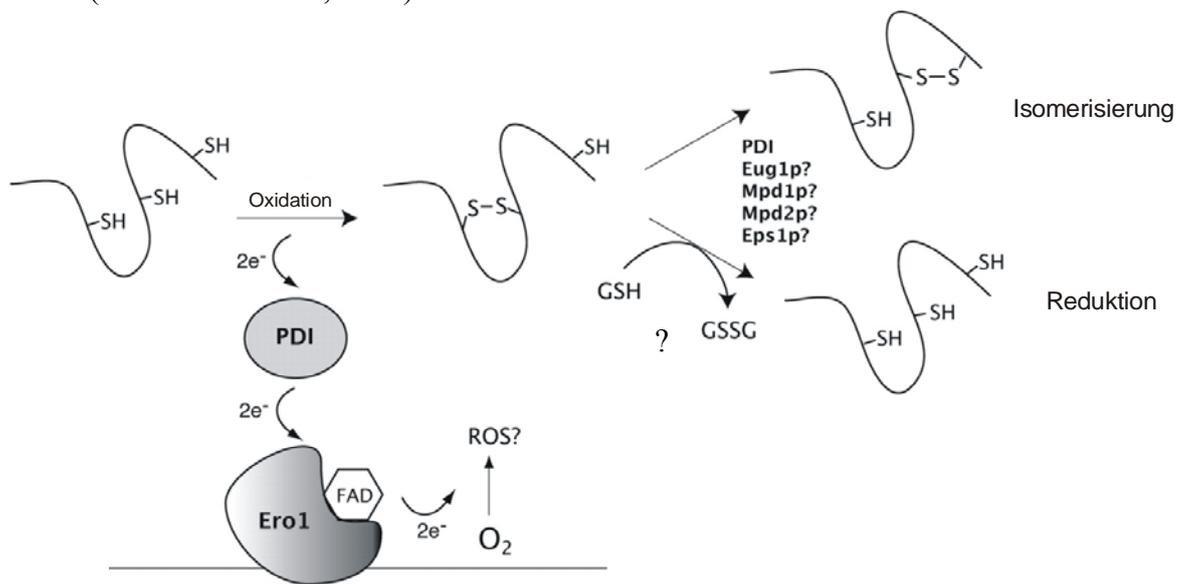
Beschaffenheit ihres aktiven Zentrums wurden die Glutaredoxine in Mono- und Dithiolglutaredoxine unterschieden (Fernandes *et al.*, 2004; Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 1999). Orthologe findet man im Zytosol, in Mitochondrien und im Zellkern. In *S. cerevisiae* sind bisher fünf Glutaredoxine identifiziert und beschrieben worden. Bei Grx1 und Grx2 handelt es sich um klassische Dithiolglutaredoxine, die im Zytosol und, im Fall von Grx2, zusätzlich auch in den Mitochondrien lokalisiert sind und dort oxidativem Stress besonders bei höheren Temperaturen entgegenwirken. Beide Proteine weisen eine Sequenzidentität von 64% auf, katalysieren aber die Reduktion verschiedener Substrate, was zu unterschiedlichen Phänotypen in Deletionsmutanten führt (Luikenhuis *et al.*, 1998). Interessanterweise wird Grx2 unter Benutzung zwei verschiedener Startcodons exprimiert, was zu Isoformen im Zytosol und in der mitochondrialen Matrix führt (Pedrajas *et al.*, 2002; Porras *et al.*, 2006). Den drei Monothiolglutaredoxinen Grx3, Grx4 und Grx5 konnte bisher *in vitro* keine Glutaredoxinaktivität nachgewiesen werden. Grx3 und Grx4 besitzen eine zusätzliche N-terminale Thioredoxindomäne und sind im Nukleus lokalisiert, wo sie über den Transkriptionsfaktor Aft1 die Expression einer kleinen Gruppe von Proteinen regulieren (Lopreiato *et al.*, 2004; Ojeda *et al.*, 2006; Pujol-Carrion *et al.*, 2006). Grx5 wurde ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, wo es in die Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster involviert zu sein scheint (Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 2002; Lill und Mühlenhoff, 2006). Grx3 und Grx4 können eine *GRX5*-Deletion komplementieren, wenn sie mit mitochondrialem Sortierungssignal exprimiert werden und so ihre Lokalisation in den Mitochondrien gewährleistet wird (Molina *et al.*, 2004). Dies gelang nicht bei Verwendung der Dithiolglutaredoxine, was auf eine hohe funktionelle Konservierung der Monothiolglutaredoxine in Hefe hindeutet.

1.3.2 Proteinfaltung im sekretorischen Transportweg

Im Gegensatz zum Zytosol werden im endoplasmatischen Retikulum die Proteine oxidativ gefaltet. Dabei kommt es zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen freien Thiolgruppen vorhandener Cysteinreste. Zunächst glaubte man, die Disulfidbildung sei ein spontaner Prozess (Anfinsen *et al.*, 1961) und Oxidationsäquivalente würden direkt von Glutathion zur Verfügung gestellt. Tatsächlich ist das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion im ER im Vergleich zum Zytosol verändert. Die Entdeckung von Ero1, einer essentiellen Sulfhydryloxidase im ER, stellte diese Theorie allerdings in Frage und lässt offen, welche Rolle dem Glutathion tatsächlich zukommt (Frand und

Kaiser, 1998; 1999; Pollard *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 2000; Tu und Weissmann, 2002). Ero1 generiert Disulfidbrücken *de novo* und überträgt sie auf die Proteindisulfidisomerase Pdi1. Pdi1 führt die Disulfidbrücken anschließend in die neu importierten Polypeptide ein. Dabei gehen Elektronen von den Substraten über Pdi1 auf Ero1 über. Von Ero1 können sie mit Hilfe des Kofaktors FAD auf molekularen Sauerstoff als Endakzeptor transferiert werden (Tu und Weissmann, 2002).

Neben seiner Funktion als Oxidase spielt Pdi1 eine grundlegende Rolle als Isomerase, die falsch gebildete Disulfidbrücken korrigiert (Laboissiere *et al.*, 1995). Dafür wird Pdi1 allerdings in seiner reduzierten Konformation benötigt. Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass die Hyperoxidation im ER direkt über die Ero1-Aktivität reguliert wird. Vollständig oxidiertes Ero1 weist eine geringere Aktivität auf als solches, dessen nicht-katalytische Cysteinpaare reduziert vorliegen (Sevier *et al.*, 2007). Zusätzlich zu Pdi1 sind weitere homologe Proteine im ER der Bäckerhefe lokalisiert (Eug1, Mpd1, Mpd2 und Eps1). Ero1 ist aber relativ spezifisch und die Interaktion mit nur einem weiteren dieser Homologe, Mpd2, konnte nachgewiesen werden (Fränd und Kaiser, 1999).



nach Tu und Weissmann, 2004

Abbildung 1.7 Oxidative Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum

Reduzierte Proteine gelangen während und nach ihrer Translation ins ER-Lumen. Dort werden sie durch Proteindisulfidisomerase (PDI) oxidiert. Die Elektronen werden anschließend auf das Flavoprotein Ero1 übertragen, das wiederum mit molekularem Sauerstoff reagieren kann. Kommt es zur Missfaltung der Substratproteine, so kann PDI falsche Disulfidbrücken isomerisieren.

Parallel zu Ero1 fungiert ein weiteres Protein namens Erv2 im ER als Pdi1-Oxidase (Gerber *et al.*, 2001; Sevier *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2002). Erv2 gehört, wie Erv1, zur Familie der ERV/ALR-Sulfhydryloxidasen (Thorpe *et al.*, 2002), ist im Gegensatz zu ihm aber nicht essentiell für die Zelle. Die Deletion von *ERO1* kann unter aeroben Wachstumsbedingungen durch Überexpression von Erv2 komplementiert werden (Sevier *et al.*, 2001). Da die Deletion von Erv2 selbst aber nur einen milden Phänotyp zur Folge hat, scheint die eigentliche Sulfhydryloxidase Ero1 zu sein und die Funktion von Erv2 ist möglicherweise auf nicht-essentielle Substrate oder bestimmte Wachstumsbedingungen limitiert.

Bei Ero1 handelt es sich um ein membranassoziiertes Protein und Pdi1 trägt ein C-terminales Retentionssignal, so dass beide Proteine nur für ER-lokalisierte Prozesse biologisch relevant sind. Es ist nicht bekannt, welche Bedingungen im späten sekretorischen Transportweg herrschen und ob dort weitere redoxaktive Faktoren angesiedelt sind.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie lösliche Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven in Mitochondrien importiert werden. Wie in Kapitel 1.1.1. beschrieben, tragen diese Substratproteine keine N-terminalen Sortierungssignale, enthalten aber als ein ihnen gemeinsames Charakteristikum konservierte Cysteinreste, die in bestimmten CX₃C- und CX₉C-Motiven angeordnet vorliegen. Obwohl die Funktion dieser Cysteinreste für den Import der Proteine schon seit einiger Zeit diskutiert wird, konnte bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden, ob sie nach dem Import zu Disulfidbrücken oxidiert werden oder ob sie die für den Import erforderliche reduzierte Konformation beibehalten und ihre Faltung durch die Komplexierung von Kofaktoren stabilisiert wird. Als erste Komponente, die den Import dieser Intermembranraumproteine beeinflusst, konnte der Intermembranraumrezeptor Mia40 identifiziert werden. Seine genaue Funktionsweise ist aber bisher unbekannt. Da möglicherweise Disulfidbrückenbildung einen wichtigen Schritt während des Importprozesses darstellt, sollte außerdem untersucht werden, ob die Sulfhydryloxidase Erv1 in diesen Prozess involviert ist und ob auch Hot13 den Redoxstatus des Systems beeinflusst. Um diesen Importmechanismus detaillierter zu charakterisieren, wurde das Verhalten der Substratproteine Cox17 und Tim13

beobachtet und Hefestämme, in denen die Expression von Erv1 reguliert werden konnte bzw. *HOT13* deletiert wurde, wurden für *in vivo*- und *in organello*-Experimente herangezogen.

Außerdem sollten weitere Komponenten identifiziert werden, die in den Importprozess selbst oder in die Modifikation des Redoxstatus der Substratproteine im Intermembranraum involviert sind. Da einige Studien gezeigt haben, dass z. B. Tim13 nach dem *in organello*-Import und auch *in vivo* in reduzierter Konformation detektiert werden konnte, sollten putative Reduktasen identifiziert werden, die im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert sein könnten. Es ist bekannt, dass Glutaredoxine an verschiedenen Orten in der Zelle an der Reduktion unterschiedlicher Proteine beteiligt ist. Daher bestand die Möglichkeit, dass auch im Intermembranraum von Mitochondrien Glutaredoxine derartige Funktionen erfüllen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das entsprechende DNS-Fragment in den Vektor pGEM3 oder pGEM4 (Promega) kloniert. Sofern nicht anders erwähnt wurden Gene aus *S. cerevisiae* verwendet. Die Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind unter 2.1.13 beschrieben. In Tabelle 2.1 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Kurzbeschreibung aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Kodiertes Protein | Vektor | Referenz |
|----------------------------|--|----------|-------------------------------|
| pOxa1 | Oxa1 | pGem3 | Herrmann <i>et al.</i> , 1997 |
| pSu9(1-69)DHFR | <i>Neurospora crassa</i> Su9(1-69) fusioniert an <i>Mus musculus</i> Dihydrofolatreduktase | pGem4 | Rojo <i>et al.</i> , 1995 |
| pCox17-GST | Cox17 | pETGexCt | Diese Arbeit |
| pTim13 | Tim13 | pGem4 | Lutz <i>et al.</i> , 2003 |
| pGrx6 | Grx6 | pGem4 | Diese Arbeit |
| pGrx7 | Grx7 | pGem4 | Diese Arbeit |
| pHis-Grx6 | Grx6 ab Aminosäure V34 | pQE30 | Diese Arbeit |
| pHis-Grx7 | Grx7 ab Aminosäure V34 | pQE30 | Diese Arbeit |
| pHis-Grx6 ^{C136S} | Grx6 ab Aminosäure V34 mit einer C-zu-S-Mutation an Aminosäureposition 136 | pQE30 | Diese Arbeit |
| pPfGrx | PfGrx | pQE30 | Rahlfs <i>et al.</i> , 2001 |
| pHis-Pdi1 | Pdi1 ab Aminosäure 23 | pQE30 | Diese Arbeit |
| pYX132-Pdi1 | Pdi1 | pYX132 | Diese Arbeit |
| pYX132-Ero1 | Ero1 | pYX132 | Diese Arbeit |

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

Kleine Mengen DNS wurden durch enzymatische und alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen gewonnen. Dazu wurden Einzelkolonien in 2 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1 ml Kultur wurden für 1 min bei 7500 g (RT) sedimentiert und in 50 µl ddH₂O durch Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 1 (0,1 M NaOH, 0,5% SDS, 1 mM EDTA) wurde für 5 min bei RT lysiert. Die Probe wurde anschließend mit 150 µl Lösung 2 (3 M Natriumacetat pH 4,5) neutralisiert und für 1 min geschüttelt. Die präzipitierten Proteine und die chromosomale DNS wurden bei 35000 g, 10min (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 900 µl Ethanol versetzt, die Plasmid-DNS für 15 min bei -80°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die Plasmid-DNS in 100 µl sterilem ddH₂O aufgenommen. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS wurde das Pure Yield Plasmid Midi Prep System (Promega) verwendet. 50-100 ml einer Übernachtskultur in LB_{Amp} wurde nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet und die Plasmid-DNS isoliert.

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* wurden als DNS-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten an ihrem 3'-Ende eine mindestens 16 Basen lange, zur Matrizen-DNS komplementäre Sequenz. Für eine Standard-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1-100 ng Matrizen-DNS sowie 20 pmol von jedem Primer eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate, 2,5 U Taq-DNS-Polymerase, 0,25 U Pfu-DNS-Polymerase und den vom Hersteller mitgelieferten Puffer. In einigen Fällen wurden die Enzyme erst hinzugefügt nachdem die Reaktion 1 min bei 95°C inkubiert wurde. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit 25 bis 35 Temperaturzyklen durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus dem Schmelzen der DNS bei 95°C für 30 s, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide typischerweise bei 48-64°C für 90 s und Synthese der DNS bei 72°C für bis zu 3min. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 5-minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNS-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNS Fragmente wurde durch Gelelektrophorese

kontrolliert.

2.1.4 Restriktionsverdau von DNS

Für die Präparation von DNS-Fragmenten und für die Identifizierung positiver Transformanden bei der Neukonstruktion von Plasmiden, wurde die Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurde das Puffersystem von New England Biolabs verwendet. Der Restriktionsansatz im präparativen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl bis 200 µl durchgeführt. Je 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme wurde zu dem vom Hersteller empfohlenen 10×Puffer mit 5 bis 15 µg DNS und sterilem Wasser gegeben. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2 und 15 h bei der empfohlenen Temperatur. Die Spaltung im analytischen Maßstab erfolgte mit je 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1 µl DNS-Lösung in 20 µl Gesamtvolumen. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei der empfohlenen Temperatur. Im Anschluss an die Restriktion wurden die Ansätze der präparativen bzw. analytischen Gelelektrophorese unterzogen.

2.1.5 Ligation

Für die Neukonstruktion von Plasmiden wurden die durch Spaltung mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNS-Fragmente mit Hilfe der T4-DNS-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Die Reaktion wurde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 50-200 ng DNS des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNS-Fragment gemischt und bei einer Temperatur von 15°C über Nacht inkubiert.

2.1.6 Zwischenklonierung

Um die vollständige Restriktion eines DNS-Fragmentes zu gewährleisten, wurde das durch PCR amplifizierte Fragment in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5α Zellen transformiert. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNS präpariert wurde das DNS-Fragment mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten.

2.1.7 Präparation elektrokompetenter Zellen

Um elektrokompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 g (4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen hintereinander mit 400 ml, 200 ml und 4 ml kaltem 10%igem Glycerin (mit Milipore-Wasser angesetzt) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe in 400 µl 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren (45 µl Aliquots) und bei -80°C gelagert.

2.1.8 Präparation hitzeschockkompetenter Zellen

Um hitzeschockkompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 100 ml LB Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur bei 600 g (4°C) für 10 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 40 ml eisgekühltem Tfb 1 (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 12% (w/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (600 g, 4°C, 10 min), das Sediment in 4 ml Tfb 2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 12% (w/v) Glycerin) resuspendiert und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. 200 µl Aliquots der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.9 Transformation mittels Elektroporation

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde 1 µl Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45 µl kompetenter Zellen gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann einem Stromstoß (2,5 kV, 400Ω, 25 µF) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml LB-Medium gemischt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor sie dann auf einer LB_{Amp}-Platte ausgestrichen wurden.

2.1.10 Transformation mittels Hitzeschock

Nach Auftauen eines 200 μ l Aliquots wurden 90 μ l kompetente *E. coli*-Zellen mit 5-10 μ l Ligationsansatz oder 1-2 μ l Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 1 min auf 42°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und auf eine LB_{Amp}-Kulturplatte ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.11 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNS-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden, als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNS-Fragmenten durchgeführt. Das Bettvolumen der verwendeten Gele betrug 30-100 ml und das Taschenvolumen 20-120 μ l. Je nach Größe der DNS-Fragmente wurde eine 0,8-3%ige Agaroselösung in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,5) zum Gießen der Gele verwendet. Die Agarose wurde vor dem Gießen auf eine Ethidiumbromidkonzentration von ca. 0,5 μ g/ml eingestellt. Die Proben wurden mit 5×Auftragspuffer (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und aufgetragen. Falls die Proben störende Mengen an RNA enthielten, wurde ein 5×Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml RNase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 10 V/cm durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht. Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mit dem Kit QIAquick nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) extrahiert.

2.1.12 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNS-Proben wurde durch Messung der Extinktion gegen Wasser bei 260 und 280 nm (E_{260} und E_{280}) bestimmt. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ μ l doppelsträngiger bzw. 33 μ g/ μ l einzelsträngiger DNS. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.13 Klonierungsstrategien

Klonierung von pCox17-GST Der gesamte *offene Leserahmen* (OLR) von *COX17* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM01-5' und NM02-3' amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Bg*II in den Vektor pETGexCt kloniert.

NM01-5' 5'-GGG GGA TCC ATG ACT GAA ACT GAC-3'

NM02-3' 5'-GGG AGA TCT CTA ATT TGC ACT TGG-3'

Klonierung von pGrx6 Der gesamte OLR von *GRX6* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM46 und NM47 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Bam*H1 in den Vektor pGem4 kloniert.

NM46 5'-GGG GAA TTC ACC ATG ATA CCT TCC AAT AAG AG-3'

NM47 5'-GGG GGA TCC TCA ATT ATT GGA AGG TTT TTC ACG-3'

Klonierung von pGrx7 Der gesamte OLR von *GRX7* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM44 und NM45 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Bam*HI in den Vektor pGem4 kloniert.

NM44 5'-GGG GAG CTC ACC ATG GCT ATT GTT ATA AAC AAA AGA AAC-3'

NM45 5'-GGG GGA TCC CTA GGC ACT CTC AGA TTG CG-3'

Klonierung von pHis-Grx6 Der OLR ab Basenpaar 100 von *GRX6* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM59 und NM60 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Sal*I in den Vektor pQE30 kloniert.

NM59 5'-GGG GGA TCC GTA GAG ATA AAA GAG GAA ACT TC -3'

NM60 5'-GGG GTC GAC TCA ATT ATT GGA AGG TTT TTC ACG -3'

Klonierung von pHis-Grx7 Der OLR ab Basenpaar 100 von *GRX7* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM61 und NM62 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Sal*I in den Vektor pQE30 kloniert.

NM61 5'-GGG GGA TCC GTC AAC GAAAGT ATT ACT ACT C -3'

NM62 5'-GGG GTC GAC CTA GGC ACT CTC AGA TTG C -3'

Klonierung von pHis-Grx6^{C136S} pHis-Grx6^{C136S} wurde mit dem *site directed mutagenesis kit* (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers von dem Plasmid pHis-Grx6 mit den Oligonukleotiden NM63 und NM64 generiert.

NM63 5'-GTA AAA GCA CGA GCT CAT ATA GCA AGG GCA TGA AGG AAC TGC TTG -3'

NM64 5'-CAA GCA GTT CCT TCA TGC CCT TGC TAT ATG AGC TCG TGC TTT TAC -3'

Klonierung von pHis-Pdi1 Der OLR ab Basenpaar 67 von *PDII* wurde mittels PCR aus genomischer DNS mit den Oligonukleotiden NM72 und NM70 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Sac*I in den Vektor pQE30 kloniert.

NM72 5'-GGG GGA TCC CAA CAA GAG GCT GTG GCC CC -3'

NM70 5'-GGG GAG CTC TTA CAA TTC ATC GTG AAT GGC ATC TTC -3'

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Dieser Stamm enthält einen Φ dlac2 Δ M15-Marker, der für Vektoren auf Basis von pUC eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht. Für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) oder XL1-blue verwendet. Der BL21-Stamm besitzt eine chromosomale Kopie des IPTG-induzierbaren T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist deshalb zur Expression von Genen unter

Kontrolle des *T7*-Promotors geeignet. Diesen Zellen fehlen außerdem die Proteasen Lon und OmpT, um die überexprimierten Proteine zu stabilisieren. XL1-blue Zellen exprimieren den *lac*-Repressor, der durch Zugabe von IPTG inaktiviert wird. So führt auch in XL1-blue- Zellen die IPTG-Zugabe zur Induktion eines Proteins, das stromabwärts des *lac*-Promotors kloniert wurde. Da der *lac*-Repressor nicht mutiert wurde, kommt es diesen Zellen im Gegensatz zu BL21 nicht zur konstitutiven Hintergrundexpression des Proteins. Dies ist besonders für Proteine wichtig, die toxisch auf *E. coli* wirken.

2.2.2 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

In Tabelle 2.2 sind alle in der Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* mit Referenz und Genotypen aufgelistet. Unter 2.2.7 finden sich die genetischen Strategien für die Herstellung der Stämme.

Tabelle 2.2

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|----------------|---|--------------------------------|
| W303 | <i>a ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> | Rothstein <i>et al.</i> , 1983 |
| YPH499 | <i>a ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i> | Sikorski und Hieter, 1989 |
| GAL10-Erv1 | <i>a ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 HIS3-P_{GAL10}-ERV1</i> | Diese Arbeit |
| <i>erv1-ts</i> | | Lisowsky, 1992 |
| <i>Δhot13</i> | <i>a ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hot13::KANMX6</i> | Diese Arbeit |
| Grx6-HA | <i>a ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 GRX6-HA-TRP1</i> | Diese Arbeit |
| Grx7-HA | <i>a ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 GRX7-HA-TRP1</i> | Diese Arbeit |

2.2.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefen erfolgte unter Schütteln bei 30°C in YP-Medium (supplementiert mit 2% einer der Kohlenstoffquellen [Glukose, Galaktose, Glycerin]), auf Selektiv-Medium oder auf Laktat-Medium. Hefen aus einer Glycerin-Stammkultur wurden auf einer YPD-Platte bzw. einer Selektiv-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurden von dieser Platte 20 ml Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde durch Passagieren mindestens für 2 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 bis 1,8 geerntet. Um Glycerin-Stammkulturen herzustellen, wurden mit einer Impföse Hefezellen von einer Agarplatte in 1 ml 15%-iges Glycerin überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert und die Kultur am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,1 verdünnt (20 ml Kulturvolumen). Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 1000 g sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. So wurden die Zellen für 5-10 min bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 s sedimentiert und der Überstand wurde verworfen. Danach wurden zu den Zellen 240 µl PEG 3350 (50%), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNS (10 mg/ml), 5-50 µl der zu transformierenden DNS gegeben und mit sterilem Wasser auf 360 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 45 min bei 42°C inkubiert. Dann wurden die Hefezellen 15 s bei 6000 bis 8000 rpm abzentrifugiert und in ddH₂O resuspendiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf den entsprechenden SD-Platten.

2.2.5 Isolierung genomischer DNS aus Hefe

Hefe wurde über Nacht in YPD-Medium bei 30°C angezogen. 1,5 ml der Kultur werden 5 min bei 10000 rpm pelletiert und in 100 µl Wasser resuspendiert. In 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 und 1 mM EDTA wurden

die Zellen unter Schütteln mit wenigen Glaskügelchen lysiert. Anschließend wurden 200 µl Phenol zugegeben und die gefällten Proteine und Zelltrümmer bei 10000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden erneut 100 µl Phenol und zusätzlich 100 µl Chloroform gegeben. Durch Invertieren wurden die Phasen gemischt. Anschließend wurden sie durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm für 5 min wieder getrennt. Die obere Phase wurde wieder abgenommen in ein neues reaktionsgefäß transferiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation der Probe für 5 min bei 10000 rpm wurde die obere Phase abgenommen und 20 µl 3 M Natriumacetat und 600 µl Ethanol abs. wurden zugegeben. Dann wurde die Probe 10-30 min bei -20°C inkubiert und anschließend wurde die DNS 15 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Mit 70% Ethanol wurde die DNS gewaschen und in 100 µl Wasser resuspendiert.

2.2.6 Überprüfen eines Rekombinationsereignisses in *S. cerevisiae*

Die isolierte genomische DNS (siehe 2.2.5) wurde mit einer Pipette einige Male auf und ab pipettiert, um die DNS-Stränge durch Scherkräfte zu brechen und so eine Denaturierung zu erleichtern. Für eine PCR mit Kontrolloligonukleotiden wurden 3 µl der DNS eingesetzt. Die PCR wurde dann wie unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt.

2.2.7 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae*

Die zu testenden Hefestämme wurden in 20 ml des entsprechenden Mediums über Nacht angezogen und am Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert. Nachdem die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren, wurde jeder Stamm auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bzw. 0,1 eingestellt und ausgehend von dieser Stammkultur eine serielle Verdünnungsreihe (5 mal 1:10) in ddH₂O hergestellt. Pro Verdünnung wurden jeweils 3 µl auf eine YPD- und YPG-Platte aufgetragen und die Platten bei der zu untersuchenden Temperatur inkubiert.

2.2.8 Konstruktion der Hefestämme

GAL10-Erv1 Der endogene Promotor von *ERV1* wurde mittels homologer Rekombination durch den GAL10-Promotor ersetzt. Dazu wurde der Promotor einschließlich des *HIS3*-Gens aus dem Vektor pTL26 mit den Oligonukleotiden NM03

und NM04 amplifiziert. Beide Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'- (NM04) bzw. 5'- (NM03) unter- bzw. oberhalb des Startcodons. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in W303 transformiert und die Hefen auf Wachstum auf SD-His selektioniert. Die Verifizierung des Promotoraustauschs wurde mit Western Blot durchgeführt.

NM03 5'-GGG CCG CTT TTA-3 TTA CGG CAA CTA TTC TAT CAG GTT TAG CTC TTG GCC TCC TCT AG -3'

NM04 5'-GCC TTC TTG TGG GG ATT ATC CGT CAT TTT ATC TAT TGC TTT CAT CGA ATT CCT TGA ATT TTC -3'

Δhot13 Der gesamte OLR von *HOT13* wurde mittels homologer Rekombination durch die *KANMX6*-Kassette ersetzt. Dazu wurde das *KANMX6*-Gen aus dem Vektor pFA6a-*KANMX6* mit den Oligonukleotiden Hot13-S1 und Hot13-S2 amplifiziert. Beide Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'- (Hot13-S2) bzw. 5'- (Hot13-S1) unter- bzw. oberhalb des OLR. Das gereinigte PCR-Produkt wurden in W303 transformiert und die Hefen auf Wachstum auf YPD+G418 selektioniert. Die Verifizierung der *HOT13*-Disruption wurde mit PCR durchgeführt.

Hot13-S1 5'-GAT ATA AAA AAA AAAATA CGT ACC ACT TAC AAT TTG CAA ATA TAG CGT ACG CTG CAG GTC GAC -3'

Hot13-S2 5'-AGA GCA CAG CAG AGC TTA AGA TGG CAT GCA TTT ATA GAA CAA CAC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G -3'

Grx6-HA und **Grx7-HA** Das Stopcodon von *GRX6* bzw. *GRX7* wurde mittels homologer Rekombination durch drei Hämagglutinin-Epitope gefolgt von einem Stopcodon ersetzt. Als Selektionsmarker diente das *TRP1*-Gen von *Kluyveromyces lactis*. Dazu wurde das *TRP1*-Gen aus dem Vektor pYM22 (Janke et al., 2004) mit den Oligonukleotiden NM42 bzw. NM40 und NM43 bzw. NM41 amplifiziert. Alle Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'- (NM43/41) bzw. 5'- (NM42/40) unter- bzw. oberhalb des OLR. Die Verifizierung der homologen Rekombination wurde mit Western Blot durchgeführt.

NM 40 5'-GGG CGT TTA CTG TAA AAG CTA ATT CGC AAT CTG AGA GTG
CCC GTA CGC TGC AGG TCG AC -3'

NM41 5'-CTG TAT ACT ACC TAA ATA TCC TCT TTC GCT ACT GTG GGA
GAA GAA GCT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG -3'

NM42 5'-GGT AAA TTC TCG GTT GAG CAA CGT GAA AAA CCT TCC AAT
AAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC -3'

NM43 5'-CGC CTT TCC AAC TAC AGA CGT AAA GTG CTG GAT TAG TAA
GTG CTG CTG GAG TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G -3'

Δgrx6 Der gesamte ORF von *GRX6* wurde mittels homologer Rekombination durch die *HIS3*-Kassette ersetzt. Dazu wurde das *HIS3*-Gen aus dem Vektor pTL26 mit den Oligonukleotiden NM33 und NM54 amplifiziert. Beide Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3' - (NM54) bzw. 5' - (NM33) unter- bzw. oberhalb des OLR. Das gereinigte PCR-Produkt wurden in YPH499 transformiert und die Hefen auf Wachstum auf SD-His selektioniert. Die *GRX6*-Disruption wurde mit Westren Blot überprüft.

NM33 5'-GCA ACC TAG CGG TTT AAT ATA GAA ACA ATT TTA TTC TCT
TGG CCT CCT CTA G -3'

NM54 5'-CTT TAT TTA TAT ATT TAT TCT TAA TTT TTT CTT CTT TCC TTT
TTG TAA CAA TTC GAA TTC CTT GAA TTT TC -3'

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970) aufgetrennt. Hierfür wurden Glasplatten von 160×180 mm und Abstandshalter von 1 mm Dicke verwendet. Zum Gießen wurde das Gel mit einem separaten Bodengel abgedichtet. Die Konzentration von Acrylamid im Trenngel variierte zwischen 12 und 18% und die Konzentration an Bisacrylamid zwischen 0,08% - 0,13%. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2-3 h. Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

Trennlösung: 12-18% Acrylamid; 0,08-0,13% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)

Sammellösung: 5% Acrylamid; 0,03% Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,1 % TEMED)

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1 % SDS

SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer): 60 mM Tris/HCl, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau, pH 6.8

2.3.2 Färben von Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel mindestens 60 min in Färbelösung (30% Methanol, 10% Eisessig, 0,1% Coomassie-Blau-R) geschwenkt, anschließend mit Wasser gespült und in 30% Methanol, 10% Eisessig entfärbt.

2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Nass-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je einem Whatman-Papieren in eine Blotkammer geklemmt wurden. Gel, Nitrozellulosemembran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h zwischen bei 400 mA. Die Proteine wurden durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau-Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser sichtbar gemacht.

Blotpuffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% Methanol

Ponceau-Lösung: 0,2% Ponceau in 3% Trichloressigsäure (TCA)

2.3.4 Autoradiographie und Densitometrie

Nitrozellulose-Membranen, auf die radioaktiv markierte Proteine transferiert worden waren, wurden nach Trocknen unter einer Rotlicht-Wärmelampe auf einem Röntgenfilm exponiert. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham Biosciences) eingelesen und ihre Intensität gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm Lab-Scan von Amersham Biosciences.

2.3.5 Synthese von ³⁵S-markierten Proteinen *in vitro*

Um ³⁵S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM3, pGEM4 oder pGEM-T klonierte Gene mit Hilfe der SP6- oder T7-RNA-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976). Zur Transkription wurden 30 µl Premix, 2,5 µl 2,5 mM m7G(5')ppp(5')G und 15 µl Plasmid-DNS gemischt, auf 200 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RNA-Polymerase (T7 oder SP6, je 25 U/µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend durch Zusatz von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol für 15 min bei -20°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes bei RT getrocknet. Die mRNA wurde dann in 30 µl Wasser mit 0,75 U/µl RNasin aufgenommen. Um *in vitro* Vorstufenproteine zu translatieren, wurden 140 µl Kaninchen- Retikulozytenlysat, 4 µl RNasin, 8 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 16 µl ³⁵S -Methionin und 30 µl RNA gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100000 g (2°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. 10×Translationssalze: 400 mM Hepes/KOH; pH 7,4; 60 mM Mg-Acetat; 20 mM Spermidin Premix: 1 ml 10×Translationssalze; 20 µl 50 mg/ml BSA; 200 µl 0,5 M DTT; 50 µl 100 mM ATP; 50 µl 100 mM CTP; 50 µl 100 mM GTP; 50 µl 100 mM UTP; H₂O ad 10 ml

2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers. Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit IgG erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei 595nm bei IgG-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml gemessen.

2.3.7 Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure

Um Protein denaturierend zu fällen, wurde die Proteinlösung auf 12% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde

anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, auf das Proteinpräzipitat 1 ml Aceton (auf -20°C gekühlt) gegeben und 1 min kräftig geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min wurde das Aceton verworfen und das Sediment für 5 min bei 37°C getrocknet. Die Proteine wurden durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer und kurzes Aufkochen gelöst.

2.3.8 Überexpression und Reinigung von Proteinen

Um Proteine im mg-Maßstab zu isolieren, wurden sie als GST-Fusionsproteine bzw. mit N-terminalen Hexahistidinrest rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe von GSH-Sepharose bzw. Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Dazu wurde LB_{Amp}-Medium 1:200 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis auf eine OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen. Um die Überexpression zu induzieren, wurde die Kultur auf 0,5 mM IPTG eingestellt und für weitere 4 h inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 g (4°C) geerntet und wie folgt aufgearbeitet.

2.3.8.1 Reinigung von Cox17

Cox17 wurde als N-terminales GST-Fusionsprotein exprimiert und mit Hilfe von GSH-Sepharose gereinigt. Zellen aus 50 ml Kultur wurden geerntet und bei -20°C weggefroren. Zur Aufreinigung wurde die Suspension auf Eis aufgetaut und in 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Probe wurde 10 min bei Raumtemperatur getaumelt und erneut mit 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und 275 mM Natriumchlorid versetzt. Anschließend wurde sie wieder 10 min bei Raumtemperatur getaumelt und dann für 15 min bei 30000 g (4°C) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 200 µl 50%ige GSH-Sepharose (in PBS gewaschen) gegeben. Die Suspension wurde zur Proteinbindung 90 min bei 4°C getaumelt und dann für 2 min bei 1500 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die GSH-Sepharose 3x mit je 3 ml TCB gewaschen. Das Protein wurde direkt an der GSH-Sepharose mit 9 U Thrombin in TCB geschnitten. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei der Überexpression von Cox17(Zn²⁺) wurde die Expressionskultur von Beginn an auf 200 µM Zinkacetat eingestellt.

2.3.8.2 Reinigung von Grx6 und Grx7

Grx6 und Grx7 wurden mit N-terminalen Hexahistidinrest exprimiert und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Zellen aus 100 ml Kultur wurden bei -20°C weggefroren. Zur Aufreinigung wurden *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, in 20 ml Lysepuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol) resuspendiert und für 30 min mit Lysozym bei 4°C getaumelt. Das Lysat wurde sonifiziert und für 20 min bei 10000 g (4°C) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 1 ml 50%ige Ni-NTA-Agarose (in Lysepuffer gewaschen) gegeben. Die Suspension wurde zur Proteinbindung für 60 min bei 4°C getaumelt und dann in eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde einmal mit 10 ml Lysepuffer und zweimal mit 10 ml Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol) gewaschen. Das Protein wurde mit 50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM Natriumchlorid und 250 mM Imidazol eluiert. Die Proteinlösungen wurden bei 4°C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode (Gasser *et al.*, 1982). Durch Zentrifugation für 5 min bei 2800 g bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei einer OD₅₉₅ zwischen 1 und 2 geerntet. Anschließend wurden sie in ddH₂O gewaschen, in 2 ml pro g Feuchtwicht 100 mM Tris, 10 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 2000 g, 4°C), die Zellen in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g Feuchtwicht in 6,7 ml 1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase und 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Zum Verdau der Zellwand wurde die Suspension 40-60 min bei 30°C geschüttelt. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 2000 g (4°C) geerntet und pro g Feuchtwicht in 6,7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen wurden durch 10 Stöße aufgebrochen. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 2000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Das Zellpellet wurde mit weiteren 6,7 ml

Homogenisierungspuffer pro g Feuchtgewicht versetzt und noch einmal mit dem Glashomogenisator aufgeschlossen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und noch einmal für 5 min bei 2000 g (4°C) zentrifugiert, um noch verbliebene intakte Zellen, Zellkerne und Membranen abzutrennen. Anschließend wurde die Suspension für 12 min bei 12000 g (4°C) zentrifugiert, um die Mitochondrien abzutrennen. Das Pellet wurde in 10 ml SEH-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation des Überstands für 12 min bei 17000 g (4°C) pelletiert und in 0,5-1,5 ml SEH aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Schließlich wurde die Organellenfraktion mit SEH-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Erzeugung von Mitoplasten

Mitochondrien, deren äußere Membran selektiv geöffnet wurde, werden als Mitoplasten bezeichnet. Um Mitoplasten zu erzeugen, wurde die Außenmembran von Mitochondrien durch hypotones Schwellen aufgebrochen, wobei die Innenmembran intakt blieb. Dazu wurden Mitochondrien in SH-Puffer in der Regel 1:10 bis 1:20 in 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation reisoliert (15000 g, 10 min, 4°C) und analog wie Mitochondrien eingesetzt. Anhand von entsprechenden Markerproteinen kann die Effizienz der Mitoplastierung nach Behandlung mit Proteinase K mittels Western Blot kontrolliert werden.

2.4.3 Import von Proteinen in Mitochondrien

Importexperimente von Proteinen in Mitochondrien wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 3% BSA, 0,5 M Sorbit, 80 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 1 mM Manganchlorid, 50 mM HEPES/KOH pH 7,4. Bei Experimenten mit Cox17 und Tim13 wurde ein Importpuffer ohne BSA verwendet. Alle weiteren Importreaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Anwesenheit von 2 mM ATP und 2 mM NADH durchgeführt. Für eine typische Importreaktion wurden 25-100 µg Mitochondrien mit 0,5-5 µl Retikulozytenlysat oder 0,2 µg rekombinant exprimiertem Protein bei 25°C für 10-30 min inkubiert. Die Reaktion

wurde durch 1:10-Verdünnung in kalten SH-Puffer gestoppt. Um zugängliche Proteine zu verdauen, wurden die Proteasen Proteinase K (PK) oder Trypsin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (meist 50-100 µg/ml). Der Verdau wurde 20-30 min auf Eis durchgeführt und durch Zugabe von 2 mM PMSF bzw. dem 10-fachen Überschuss an Sojabohnen-Trypsininhibitor gestoppt. Die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 25000 g (4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mitochondrien in SH/KCl resuspendiert und erneut pelletiert. Die Mitochondrien wurden dann in Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Um rekombinantes Cox17 zu importieren, wurde gereinigtes GST-Cox17 mit Thrombin geschnitten (nach Angaben des Herstellers) und gegen 6 M Guanidiniumchlorid, 10 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM Phosphat pH 6,5 dialysiert. Das so denaturierte Protein wurde für die Importreaktion eingesetzt. Die Mitochondrien konnten auch reisoliert und für eine Immunfällung eingesetzt werden (Herrmann et al., 2001).

2.4.4 HEDS-Assay

Kinetiken aufgereinigter Glutaredoxine wurden in einem Jasco V-550 UV/Vis Zweistrahlphotometer bei 340 nm Wellenlänge, wie von Holmgren und Aslund 1995 beschrieben, gemessen. Dabei wurde der NADPH-Verbrauch in einer gekoppelten Enzymreaktion detektiert. Die Reaktionen wurden in 100 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA in Gegenwart von 0,1 mM NADPH, 1 mM reduziertem Glutathion und 0,25 U Glutathion-Reduktase durchgeführt. Durch die Zugabe von HEDS (Hydroxyethylidisulfid) in einer Endkonzentration von 736 µM wurde sie gestartet. Alle Messungen wurden durch Abzug der Hintergrundaktivität in einer Referenzküvette ohne Glutaredoxin korrigiert.

2.4.5 RNase-Rückfaltungsassay

Die Rückfaltung zufällig oxidiertes RNase A aus bovinem Pankreas wurde durch messen der cCMP-Hydrolyse durch die RNase A bestimmt (Frickel *et al.*, 2004). Die Messungen wurden in 100 mM Tris pH 8,0, 4,5 mM cCMP, 1 mM reduziertem Glutathion, 0,2 mM oxidiertem Glutathion und 1 mM EDTA bei 25°C durchgeführt. 25 µM zufällig oxidiertes RNase A, 1 µM Pdi1 und 18 µM Grx7 wurden wie angegeben zugesetzt. Der Assay wurde in einem Jasco V-550 UV/Vis Zweistrahlphotometer bei

296 nm Wellenlänge durchgeführt.

2.4.6 Sensitivitätsassays

Um die Sensitivität von Hefen gegenüber bestimmten Reagenzien zu testen, wurden die zu untersuchenden Stämme zunächst in einer Übernachtskultur angeimpft. Je nach Stamm wurde Selektiv- oder Vollmedium verwendet. Die Kulturen wurden, wenn nötig, am nächsten Morgen verdünnt und bei 30°C weiter bis zur mittleren log-Phase inkubiert. Dann wurden sie auf eine OD₆₀₀ von 0,01 mit Wasser eingestellt. 100 µl dieser Suspension wurden auf Selektiv- oder Vollmedium ausplattiert. In der Mitte des Zellrasens wurde ein Filterpapier platziert, das mit den jeweiligen Reagenzien getränkt wurde. Die Platten wurden drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen mit rekombinant gewonnenen Proteinen immunisiert. Aus dem Kaninchenblut wurde das Serum gewonnen. Für die Erstinjektion wurden 200 µg Protein in einem Volumen von 250 µl 1:1 mit TiterMax (Sigma) versetzt und 1 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Emulsion wurde in 3 Portionen subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen folgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax unvollständiges Freundsches Adjuvans verwendet wurde. 10-12 Tage nach jeder Injektion, außer der Erstinjektion, wurde dem Kaninchen 10-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT (-60 min) wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation gewonnen (5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 20000 g). Anschließend wurde der Überstand zur Inaktivierung des Komplementsystems für 20 min auf 56°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Verwendete Antikörper

Alle gegen Proteine von *S. cerevisiae* verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der monoklonale HA-Antikörper und der GFP-Antikörper wurden kommerziell bezogen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

USA; Torrey Pines, Houston, USA). In Tabelle 2.3 sind die wichtigsten der in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgeführt. Die polyklonalen Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

Tabelle 2.3 Verwendete Antikörper

| Antikörper | Beschreibung |
|---------------------|---|
| α -Cox17 | Gegen Cox17-GST |
| α -Mia40 | Gegen das C-terminale Peptid CVKKEPL-NEESKP, Pineda, siehe Terziyska <i>et al.</i> , 2005 |
| α -Erv1 | Gegen GST-Erv1 |
| α -Tim13 | siehe Paschen <i>et al.</i> , 2000 |
| α -Sod1 | siehe Field <i>et al.</i> , 2003 |
| α -CCHL | siehe Mayer <i>et al.</i> , 1995 |
| α -Cyt b_2 | Gegen Cytochrom b_2 ⁸⁰⁻¹⁸⁴ |
| α -Tom70 | Gegen His ₆ -Tom70 ⁴⁰⁻⁶¹⁷ |
| α -AAC | siehe Endres <i>et al.</i> , 1999 |
| α -Aco1 | Gegen GST-Aconitase |
| α -Fumarase | siehe Stein <i>et al.</i> , 1994 |
| α -HA | siehe HA-probe (F-7): sc-7392, Santa Cruz Biotechnology |
| α -GFP | siehe TP-401, Torrey Pines Biolabs |
| α -Erp1 | siehe Marzioch <i>et al.</i> , 1999 |
| α -Ero1 | siehe Sevier <i>et al.</i> , 2007 |
| α -Pdi1 | siehe Xiao <i>et al.</i> , 2004 |
| α -Hep1 | Gegen His ₆ -Hep1 ⁴⁸⁻¹⁷⁴ |
| α -Grx6 | Gegen His ₆ -Grx6 ³⁴⁻²³¹ |
| α -Grx7 | Gegen His ₆ -Grx7 ³⁴⁻²⁰³ |

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus Serum aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden 0,24 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 10 min bei RT über Kopf geschüttelt und 3x in je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. 1,5 mg des

gereinigten Proteins in einem Volumen von 3 ml wurden bei folgenden Endkonzentrationen mit dem aktivierten Säulenmaterial versetzt: 0,25% SDS, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3. Die Suspension wurde für 1,5 h bei RT über Kopf geschüttelt und das Säulenmaterial wurde 3x mit je 3 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert, für 2 h bei RT belassen und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde mit je 5 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumacetat pH 4,0 und 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen (mit einer Laufgeschwindigkeit von 3 ml/min). Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt, bevor die Säule dann mit 5 ml 10 mM Natriumazid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und gelagert wurde (bei 4°C). Um die Antikörper an die Affinitätsäule zu binden, wurde die Säule zuerst mit je 10 ml der folgenden Puffer gewaschen: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat pH 11,5; 10 mM Tris/HCl pH 7,5. Zu 4 ml Serum wurden 16 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gegeben und die Lösung wurde auf folgende Konzentrationen eingestellt: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM o-Phe, 1 µg/ml Leupeptin. Das Serum wurde 3x mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben und zunächst mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, dann mit 20 ml 500 mM Natriumchlorid und schließlich mit 20 ml 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Die Elution wurde in 1 ml-Schritten mit folgenden Puffern durchgeführt: 10 ml Citrat pH 4,0; 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8 (wurde verworfen); 10 ml Natriumphosphat pH 11,5 (wurde verworfen); 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 (wurde verworfen). Die Fraktionen wurden mit 1 M Tris bzw. 1 M Glycin pH 2,2 neutralisiert, bei -20°C weggefroren und gelagert. Die Anwesenheit von Antikörpern und die Spezifität der einzelnen Fraktionen wurde durch Westernblot kontrolliert.

2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (3% Milchpulver oder BSA in TBS) geschwenkt. Anschließend folgte die Immundekoration mit Antiserum oder gereinigtem

Antikörper (in 3% Milchpulver oder BSA in TBS) für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Antiseren wurden in Verdünnungen von 1:200 bis 1:20000 und affinitätsgereinigte Antikörper in Verdünnungen von 1:200 bis 1:500 eingesetzt. Nach der Immundekoration wurde die Nitrozellulose gewaschen (3x 5 min in TBS) und für 45-90 min mit einem Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen (bzw. Maus bei monoklonalen Antikörpern) und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:10000 in 3% Milchpulver oder BSA in TBS). Die Membran wurde erneut gewaschen (3x 5 min in TBS) und für 1 min mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H₂O₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) durchtränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulose zwischen zwei transparente Folien gelegt und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

2.5.5 Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen

Um Interaktionen mitochondrialer Proteine mit Partnerproteinen nachzuweisen, wurden typischerweise 50-200 µg Mitochondrien in 20 µl SDS-Puffer (0,1% SDS) resuspendiert und für 1 min bei 95°C geschüttelt. Das solubilisierete Material wurde 50-fach mit Lysepuffer (0,1% Triton X-100, 150 mM Kaliumchlorid, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM Tris/HCl pH 7,4) verdünnt und 10 min auf Eis inkubiert. Dieses Lysat wurde für 10 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert und der Überstand wurde für die Immunpräzipitationsexperimente eingesetzt. Für die Immunfällung wurden 20 µl 50%ige Protein A-Sepharose (in 10 mM Tris/ HCl pH 7,4 gewaschen) zu 500 µl Lysat gegeben und mit 5 µl Serum oder gereinigtem Antikörper versetzt und 1-2 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die an Protein A-Sepharose gebundenen Antikörper-Antigenkomplexe wurden 2x in Lysepuffer und ein weiteres Mal in 20 mM Tris pH 7,4 gewaschen, bevor die Proteine durch Zugabe von 30 µl Laemmli-Puffer abgelöst wurden.

2.6 Puffer und Medien

Laktat-Medium: 3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Galaktose, 1 g/l Kaliumphosphat, 1 g/l Ammonium-chlorid, 0,5 g/l Kalziumchlorid, 0,5 g/l Natriumchlorid, 0,6 g/l Magnesiumsulfat, 0,3 ml/l Eisen(III)chlorid (1%), 2% Laktat, pH 5,5 mit KOH

Laemmli-Puffer: 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau,

60 mM Tris/HCl pH 6,8

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid

LB_{Amp}-Medium: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin

LB-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar

LB_{Amp}-Platten: LB-Platten mit 100 µg/ml Amp

Lysepuffer: 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0, 1% Triton X-100

PBS: 16 mM Natriumhydrogenphosphat, 4 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 115 mM Natriumchlorid

SEH: 0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

SH: 0,6 M Sorbitol, 20mM Hepes/KOH pH 7,4

SH/KCl: 0,6 M Sorbitol, 80mM KCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

Selektiv-Medium: 0,17% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5% (NH₄)₂SO₄, 2% Glukose oder 2% Galaktose, supplementiert mit entspr. Auxotrophiemarkern

Selektiv-Platten: Selektiv-Medium mit 2% Agar (SC-Platten)

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l Natriumchlorid, 0,19 g/l Kaliumchlorid

SOC-Medium: SOB-Medium supplementiert mit 20 mM Glukose, 10 mM Magnesiumchlorid

Premix: 40 mM Hepes/KOH pH 7,4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,5 mM CTP, 0,1 mM GTP, 0,5 mM UTP

TBS-Puffer: 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5

TCB: 50 mM Tris pH 8,0, 5 mM Kalziumchlorid, 250 mM Kaliumacetat, 15% Glyzerin

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0

YP-Medium: 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl

YP-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPD-Medium: YP-Medium mit 2% Glukose

YPD-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Glukose
2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPG-Medium: YP-Medium mit 3% Glyzerin

YPG-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 3% Glyzerin, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPGal-Medium: YP-Medium mit 2% Galaktose

YPGal-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Galaktose, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

2.7 Geräte

Amersham Biosciences, Freiburg: Spannungsversorgung, Flachbettscanner ImageScanner, Quantifizierungsprogramm ImageMaster, Chromatographiesysteme und Säulen

Beckman Coulter, Krefeld: Kühlzentrifugen (Avanti), Ultrazentrifugen (Optima)

Bio-Rad, Hercules, USA: Elektroporationsgerät Gene Pulser

Carl Roth: Sekuroka[®]-Glove-Bags

Elma, Singen: Ultraschallbad Transsonic 310

Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen,

Gradienten-PCR-Maschine Mastercycler Gradient

Institutswerkstatt, München: Semidry-Blot-Apparaturen, Tank-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopf-Schüttler,

Jasco V-550 UV/Vis Zweistrahlphotometer

Memmert, Hannover: Inkubatoren, Wärmeschränke

Peqlab, Erlangen: Agarosegel Imaging-System

Sigma Laborzentrifugen, Osterode: Tisch-Kühlzentrifugen

Vacuumbrand, Wertheim: Vakuumpumpe PC 2001 Vari

3 Ergebnisse

3.1 Import löslicher Proteine mit konservierten Cysteinmotiven in den Intermembranraum von Mitochondrien

3.1.1 Nachweis der Interaktion von Mia40 mit seinem Substrat Cox17

Der Import löslicher mitochondrialer Intermembranraumproteine, die keine Signalsequenz tragen, war bis vor kurzem weitgehend ungeklärt. Erst die Entdeckung des Intermembranraumrezeptors Mia40 gab einen Hinweis auf einen neuartigen Transportweg. Eine direkte Interaktion zwischen Mia40 und einigen Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven konnte nachgewiesen werden, die sowohl von Metallionen als auch von oxidativen Bedingungen unterstützt wird (Chacinska *et al.*, 2004, Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005). Um diese Interaktion genauer zu charakterisieren, wurden Importexperimente mit Substratproteinen dieses Importweges durchgeführt. Dabei sollte vor allem die Art der Komplexbildung untersucht werden.

Abbildung 3.1.1A zeigt den Import von radioaktiv markiertem Cox17 in Mitochondrien und anschließende Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Mia40. Hierfür wurde rekombinant exprimiertes, radioaktiv markiertes Cox17 mit isolierten Mitochondrien bei 25°C inkubiert. Durch zehnfache Verdünnung der Probe mit SH-Puffer und Zugabe von Trypsin wurde die Reaktion gestoppt. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation erneut isoliert, gewaschen und lysiert. Nach Sedimentation des ungelösten Materials wurde der Extrakt mit Protein A-Sepharose und dem Mia40-Antikörperserum bzw. dem Präimmunserum inkubiert. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose gewaschen und mit Laemmli-Puffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol eluiert. Präimmunserum wurde parallel zur Kontrolle der Spezifität der Antigen-Antikörper-Interaktion von α Mia40 verwendet.

Tatsächlich konnte mit Hilfe des Mia40-Antikörpers ein Mia40-Cox17-Komplex aus Mitochondrien isoliert werden, der nicht in den Proben, die nur Präimmunserum enthalten, nachweisbar ist. Je nachdem, ob die Proben mit oder ohne β -Mercaptoethanol aufgetragen wurden, ist dieser Komplex im SDS-Gel erhalten oder zerfallen. Die Sensitivität dieses Komplexes gegenüber β -Mercaptoethanol weist auf die Ausbildung

von Disulfidbrücken hin, die die Interaktion stabilisieren. Identische Ergebnisse konnten für die Komplexbildung zwischen Mia40 und Tim13 erzielt werden (Mesecke *et al.*, 2005).

In einem weiteren Experiment wurden isolierte Mitochondrien mit oder ohne rekombinant exprimiertem Cox17 in Importpuffer inkubiert. Nach dem Import wurden die Proben mit Proteinase K behandelt, um nicht-importiertes Protein zu verdauen. Nach dem Waschen wurden die Proben in Laemmli-Puffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol aufgenommen. Mit Hilfe von SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration gegen Mia40 wurden die Proben analysiert (siehe Abb. 3.1.1B).

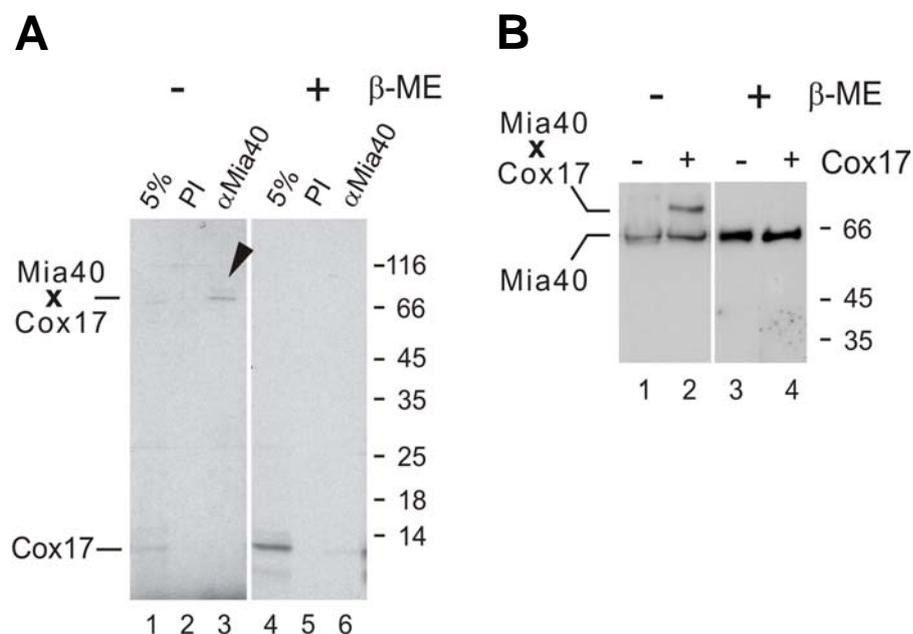


Abb. 3.1.1, Mia40 bildet mit Cox17 intermolekulare Disulfidbrücken aus

A, Mitochondrien wurden mit rekombinantem radioaktiv markiertem Cox17 für 20 min bei 25°C inkubiert. Nicht-importiertes Protein wurde mit Trypsin verdaut. Die Mitochondrien wurden gewaschen und anschließend in SDS lysiert. Fünf Prozent des Extraktes wurden direkt mit Laemmli-Puffer versetzt. Das übrige Lysat wurde zur Immunfällung mit Mia40-Antikörpern oder Präimmunsereum (PI) eingesetzt. Die eine Hälfte der Proben wurde in Laemmli-Puffer mit und die andere Hälfte ohne β -Mercaptoethanol (β -ME) aufgenommen. Die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert.

B, 100 μ g Mitochondrien wurden 10 min bei 25°C mit oder ohne 2 μ g Cox17 inkubiert. Die Proben wurden mit Proteinase K auf Eis inkubiert, gewaschen und in Laemmli-Puffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol aufgenommen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration gegen Mia40 analysiert.

Abbildung 3.1.1B zeigt in Spur 1 Mia40 in Wildtypmitochondrien. Wird den Mitochondrien Cox17 zugesetzt kommt es zur Bildung eines Komplexes aus neu importiertem Cox17 und Mia40, der unter nicht-reduzierenden Bedingungen stabil ist (Spur 2). Wird eine Probe mit Cox17 unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen, ist der Komplex nicht mehr detektierbar (Spur 4). Dies spricht ebenfalls für die Bildung des Mia40-Substrat-Intermediates durch Disulfidbrücken.

3.1.2 Der Import von Cox17 und Tim13 wird durch hohe DTT-Konzentrationen inhibiert

Um den Import von Mia40-Substraten genauer zu charakterisieren, wurden die beiden Intermembranraumproteine Tim13 und Cox17 unter verschiedenen Bedingungen in Hefemitochondrien importiert. Falls die Ausbildung von Disulfidbrücken ein essentieller Schritt während ihres Imports darstellt, sollte die Zugabe von reduzierenden Substanzen diesen beeinträchtigen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass der Import und die stabile Faltung von Cox17 im Intermembranraum ebenso wie bei Tim13 von weiteren Faktoren wie der Komplexierung von Metallionen abhängen (Lutz *et al.*, 2003). Daher wurden im folgenden Experiment den Importreaktionen sowohl verschiedene Konzentrationen an DTT, als auch Flavonoide, Chelatoren oder Kupfersulfat zugesetzt. DTT wirkt ebenso wie β -Mercaptoethanol reduzierend und somit der Bildung der Disulfidbrücken entgegen. NADH und FAD könnten als Kofaktoren von redoxaktiven Proteinen deren Import begünstigen, indem sie die Faltung der Proteine vereinfachen. Denselben Effekt könnten Kupferionen haben, die als Kofaktor von Cox17 bereits nachgewiesen wurden (Abajian *et al.*, 2004). Chelatoren können dem Import entgegenwirken, wenn tatsächlich zweiwertige Ionen zur Faltung benötigt werden. Radioaktiv markiertes Tim13 und Cox17 wurden für 20 min mit isolierten Wildtypmitochondrien inkubiert. Nicht-importiertes Protein wurde durch die Behandlung mit Proteinase K für 30 min auf Eis verdaut. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf Nitrozellulose übertragen (Abb. 3.1.2).

Die Autoradiographie zeigt, dass der Import von Tim13 und Cox17 bei DTT-Konzentrationen von jeweils 10 mM und 20 mM deutlich herabgesetzt ist. Eine DTT-Konzentration von 5 mM hatte keinen Einfluss auf die Importeffizienz von Tim13 (Abb. 3.1.2A). Überraschenderweise stimulierte die Zugabe von 2,5 mM DTT den

Import von Cox17 im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Weder NADH, FAD, die Mischung aus EDTA und *o*-Phenanthrolin noch Kupfersulfat hatte Einfluss auf den Cox17-Import (Abb. 3.1.2B). Somit konnte die notwendige Ausbildung von Disulfidbrücken für den vorliegenden Importmechanismus bestätigt werden. Die Komplexierung der oben genannten Kofaktoren kann zwar nicht ausgeschlossen werden, sie ist aber für den Import selbst nicht erforderlich.

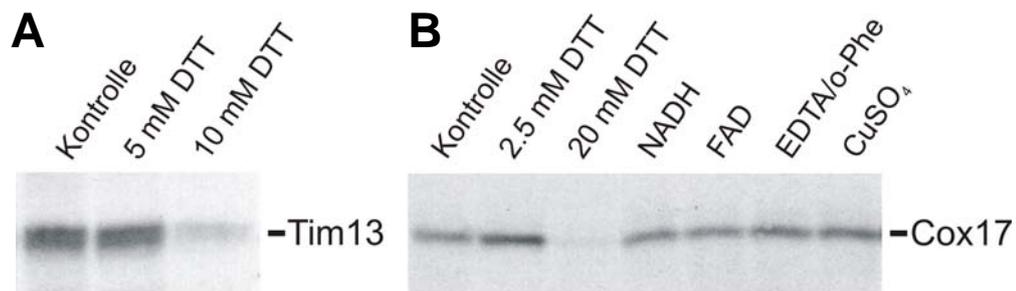


Abb. 3.1.2, Der Import von Tim13 und Cox17 ist DTT-sensitiv

A, Radioaktiv markiertes Tim13 wurde für 10 min in Gegenwart von 0, 5 oder 10 mM DTT in isolierte Mitochondrien importiert. Nicht-importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut. Importiertes Tim13 wurde mit Autoradiographie dargestellt.

B, Radioaktiv markiertes Cox17 wurde unter Zugabe von 0, 2,5 oder 20 mM DTT, 2 mM NADH, 2 mM FAD, 2 mM EDTA und *o*-Phenanthrolin oder 10 μ M Kupfersulfat in Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Proteinase K behandelt und Cox17 wurde mittels Autoradiographie detektiert.

3.1.3 Die Depletion von Erv1 beeinträchtigt die endogenen Level bestimmter Intermembranraumproteine

Die Ausbildung von Mia40-Substrat-Komplexen über Disulfidbrücken und die reduzierte Importeffizienz bei Anwesenheit hoher Konzentrationen des Reduktionsmittels DTT (s. 3.1.1 und 3.1.2) wies auf eine Sulfhydryloxidation im Intermembranraum hin. Tatsächlich ist dort die Sulfhydryloxidase Erv1 lokalisiert, die Oxidation von Proteinen katalysieren könnte (Lee *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001). Erv1 steht für *essential for respiration and viability* und, obwohl Erv1 verschiedene zelluläre Prozesse zu beeinflussen scheint (vergl. 1.1.3), waren bisher noch keine endogenen Substrate bekannt.

Um eine mögliche Rolle von Erv1 beim Importprozess löslicher Intermembranraum-proteine aufzudecken, stellten wir eine Hefemutante her, die Erv1 unter dem regulierbaren *GALI0*-Promotor exprimiert. Lässt man diese Mutante auf

Glukose wachsen, wird der Promotor reprimiert und Erv1 wird depletiert. Zieht man die Mutante auf Galaktose an, wird dieser Promotor induziert und die endogene Erv1-Menge nimmt stark zu. Im folgenden Experiment wurde die *GAL10*-Erv1-Mutante für einige Tage in Laktatmedium mit 0,1% Glukose kultiviert, wobei die Erv1-Expression reprimiert wurde. Allerdings konnte die Mutante immer noch genug Erv1 synthetisieren um zu überleben. Aus dieser Kultur wurden nach drei Tagen Mitochondrien isoliert und auf die endogenen Level verschiedener Proteine mittels Immundekoration untersucht.

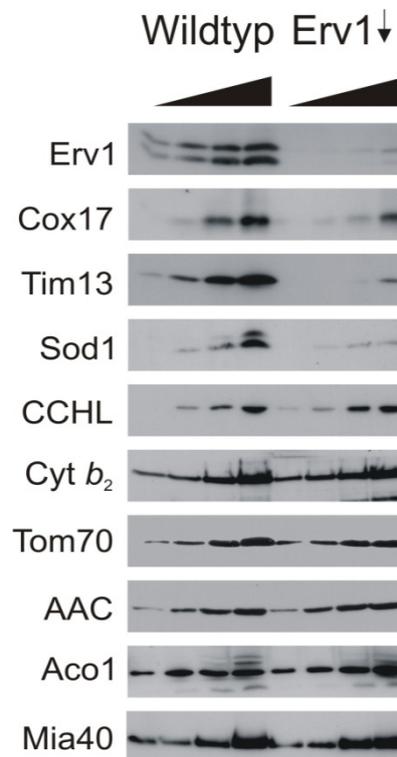


Abb. 3.1.3, Erv1-Depletion führt zur Reduktion der endogenen Level bestimmter Intermembranraumproteine

Wildtyp- und *GAL10*-Erv1-Zellen wurden für 48 Stunden in Glukose-haltigem Medium kultiviert. Mitochondrien beider Stämme wurden isoliert und 12, 25, 50 und 100 µg wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die endogenen Mengen verschiedener Proteine wurden durch Immundekoration ermittelt. Diese Proteine sind im Intermembranraum (Erv1, Cox17, Tim13, Sod1, Cytochrom *c*-Hämlyase [CCHL], Cytochrom *b*₂ [Cyt *b*₂], Mia40), in der Außenmembran (Tom70), in der Innenmembran (ADP/ATP-Carrier [AAC]) oder in der Matrix (Aconitase [Aco1]) lokalisiert.

Abbildung 3.1.3 zeigt zunächst die reduzierten Mengen Erv1 in den Erv1-depletierten Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp. Die Erv1-Depletion wurde von reduzierten Cox17-, Tim13- und Sod1-Leveln begleitet. Zumindest von Cox17 und Tim13 ist bekannt, dass es sich um Substrate von Mia40 handelt (Terziyska *et al.*, 2005). Die Cytochrom *c*-Hämlyase, Cytochrom *b*₂, Tom70, der ADP/ATP-Carrier und Aconitase lagen mit im Wildtyp vergleichbaren Mengen vor. Im Gegensatz zu Cox17, Tim13 und Sod1 enthalten diese Proteine keine konservierten Cysteinmotive bzw. sind nicht im Intermembranraum lokalisiert. Interessanterweise ist Mia40 nicht von der Erv1-Depletion betroffen, obwohl es sechs konservierte Cysteinreste enthält, die unter anderem in zwei CX₉C-Motiven angeordnet sind. Mia40 ist allerdings ein integrales Membranprotein mit mitochondrialem Sortierungssignal. Erv1 scheint demnach nur für die Biogenese löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinsignaturen verantwortlich zu sein.

3.1.4 Die Expression löslicher Intermembranraumproteine ist Erv1-unabhängig

Der Einfluss von Erv1 auf die Biogenese löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven konnte gezeigt werden. Es blieb aber zu klären, ob die reduzierten Level einiger Proteine in der *GAL10*-Erv1-Mutante tatsächlich auf ihren ineffizienteren Import zurückzuführen waren. Bisher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Synthese dieser Proteine bereits betroffen ist. Um dies zu unterscheiden, wurden aus Wildtyp- und Erv1-depletierten Zellen mitochondriale und zytosolische Fraktionen isoliert sowie Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Proben wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen, auf Nitrozellulose übertragen und gegen Cox17 und mehrere Kontrollproteine dekoriert.

In Abbildung 3.1.4A werden Gesamtzellextrakte aus Wildtyp- und Erv1-depletierten Zellen gezeigt. Die Dekoration gegen Erv1 veranschaulicht die unterschiedlich starke Expression in Wildtyp und Mutante. Die Kontrolle mit Aco1 weist identische Mengen des Matrixproteins in beiden Stämmen nach und auch Cox17 liegt in vergleichbaren Mengen vor. Abbildung 3.1.4B zeigt Cox17 in der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion aus Wildtyp und Mutante. Im Wildtyp beobachtet man die Akkumulation von Cox17 in den Mitochondrien, im Zytosol ist es aber nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu wird Cox17 in Erv1-depletierten Zellen im Zytosol angereichert. Aco1 dient hier als Ladekontrolle für die mitochondriale und Hexokinase für die zytosolische Fraktion. Dies bestätigt den Einfluss von Erv1 direkt

auf den Import von Cox17 in Mitochondrien und nicht auf einen vorausgehenden Schritt in der Biogenese des Proteins. Weder die Synthese noch die Stabilität von Cox17 werden durch Erv1-Depletion beeinflusst.

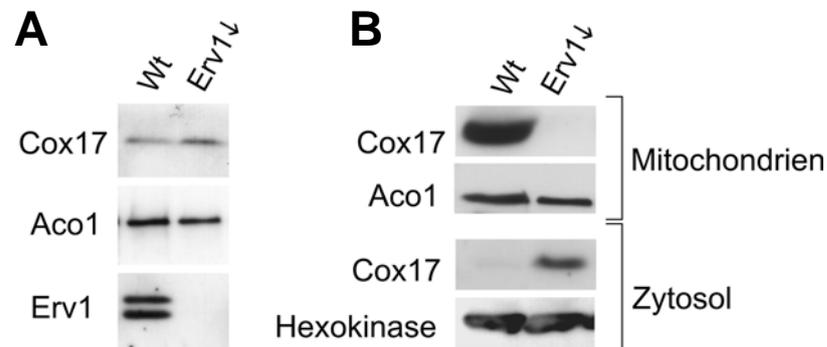


Abb. 3.1.4, Erv1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Cox17

Wildtyp- (Wt) und *GAL10*-Erv1-Zellen (*Erv1*Δ) wurden bis zur log-Phase in YPD angezogen. Die Zellen wurden geerntet und Gesamtzellextrakte (A), Mitochondrien und Zytosol (B) wurden präpariert. Die Verteilung von Cox17 wurde durch Immundekoration überprüft. Aconitase und Hexokinase dienten als Kontrolle für die mitochondriale bzw. zytosolische Fraktion.

3.1.5 Die endogenen Erv1-Mengen beeinflussen die Sensitivität gegenüber DTT *in vivo* und *in vitro*

Wie gezeigt, ist Erv1 in den bisher uncharakterisierten Biogeneseprozess bestimmter mitochondrialer Intermembranraumproteine involviert. Da dieser Prozess offensichtlich von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängt (s. 3.1.1 und 3.1.2), sollte untersucht werden, ob Erv1 *in vivo* Sulphydryloxidaseaktivität aufweist. Diese Vermutung lag nahe, da sie *in vitro* bereits nachgewiesen werden konnte (Lee, 2000). Hierfür wurden die *GAL10*-Erv1-Mutante (*GAL*-Erv1) und der korrespondierende Wildtyp auf Vollmedium (YP), das entweder 2% Glukose oder 2% Galaktose als Kohlenstoffquelle enthielt, als dünner Zellrasen ausplattiert. Dies führte in der Mutante zu einer Depletion bzw. verstärkten Expression von Erv1. In der Mitte der Platten wurden mit 3 M DTT getränkte Filterpapiere platziert. So konnte sich ein DTT-Gradient zwischen Plattenmitte und -rand ausbilden. Die Platten wurden einige Tage entweder unter aeroben oder unter anaeroben Bedingungen bei 30°C inkubiert. Anaerobe

Bedingungen wurden gewählt, um auch den Einfluss von Sauerstoff abschätzen zu können. Anschließend wurde die Größe der Höfe gemessen, die sich um die Filterpapiere herum gebildet hatten.

Abbildung 3.1.5.1A zeigt die Hofbildung unter aeroben Bedingungen. Der Wildtyp weist eine gewisse Sensitivität gegenüber DTT auf, die auf Glukose-haltigem Medium ebenso groß ist wie auf Galaktose-haltigem. Die Mutante dagegen zeigt auf Glukose, wo die endogenen Erv1-Level depletiert sind, im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber DTT. Der Anstieg der endogenen Erv1-Mengen in der Mutante durch Anzucht auf Galaktose hatte keine Wirkung auf die Sensitivität gegenüber DTT. Allerdings konnte der Effekt auf die Hofbildung durch Depletion von Erv1 durch anaerobe Wachstumsbedingungen noch verstärkt werden (Abb. 3.1.5.1B).

Somit konnte die Oxidaseaktivität von Erv1 *in vivo* nachgewiesen werden. Sie wirkt dem reduzierenden Einfluss von DTT auf das Zellwachstum entgegen. Desweiteren scheint Sauerstoff in die Oxidation durch Erv1 direkt oder indirekt involviert zu sein, da unter aeroben Bedingungen die DTT-Sensitivität deutlich geringer ist.

Da Erv1 im Intermembranraum lokalisiert ist und dem reduzierenden Effekt von DTT entgegenwirkt, könnte DTT auch den Import löslicher Intermembranraumproteine in Abhängigkeit von Erv1 beeinträchtigen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde radioaktiv markiertes Tim13, Cox17 und Oxa1-Vorläuferprotein in Wildtyp- und Erv1-depletierte Mitochondrien importiert. Den Reaktionen wurden jeweils 0, 5, 10, 20 oder 50 mM DTT zugesetzt. Nicht importiertes Protein wurde durch Zugabe von Proteinase K verdaut. Die Proben wurden mit SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie analysiert und quantifiziert.

Bei relativ geringen DTT-Konzentrationen wird die Importeffizienz für beide Proteine in Wildtyp-Mitochondrien bereits herabgesetzt (Abb. 3.1.5.2A/B), während der Oxa1-Import unverändert ist (Abb. 3.1.5.2C). Hohe DTT-Mengen führen sogar zur vollständigen Inhibition ihres Imports. Die selben Bedingungen wurden für den Import in Erv1-depletierte Mitochondrien gewählt. Hier reichten allerdings schon geringe Mengen DTT aus, um den Import vollständig zu inhibieren (Abb. 3.1.5.2A/B). Der Oxa1-Import war auch in diesen Mitochondrien unabhängig von der DTT-Konzentration (Abb.3.1.5.2C).

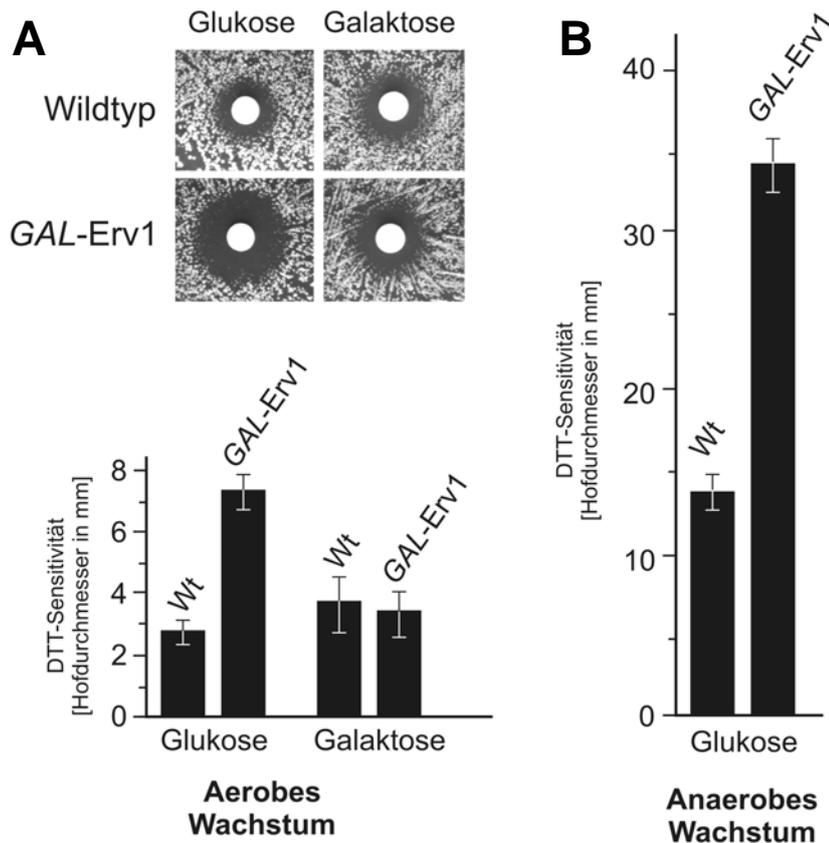


Abb. 3.1.5.1, Erv1-Depletion erhöht die Sensitivität gegenüber DTT *in vivo*

A, Wildtyp- (Wt) und *GAL10-Erv1*-Zellen (*GAL-Erv1*) wurden bis zur log-Phase in YPD oder YPGal angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD600 von 0,01 verdünnt. Jeweils 100 μ l wurden auf YPD- oder YPGal-Platten ausplattiert. Ein Filterpapier wurde in der Mitte des Zellrasens platziert. Das Filterpapier wurde mit 10 μ l 3 M DTT getränkt und die Platten für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Graphik zeigt die Hofgröße. Die Standardabweichungen wurden aus drei Platten pro Ansatz berechnet.

B, Die DTT-Sensitivität wurde so festgestellt wie oben beschrieben. Die Inkubation der Platten erfolgte unter anaeroben Bedingungen.

Dies bestätigt, dass der Import von Tim13 und Cox17 von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängt. Desweiteren konnte die Abhängigkeit der Disulfidbrückenbildung von Erv1 nachgewiesen werden, da Erv1 dem schädlichen Effekt von DTT während des Imports entgegenwirkt. Dieser Mechanismus ist spezifisch für Proteine des Intermembranraums, da der Oxa1-Import weder in Wildtyp- noch in Erv1-depletierten Mitochondrien durch DTT-Zugabe beeinflusst wurde.

Analog zu den Versuchen mit der *GAL10-Erv1*-Mutante wurden Import-Experimente mit einer Temperatur-sensitiven Mutante durchgeführt, in der Erv1 durch

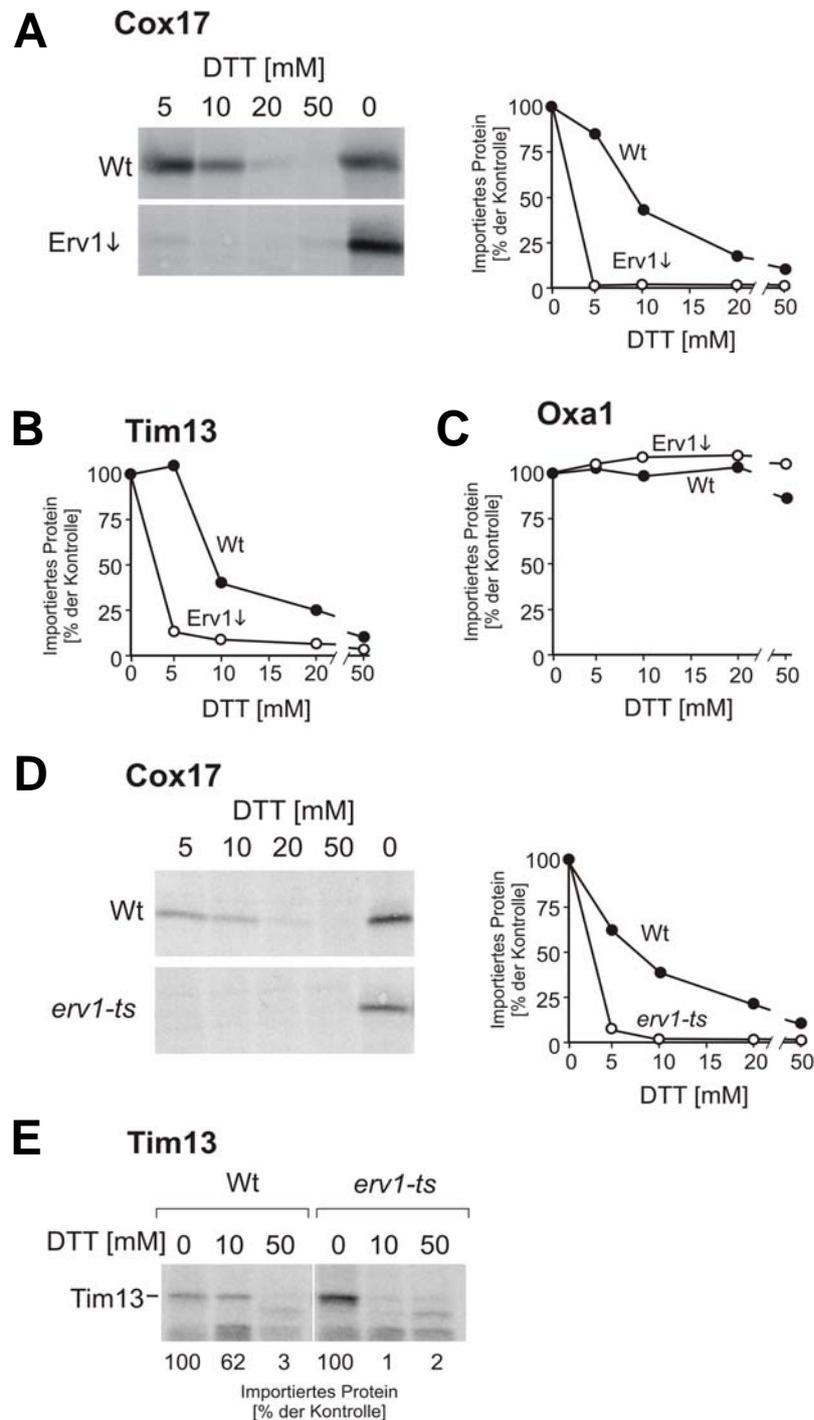


Abb. 3.1.5.2, Erv1-Depletion erhöht die Sensitivität gegenüber DTT in vitro

A-C, Cox17, Tim13 und Oxa1 wurden in Wildtyp- (Wt) und Erv1-depletierte (Erv1↓) Mitochondrien bei verschiedenen DTT-Konzentrationen für 20 min bei 25°C importiert. Nicht-importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut. Die Mitochondrien wurden gewaschen und anschließend mit SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie analysiert. Die Signale in jeder Spur wurden quantifiziert. Die Importeffizienz ohne DTT wurde gleich 100% gesetzt.

D-E, Die Importexperimente wurden durchgeführt, wie unter A beschrieben. Die Mitochondrien wurden dafür aus der *erv1-ts*-Mutante und dem korrespondierenden Wildtyp isoliert.

Inkubation bei höheren Temperaturen inaktiviert wird. Diese *erv1-ts*-Mutante (Lange *et al.*, 2001; Lisowsky, 1992) wächst bei 25°C wie der Wildtyp, ist aber bei 37°C nicht mehr lebensfähig. Die *erv1-ts*-Mutante und der Wildtyp wurden in Laktatmedium zunächst bei 24°C angezogen. Nach der Umstellung auf 37°C für 16 h wurden Mitochondrien isoliert. Tim13 und Cox17 wurden in diese Mitochondrien wieder unter Zugabe verschiedener DTT-Konzentrationen importiert. Während beide Proteine in Wildtyp- und *Erv1*-depletierte Mitochondrien ohne DTT effizient importiert werden, beeinträchtigt DTT-Zugabe den Import besonders in der Mutante (Abb. 3.1.5.2.D/E). Hier wird erneut die Abhängigkeit der Importeffizienz sowohl für Cox17 als auch Tim13 von der DTT-Konzentration und der kurative Effekt von *Erv1* deutlich.

3.1.6 *Erv1*-abhängiger Import unter physiologischen Bedingungen

Bei dem in allen bisherigen Versuchen eingesetzten DTT handelt es sich um ein sehr starkes und unphysiologisches Reduktionsmittel. In der eukaryotischen Zelle dient dagegen Glutathion als Redoxpuffer, das in allen Kompartimenten in einem spezifischen Gleichgewicht zwischen reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion vorliegt. Im Zytosol wurde eine GSH-Konzentration von ungefähr 13 mM und eine GSSG-Konzentration von 0,17 mM bestimmt (Østergaard *et al.*, 2004). Das Zytosol ist mit dem Intermembranraum der Mitochondrien über Porine verbunden, die permeabel für niedermolekulare Substanzen wie Glutathion sind (Benz, 1994). Obwohl die GSH-Konzentration des Intermembranraums bisher nicht bestimmt wurde, kann man daher annehmen, dass sie in etwa der des Zytosols entspricht. Um die Rolle von *Erv1* unter physiologischen Bedingungen zu analysieren, wurden Cox17- und Tim13-Importexperimente in Wildtyp- und *Erv1*-depletierte Mitochondrien mit Glutathion titriert. Zusätzlich wurden die gleichen Importreaktionen unter sauerstoffreduzierter Atmosphäre durchgeführt, da in der Zelle normalerweise ein wesentlich geringerer Sauerstoffdruck vorherrscht als unter unseren Standardimportbedingungen. Als Kontrolle dienten Su9-DHFR- und Oxa1-Vorläuferproteine.

Abbildung 3.1.6A zeigt in der linken Graphik den Import von Cox17 in isolierte Mitochondrien bei verschiedenen GSH-Konzentrationen unter Standardbedingungen. Die mittlere und die rechte Graphik zeigen Cox17- bzw. Tim13-Importexperimente unter mikroaeroben Bedingungen. Auch GSH vermindert in gleicher Weise wie DTT bereits unter Standardbedingungen die Importeffizienz für Cox17 sowohl in Wildtyp- als auch in *Erv1*-depletierte Mitochondrien. Die Depletion von *Erv1* führt in diesem

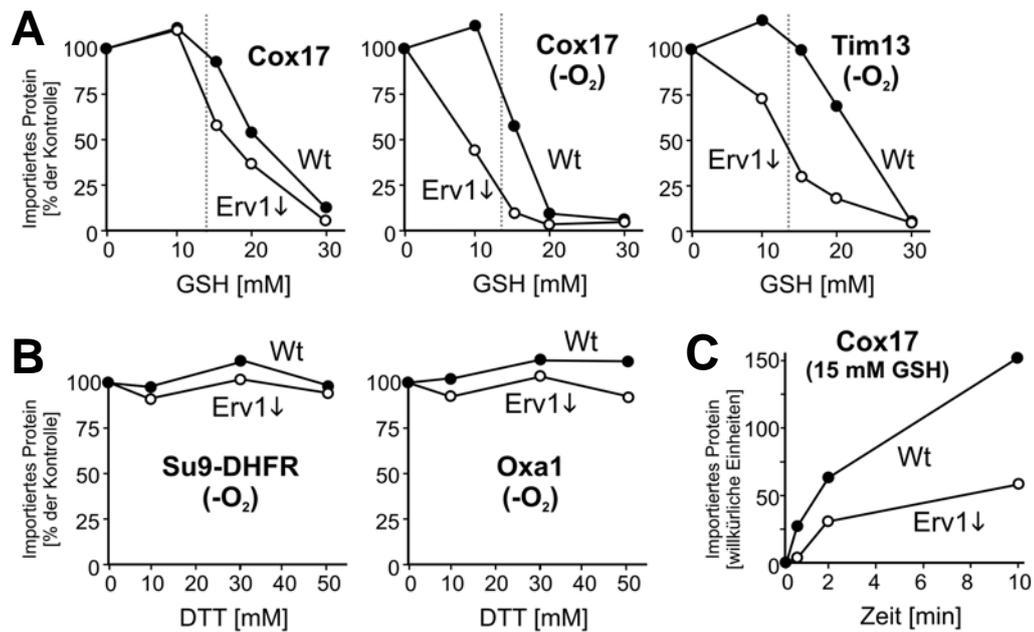


Abb. 3.1.6, Erv1-Depletion beeinträchtigt den Import unter physiologischen Bedingungen

A, Cox17 und Tim13 wurden in Wildtyp- (Wt) und Erv1-depletierte (Erv1↓) Mitochondrien in Gegenwart verschiedener GSH-Konzentrationen für 20 min bei 25°C importiert. Nicht-importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut. Die Proben wurden wie in Abb. 3.1.4.2 beschrieben analysiert. Die Versuche zu der mittleren und rechten Graphik wurden unter mikroaeroben Bedingungen durchgeführt. Die gepunktete Linie zeigt die physiologische Glutathionkonzentration (Østergaard, 2004) an.

B, Die Su9(1-69)-DHFR- und Oxa1-Vorläuferproteine wurden in Gegenwart ansteigender DTT-Konzentrationen unter mikroaeroben Bedingungen in Wildtyp- und Erv1-depletierte Mitochondrien importiert. Die Signale der Autoradiographie wurden quantifiziert und die Probe ohne DTT wurde gleich 100% gesetzt.

C, Cox17 wurde für verschiedene Zeitspannen bei 15 mM GSH in Wildtyp- und Erv1-depletierte Mitochondrien importiert wie unter A beschrieben und quantifiziert.

Experiment ebenfalls zu einer gesteigerten Sensitivität des Imports gegenüber dem Reduktionsmittel. Außerdem wird unter mikroaeroben Bedingungen die Wirkung von GSH in Wildtyp- und besonders in Erv1-depletierten Mitochondrien verstärkt. Mit der gepunkteten Linie ist die physiologische GSH-Konzentration gekennzeichnet. Beim Vergleich der Importeffizienz bei physiologischer GSH-Konzentration stellt man eine erhöhte Beeinträchtigung in den Erv1-depletierten Mitochondrien fest. Für die Kontrollexperimente mit Su9-DHFR und Oxa1 konnte auch unter mikroaeroben Bedingungen keine Abhängigkeit von der Reduktionsmittelkonzentration oder Erv1

festgestellt werden (Abb. 3.1.6B, vergl. 3.1.4). Eine Importkinetik mit Cox17 bei 15 mM GSH in Mitochondrien zeigte ebenfalls eine deutlich verminderte Importeffizienz, wenn Erv1 depletiert wurde (Abb. 3.1.6C).

Der Import von Cox17 und Tim13 ist demnach unter physiologischen Bedingungen, d.h. mikroaerober Atmosphäre und 13 mM GSH, in verstärktem Maße abhängig von Erv1, das im Intermembranraum eine importkompetente Umgebung schafft.

3.1.7 Die Mia40-Substrat-Interaktion ist abhängig von Erv1

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, ist ein essentieller Schritt während des Imports löslicher Intermembranraumproteine die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken mit Mia40. Da weiterhin gezeigt wurde, dass Erv1 während des Imports Reduktionsmitteln entgegenwirkt (Kapitel 3.1.4), blieb zu überprüfen, ob Erv1 notwendig für die Bildung eines Mia40-Substrat-Komplexes ist.

Um dies zu untersuchen, wurden isolierte Wildtyp- oder Erv1-depletierte Mitochondrien mit oder ohne rekombinant exprimiertem und gereinigtem Cox17 20 min bei 25°C inkubiert. Nicht importiertes Cox17 wurde anschließend mit Proteinase K verdaut. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration gegen Mia40 analysiert.

Abbildung 3.1.7 zeigt in den Spuren 2 bis 5 die Inkubation von Mitochondrien mit oder ohne Cox17 unter Standardimportbedingungen. Mit dem Antikörper gegen Mia40 konnten sowohl Mia40 als auch der Komplex aus Mia40 und Cox17 detektiert werden. In Spur 2 wurde der Import in Wildtyp-Mitochondrien aufgetragen. Man findet hier ungefähr 50% des gesamten Mia40 im Komplex mit Cox17. Dieser Komplex wird nicht in Wildtyp-Mitochondrien gebildet, wenn kein Cox17 zugesetzt wird (Spur 3). In Erv1-depletierten Mitochondrien entsteht dieser Komplex nach Inkubation mit Cox17 zwar, aber in wesentlich geringerem Ausmaß im Verhältnis zu der Gesamtmenge von Mia40 (Spur 4). Mit diesem Experiment konnte somit gezeigt werden, dass die Bildung des Komplexes aus Mia40 und seinem Substrat tatsächlich von Erv1 abhängig ist.

Allerdings stellte sich die Frage, ob dieser Komplex auch entsteht, wenn während des Imports physiologische GSH-Konzentrationen vorliegen. Daher wurden zu einer Importreaktion von Cox17 in Wildtyp-Mitochondrien 15 mM GSH zugesetzt (Spur 1). Die Probe wurde wie oben beschrieben analysiert. Trotz Zugabe des Reduktionsmittels fand die Bildung des Mia40-Cox17-Komplexes genauso effizient wie unter

Standardbedingungen statt (vergl. Spur 2). Dies zeigt, dass physiologische GSH-Konzentrationen die Ausbildung der intermolekularen Disulfid-brücken nicht inhibieren.

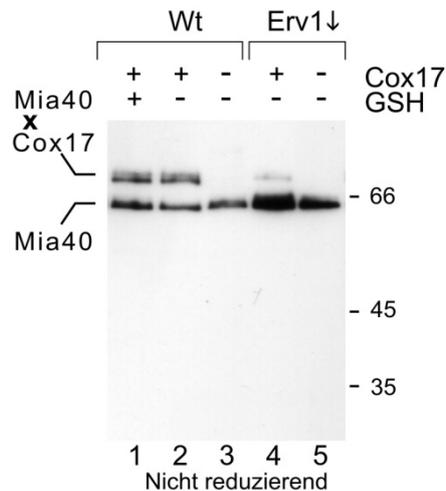


Abb. 3.1.7, Der Mia40-Substrat-Komplex ist abhängig von Erv1 und wird auch unter physiologischen Bedingungen gebildet

Mitochondrien aus Wildtyp- (Wt) und Erv1-depletierten (Erv1↓) Zellen wurden mit 5 µg rekombinanten Cox17 für 10 min inkubiert. Spur 1 zeigt die Probe mit zusätzlich 15 mM GSH. Nicht-importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut. Mia40 und der Mia40-Substrat-Komplex wurden mit Mia40-Antikörper detektiert.

3.1.8 Der Redoxzustand von Mia40 ist entscheidend für den Import von Cox17 und Tim13

Es sollte untersucht werden, in welchem Schritt DTT den Import löslicher Intermembranraumproteine negativ beeinflusst. Da es sich bei Mia40 um ein Protein mit sechs hochkonservierten Cysteinresten handelt (Chacinska *et al.*, 2004, Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005), könnten intermolekulare Disulfidbrücken verantwortlich für die Funktion des Proteins sein. Deswegen sollte untersucht werden, ob der Import von löslichen Intermembranraumproteinen vom Redoxstatus von Mia40 abhängt. Mia40 bildet *in vivo* mindestens eine Disulfidbrücke aus, deren Oxidationszustand durch eine Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE nachweisbar ist. In reduziertem Zustand läuft das Protein im Gel ein wenig oberhalb der oxidierten Form (Mesecke *et al.*, 2005). Dies ist vermutlich auf die scheinbar längere Kette des reduzierten Proteins zurückzuführen.

Im folgenden Experiment wurden Wildtyp-Mitochondrien vor der Inkubation mit

radioaktiv markiertem Cox17 oder Tim13 mit 10 mM DTT, 50 mM *N*-Ethylmaleimid (NEM) in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 oder beiden Substanzen behandelt. DTT sollte Disulfidbrücken in Mia40 reduzieren. NEM kann reduzierte Thiolgruppen irreversibel modifizieren, so dass diese nicht mehr oxidiert werden können. Nach 10 min wurden die Mitochondrien gewaschen und mit Substratprotein inkubiert. Nicht importiertes Protein wurde durch Zugabe von Proteinase K verdaut. Die Mitochondrien wurden erneut gewaschen, pelletiert und in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Hälfte jeder Probe wurde mit SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration auf den Redoxzustand von Mia40 untersucht. Zu der anderen Hälfte wurde β -Mercaptoethanol zugegeben, um das Laufverhalten der kleinen Substratproteine zu verbessern. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurden sie mittels Autoradiographie visualisiert.

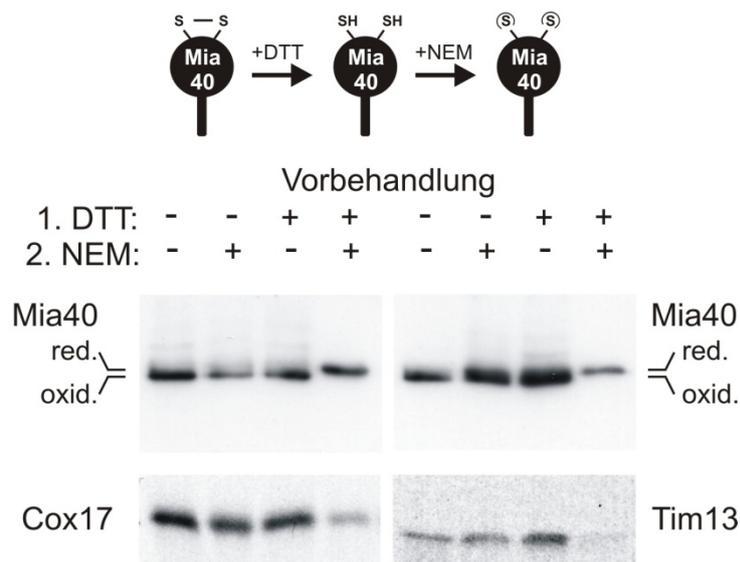


Abb. 3.1.8, Der Import von Cox17 und Tim13 korreliert mit dem Redoxzustand von Mia40

Eine Mitochondriensuspension wurde in vier Teile geteilt. Zwei Teile wurden 10 min ohne und zwei Teile mit 10 mM DTT inkubiert um Mia40 zu reduzieren. Jeweils eine Probe wurde mit 50 mM NEM versetzt. Nach 10 min wurden die Mitochondrien pelletiert, in Importpuffer resuspendiert und jede Probe wurde halbiert. Die Hälften wurden entweder mit rekombinantem radioaktiv markiertem Cox17 oder Tim13 inkubiert. Nicht-importiertes Protein wurde durch Proteinase K verdaut. Die Mitochondrien wurden gewaschen und in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Hälfte der Probe wurde direkt auf ein SDS-Gel geladen, auf Nitrozellulose transferiert und gegen Mia40 dekoriert, um den Redoxstatus zu bestimmen. Die andere Hälfte wurde mit β -Mercaptoethanol versetzt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Dieser Versuch zeigt für den Cox17- und Tim13-Import das gleiche Ergebnis (Abb. 3.1.8). Nach Inkubation der Mitochondrien mit NEM läuft Mia40 im Gel auf der gleichen Höhe wie in der Kontrollspur. Das gleiche Verhalten zeigt sich auch nach der Inkubation mit DTT. Nur nach Zugabe von DTT in der Anwesenheit von NEM läuft Mia40 ein wenig höher. Das bedeutet zunächst, Mia40 muss *in vivo* in der oxidierten Form vorliegen, da NEM reduzierte Thiolgruppen modifizieren, somit fixieren und Mia40 höher laufen würde (Terziyska *et al.*, 2005). Überraschenderweise läuft das mit DTT vorbehandelte Mia40 im Gel auch auf Höhe der oxidierten Form. Das ist wahrscheinlich auf die Reoxidation des Proteins während der Waschschrte zurückzuführen. Bestätigt wird dies durch die Probe, in der Mitochondrien sowohl mit DTT als auch mit NEM inkubiert wurden. Hier konnte Mia40 in der reduzierten Form durch NEM fixiert werden. Interessanterweise korreliert der Redoxzustand von Mia40 mit der Importeffizienz der Substratproteine. In den Mitochondrien, in denen Mia40 reduziert vorliegt, ist der Import von Cox17 und Tim13 stark vermindert.

3.1.9 Der Import von Cox17 überführt Mia40 in die reduzierte Konformation

In Kapitel 3.1.1 wurde die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen Mia40 und Cox17 beschrieben. Da dieser Komplex aber nicht permanent vorliegen kann, müssen Elektronen beim Lösen der Disulfidbrücke auf einen der Interaktionspartner übertragen werden. Es stellt sich nun die Frage, welcher der Partner oxidiert und welcher reduziert wird.

Um dies aufzuklären, sollte der Redoxzustand von Mia40 nach der Importreaktion betrachtet werden. Das Substratprotein muss für den Import reduziert vorliegen (Lutz *et al.*, 2003), Reduktionsmittel mussten im Puffer aber vermieden werden, um die mögliche Reduktion von Mia40 direkt auf den Kontakt mit dem Substratprotein zurückführen zu können. Darum wurde Cox17 in Gegenwart von 200 μM Zinkacetat exprimiert und aufgereinigt. Dies sollte bewirken, dass die konservierten Cysteinreste in Cox17 Zinkionen komplexieren statt Disulfidbrücken auszubilden. 10 μg rekombinant exprimiertes und gereinigtes Cox17(Zn^{2+}) wurden mit Wildtyp- und Erv1-depletierten Mitochondrien oder Mitoplasten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit NEM behandelt, um reduzierte Thiolgruppen abzufangen. Die Proben wurden durch nicht-reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörper gegen Mia40 dekoriert.

Abbildung 3.1.9 zeigt die verschiedenen Redoxzustände von Mia40 mit und ohne Zugabe von Substratprotein. Ein Teil der Proben wurde mit Cox17 inkubiert. Die

übrigen Proben wurden nur mit dem Puffer versetzt, in dem Cox17 im letzten Aufreinigungsschritt aufgenommen wurde. Unabhängig von der Art der Mitochondrien oder Mitoplasten ist die reduzierende Wirkung von Cox17 auf Mia40 zu beobachten, das zuvor zu einem großen Teil oxidiert vorlag. Das bedeutet, die Elektronen werden nach der Interaktion auf Mia40 übertragen und das Substrat liegt nach dem Import oxidiert im Intermembranraum vor.

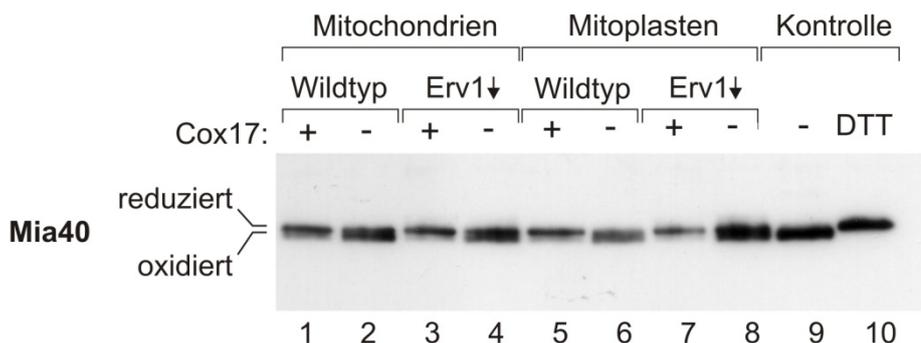


Abb. 3.1.9, Cox17-Import in den Intermembranraum reduziert Mia40

Rekombinantes Cox17 wurde in Gegenwart von 200 μM Zinkacetat exprimiert, um durch Komplexierung des Metallions die Oxidation zu vermeiden. Nach der Aufreinigung wurden 10 μg Cox17(Zn^{2+}) (Spuren mit + gekennzeichnet) mit isolierten Mitochondrien (Spur 1-4, 9 und 10) oder Mitoplasten (Spur 5-8) aus Wildtyp- (Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 10) und Erv1-depletierten Zellen (Spuren 3, 4, 7 und 8) 10 min inkubiert. Reduzierte Thiolgruppen wurden mit 50 mM NEM modifiziert. Die Mitochondrien wurden gewaschen, mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Mit Mia40-Antikörper wurde die reduzierte und oxidierte Form detektiert. Spuren 9 und 10 veranschaulichen das Laufverhalten der verschiedenen Mia40-Redoxformen.

3.1.10 Mia40 wird durch Erv1 oxidiert

In Kapitel 3.1.8 konnte nachgewiesen werden, dass eine intramolekulare Disulfidbrücke in Mia40 für den Import notwendig ist. Da aber der Import von reduziertem Cox17 zur Reduktion von Mia40 führt (s. 3.1.9), ist ein anschließender Oxidationsschritt notwendig. Wie bereits gezeigt, befindet sich die Sulfhydryloxidase Erv1 im Intermembranraum von Mitochondrien (Lange *et al.*, 2001), die unter physiologischen Bedingungen eine essentielle Rolle beim Importprozess Mia40-abhängiger Intermembranraumproteine spielt. Daher bleibt zu überprüfen, ob Erv1 die für den Import notwendige Reoxidation von Mia40 katalysiert.

Hierfür wurden Mitochondrien isoliert, in denen Erv1 entweder depletiert oder

überexprimiert wurde. Als Kontrolle dienten Mitochondrien aus dem korrespondierenden Wildtypstamm, der unter identischen Bedingungen angezogen wurde. Die verschiedenen Mitochondrien wurden mit GSH-Konzentrationen zwischen 0 und 25 mM inkubiert und anschließend mit Iodacetamid alkyliert, um reduzierte Thiole zu modifizieren. Die Proben wurden in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen Mia40 dekoriert. Sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form war detektierbar (Abb. 3.1.10). Die Graphiken zeigen die Quantifizierung der relativen Mengen der oxidierten Form.

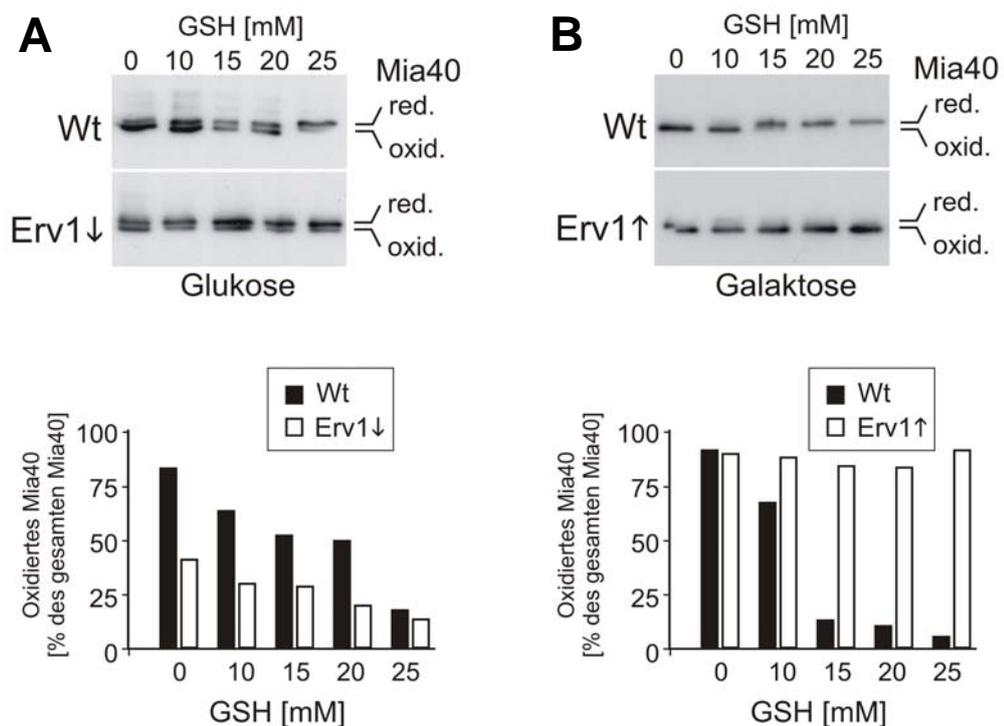


Abb. 3.1.10, Mia40 wird durch Erv1 oxidiert

Mitochondrien wurden aus Wildtyp- (Wt) und *GAL10*-Erv1-Zellen (Erv1↓), die zuvor in Laktatmedium mit 0,1% Glukose (A) oder 0,1% Galaktose (B) kultiviert wurden, isoliert und in Gegenwart verschiedener GSH-Konzentrationen inkubiert. Freie Thiolgruppen wurden mit Iodacetamid modifiziert. Die Proben wurden analysiert wie in Abb. 3.1.8 beschrieben und quantifiziert. Die Menge des oxidierten Mia40 wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge in den Graphiken dargestellt.

Die Zugabe von GSH soll mit höherer Konzentration immer mehr Mia40 in die reduzierte Form überführen. Dies trifft sowohl in Wildtyp- als auch Erv1-depletierten Mitochondrien zu. Abbildung 3.1.10A zeigt, je höher die GSH-Konzentration ist, desto mehr reduziertes Mia40 liegt vor. Dabei ist der Mia40-Redoxzustand nicht nur von der

GSH-Konzentration abhängig, sondern auch von Erv1: bereits ohne GSH-Zugabe findet man in Wildtyp-Mitochondrien deutlich mehr Mia40 in der oxidierten Form als in Erv1-depletierten Mitochondrien. Außerdem verschiebt sich bei Erv1-Depletion das Gleichgewicht mit steigender GSH-Konzentration zur reduzierten Form viel eher als im Wildtyp. Abbildung 3.1.10B zeigt das gleiche Experiment mit Erv1-überexprimierenden Mitochondrien und dem zugehörigen Wildtyp. Im Wildtyp beobachtet man wieder, dass Mia40 mit Steigerung der GSH-Konzentration in die reduzierte Form überführt wird. In Mitochondrien mit überexprimiertem Erv1 dagegen kann Mia40 nicht einmal mit 25 mM GSH reduziert werden.

Damit wird zunächst wieder die oxidierende Funktion von Erv1 bestätigt, die bereits in Kapitel 3.1.4 und 3.1.6 beschrieben wurde. Durch Regulation der Erv1-Mengen in Mitochondrien konnte eine Abhängigkeit des Mia40-Redoxstatus von Erv1 festgestellt werden. Das bedeutet, Mia40 enthält zumindest ein Cysteinpaar, das durch Erv1 oxidiert werden kann.

3.2 Die Rolle von Hot13 beim Import löslicher Intermembranraumproteine

3.2.1 Hot13 hat keinen Einfluss auf die endogenen Level von Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven

Hot13 ist ein mitochondriales Intermembranraumprotein, dessen Funktion für die Lebensfähigkeit von Hefezellen nicht essentiell ist. Hot13 steht für *Helper of Tims* mit einer Größe von 13 kDa. Das Protein wurde von Koehler und Kollegen identifiziert und teilweise charakterisiert. Deletionsmutanten zeigten erhöhte Sensitivität gegenüber dem Oxidationsmittel t-Butylhydroperoxid, Beeinträchtigung der Assemblierung des TIM10-Komplexes und des Imports seiner Untereinheiten (Curran *et al.*, 2004).

Diese Befunde ließen die Beteiligung von Hot13 am Mia40-Erv1-abhängigen Importprozess vermuten. Um dies detaillierter zu untersuchen, sollten die endogenen Level der Proteine analysiert werden, die diesen Import katalysieren oder von ihm abhängig sind. Dafür wurde zunächst eine *HOT13*-Deletionsmutante konstruiert. Diese Mutante trägt eine *KanMX6*-Kassette anstelle des *HOT13*-Gens und ist lebensfähig. Die Insertion der Deletionskassette wurde durch PCR überprüft, da kein Antikörper gegen Hot13 zur Verfügung stand. Aus der Deletionsmutante und dem korrespondierenden

Wildtyp wurden Mitochondrien isoliert. Die Mitochondrien wurden in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Fumarase, Mia40, Erv1, Tim13, Cox17 und Sod1 dekoriert.

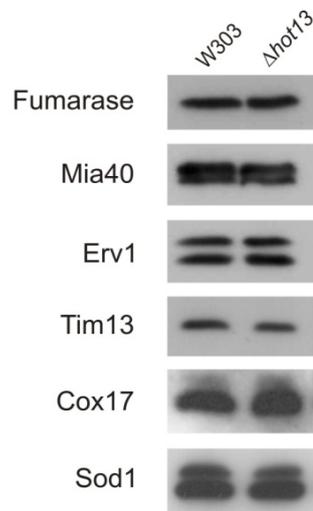


Abb. 3.2.1, Die endogenen Level redoxabhängiger Intermembranraumproteine sind in $\Delta hot13$ -Zellen unverändert

Mitochondrien wurden aus Wildtyp- und $\Delta hot13$ -Zellen isoliert und in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde dann mit Antikörpern gegen Fumarase als Ladekontrolle, Mia40, Erv1, Tim13, Cox17 und Sod1 dekoriert.

In Abbildung 3.2.1 ist das Ergebnis dargestellt. Fumarase, ein mitochondriales Matrixprotein, diente als Ladekontrolle. Mia40 läuft im nicht-reduzierenden Gel als Doppelbande, die in beiden Stämmen mit gleicher Intensität nachweisbar ist und auch das Verhältnis von der oxidierten (untere Bande) zur reduzierten Form (obere Bande) ist nahezu identisch. Ebenso wurde Erv1 als zweite essentielle Komponente des Mia40-Erv1-abhängigen Importweges in gleichen Mengen vorgefunden. Im Gegensatz zu den Befunden von Carla Köhlers Arbeitsgruppe konnten wir bei Tim13 keinen Unterschied feststellen. Auch Cox17 und Sod1 als Substrate von Mia40 und Erv1 zeigten keine veränderten endogenen Level in der $\Delta hot13$ -Mutante.

3.2.2 Die Toleranz gegenüber reduzierenden oder oxidierende Substanz ist unabhängig von Hot13

Wie bereits in Kapitel 3.1.5 beschrieben wurde, führt die Depletion von Erv1 zu verstärkter Sensitivität der Zellen gegenüber DTT während des Wachstums. Da für die $\Delta hot13$ -Mutante berichtet wurde, dass sie besonders empfindlich gegenüber t-Butylhydroperoxid ist (Curran *et al.*, 2004), wollten wir ihr Wachstum im Vergleich zum Wildtyp unter Zugabe reduzierender und oxidierender Substanzen beobachten.

Dafür wurden die $\Delta hot13$ -Mutante, ihr korrespondierender Wildtyp und die *GAL10*-Erv1-Mutante auf Glukose-haltigem Medium angezogen. Die Über-Nacht-Kultur wurde morgens verdünnt und die Zellen wurden weiter bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen auf eine OD_{600} von 0,01 eingestellt und 100 μ l auf YPD ausplattiert. In der Mitte der Platten wurde ein Filterpapier platziert, das mit dem Reduktionsmittel DTT oder den Oxidationsmitteln Diamid oder H_2O_2 getränkt wurde. Diese Platten wurden dann für zwei Tage bei 30°C inkubiert und die Hofgröße um das Filterpapier wurde photographisch dokumentiert.

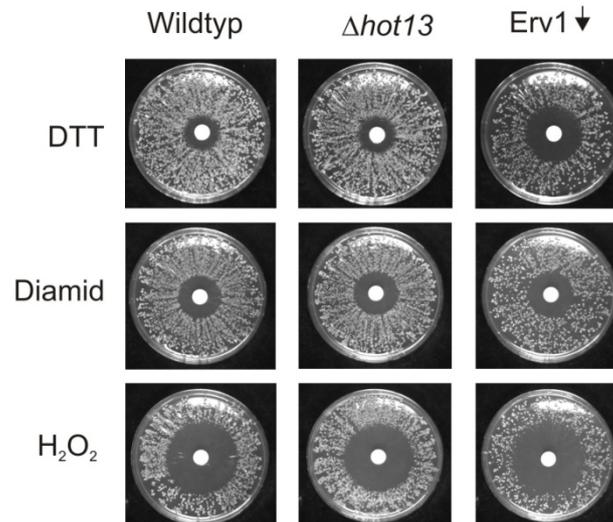


Abb. 3.2.2, Hot13 hat keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Oxidations- oder Reduktionsmitteln

Wildtyp-, $\Delta hot13$ - und *GAL10*-Erv1-Zellen wurden bis zur log-Phase in YPD angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,01 verdünnt. Jeweils 100 μ l wurden auf YPD ausplattiert. Ein Filterpapier wurde in der Mitte des Zellrasens platziert. Das Filterpapier wurde mit 10 μ l 3 M DTT, 12 μ l 0,5 M Diamid oder 10 μ l 9,8 M H_2O_2 getränkt. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum photographisch dokumentiert.

Die Applikation von DTT führte zur Bildung von Wachstumshöfen sowohl beim Wildtyp, als auch bei der $\Delta hot13$ - und der $GAL10$ -Erv1-Mutante. Die Höfe zeigen bei Wildtyp und $\Delta hot13$ -Mutante die gleiche Größe während er bei der $GAL10$ -Erv1-Mutante deutlich größer ist (Abb. 3.2.2). Dies ist, wie bereits in Kapitel 3.1.5 erläutert wurde, auf die Oxidasefunktion von Erv1 zurückzuführen. Offensichtlich besitzt Hot13 diese Funktion nicht, da seine Deletion nicht in höherer Sensitivität gegenüber DTT resultiert. Ebenso führte Diamid zur Hofbildung, die aber bei allen drei Stämmen identisch war (Abb. 3.2.2). Da zuvor die erhöhte Sensitivität der $\Delta hot13$ -Mutante gegenüber dem Oxidationsmittel t-Butylhydroperoxid beschrieben wurde (Curran *et al.*, 2004), wurde vermutet, dass Hot13 Reduktaseaktivität besitzt. Dies konnte nicht bestätigt werden, da die Deletion von Hot13 die Sensitivität gegenüber Diamid nicht steigert. Die Inkubation mit H_2O_2 zeigt ebenso wie mit Diamid keinen Unterschied zwischen den drei Stämmen. Der Hof ist hier insgesamt größer, da eine höhere Konzentration des Oxidationsmittels eingesetzt wurde (Abb. 3.2.2). Hot13 scheint daher nicht im Allgemeinen als Reduktase zu fungieren, sondern speziell auf t-Butylhydroperoxid zu reagieren.

3.2.3 Hot13 beeinflusst den Redoxzustand von Mia40

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, konnte kein Einfluss von Hot13 auf die endogenen Mia40-Level festgestellt werden. Da es sich bei Hot13 nicht um ein essentielles Protein handelt, könnte ein möglicher Effekt auf Mia40 durchaus schwächer sein als der von Erv1. Um die Relevanz von Hot13 genauer bestimmen zu können, sollte Mia40 bei verschiedenen GSH-Konzentrationen in Wildtyp und $\Delta hot13$ -Mutante betrachtet werden.

Zunächst wurden Mitochondrien aus der $\Delta hot13$ -Mutante und dem korrespondierenden Wildtyp isoliert. Die Mitochondrien beider Stämme wurden für den Versuch 1:10 in SH-Puffer verdünnt, anschließend mit 0, 7,5, 15, 22,5 oder 30 mM GSH versetzt und für 10 min bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 mM NEM in 200 mM Tris/HCl pH 8,0 wurden freie Thiolgruppen irreversibel modifiziert, um eine spätere Oxidation von Mia40 zu verhindern. Die Mitochondrien wurden gewaschen und in nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, um die oxidierte Form von Mia40 von der reduzierten unterscheiden zu können. Alternativ wurden diesem Versuch während der Inkubation mit GSH 25 mM EDTA und 10 mM *o*-Phenanthrolin zugesetzt. Mittels SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und durch Western Blot auf eine

Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Mia40 konnte sowohl oxidiertes als auch reduziertes Mia40 detektiert werden.

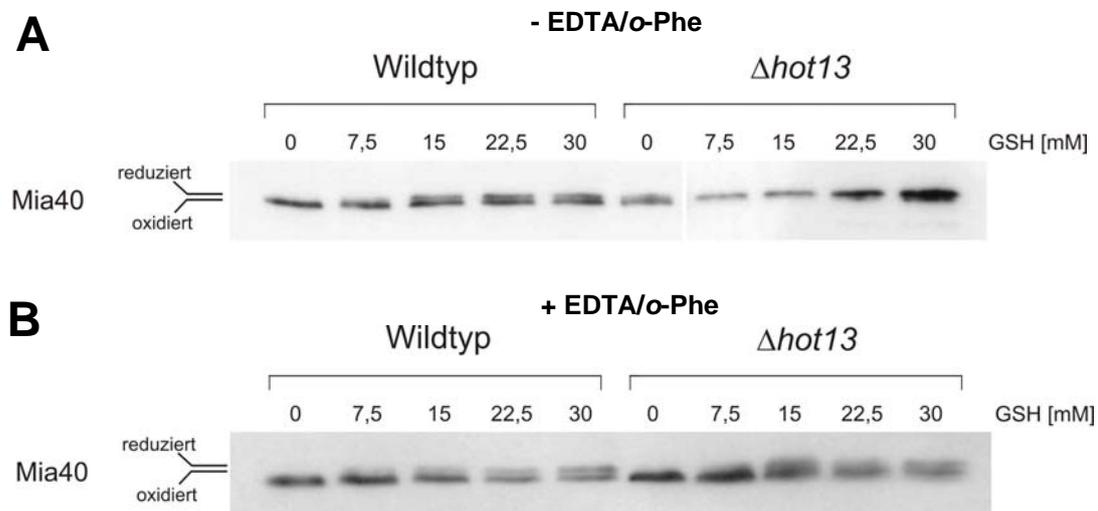


Abb. 3.2.3, Hot13 beeinflusst den Redoxzustand von Mia40 unter reduzierenden Bedingungen

A, Mitochondrien aus Wildtyp oder der $\Delta hot13$ -Mutante wurden mit 0, 7,5, 15, 22,5 oder 30 mM GSH 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 50 mM NEM versetzt, um freie Thiolgruppen zu modifizieren. Die Proben wurden in nicht-reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Immundekoration mit Mia40-Antikörpern konnte die reduzierte und die oxidierte Form detektiert werden.

B, Mitochondrien wurden wie unter A beschrieben, aber in Gegenwart von 25 mM EDTA und 10 mM *o*-Phenanthrolin inkubiert.

Abbildung 3.2.3 zeigt den Redoxzustand von Mia40 in Wildtyp- und $\Delta hot13$ -Mitochondrien bei verschiedenen GSH-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Chelatoren. Ohne EDTA und *o*-Phenanthrolin (Abb. 3.2.3A) ist Mia40 ohne Zugabe von GSH nahezu vollständig oxidiert. Im Wildtyp liegt bei bis zu einer physiologischen GSH-Konzentration von 15 mM auch der Großteil von Mia40 in der oxidierten Konformation vor, die im Gel etwas schneller läuft als die reduzierte Form. Ab 22,5 mM GSH liegen reduzierte und oxidierte Form im Verhältnis 1:1 vor. Im Gegensatz dazu wird in der $\Delta hot13$ -Mutante bereits ab 7,5 mM GSH Mia40 vollständig in die reduzierte Form überführt. Ein ähnliches Verhalten konnten wir in den Erv1-depletierten Mitochondrien feststellen (s. Abb.3.1.10). Allerdings war in dem Fall der Phänotyp deutlich stärker ausgeprägt als in der $\Delta hot13$ -Mutante. In Erv1-depletierten

Mitochondrien liegt Mia40 bereits ohne Zugabe von Reduktionsmitteln zu 50% in der reduzierten Form vor, während in Mitochondrien der $\Delta hot13$ -Mutante die Applikation von GSH notwendig ist. Wenn der Versuch in Gegenwart von Chelatoren durchgeführt wurde, beobachtete man im Wildtyp keine Veränderung des Mia40 Redoxstatus. In den $\Delta hot13$ -Mitochondrien dagegen führte die Zugabe von Chelatoren zu einer Komplementierung des zuvor beobachteten Phänotyps. Das spricht für eine Metallionen koordinierende Funktion von Hot13.

3.2.4 Der Tim13-Import ist in $\Delta hot13$ -Mitochondrien nicht beeinträchtigt

Die Oxidation von Mia40 ist notwendig für den Import löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven. Auf Ebene endogener Substratproteinmengen konnte aber kein Unterschied zwischen der Deletionsmutante und dem korrespondierenden Wildtyp festgestellt werden (vergl. Kapitel 3.2.1). Daher wollten wir untersuchen, ob die Importkinetik in der $\Delta hot13$ -Mutante beeinträchtigt ist.

Mitochondrien der $\Delta hot13$ -Mutante und des korrespondierenden Wildtyps wurden mit radioaktiv markiertem Tim13 0,5, 2, 5 oder 10 min bei 25°C inkubiert. Nicht-importiertes Protein wurde durch Zugabe von Proteinase K während der Inkubation für 30 min auf Eis verdaut. Nach Inhibition der Protease durch PMSF wurden die Mitochondrien gewaschen, reisoliert, in β -Mercaptoethanol-haltigem Laemmli-Puffer aufgenommen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembran transferiert und autoradiographiert.

Abbildung 3.2.4 stellt den Import von radioaktiv markiertem Tim13 in Wildtyp- und $\Delta hot13$ -Mitochondrien unter Standardbedingungen dar. Die Graphik darunter zeigt die Quantifizierung der Tim13-Signale in den einzelnen Spuren für Wildtyp und Mutante im Vergleich. Die Deletion von *HOT13* führt nicht zur Verminderung der absoluten Importeffizienz. Außerdem kann man dem Verlauf des Imports folgen und auch hier keine Verzögerung feststellen. Das bedeutet, unter Standardbedingungen hat die Deletion von Hot13 keine Auswirkung auf den Import von Tim13. Allerdings erlaubt dieses Experiment keine Aussage über die Assemblierung des importierten Proteins in seinen hexameren Komplex.

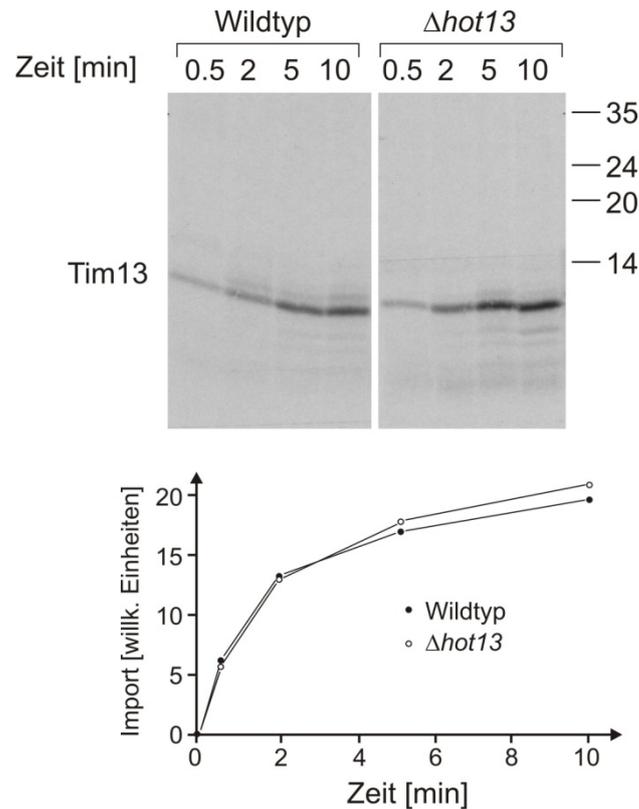


Abb. 3.2.4, Tim13-Import in unabhängig von Hot13

Radioaktiv markiertes Tim13 wurde in Wildtyp- und $\Delta hot13$ -Mitochondrien für 0,5, 2, 5, und 10 min bei 25°C importiert. Nicht-importiertes Protein wurde mit Proteinase K verdaut. Die Mitochondrien wurden gewaschen und anschließend durch SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie analysiert. Die Signalintensität in jeder Spur wurde quantifiziert und in einem Diagramm gegen die Dauer der Importreaktion aufgetragen.

3.3 Charakterisierung zweier neuartiger Glutaredoxine des sekretorischen Transportweges

3.3.1 Identifizierung zweier uncharakterisierter Gene putativer Glutaredoxine

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 konnte die essentielle physiologische Bedeutung von Thiolgruppen für biologische Prozesse gezeigt werden. Die Oxidation von Cysteinresten und somit die Ausbildung von Disulfidbrücken ist ein grundlegender Schritt im Importprozess löslicher mitochondrialer Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven. Andere Studien zeigen die Beteiligung von Metallionen wie Zn^{2+} oder Cu^{+2+} am Import in den Intermembranraum (Lutz *et al.*, 2003). Zur

Koordinierung der Metallionen müssen Cysteinreste reduziert vorliegen. Die Daten, die wir aus unseren Experimenten zur Aufklärung dieses Importmechanismus erhalten haben, legen nahe, dass das importierte Substratprotein nach der Interaktion mit Mia40 oxidiert vorliegt (vergl. 3.1.9). Daher stellt sich die Frage, ob zumindest einige

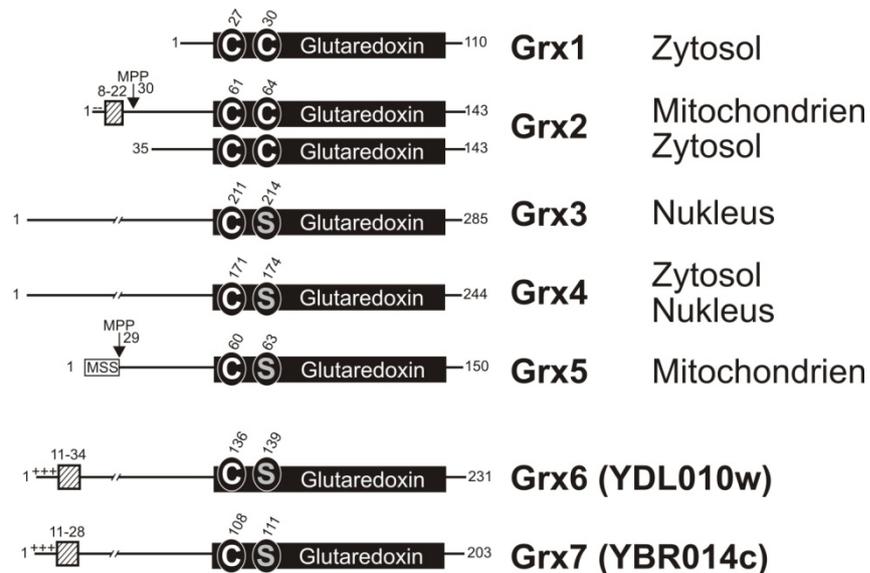


Abb. 3.3.1, Schematische Darstellung homologer Proteine zu Grx1 aus *S. cerevisiae*

Die konservierte Glutaredoxindomäne ist als schwarzes Rechteck dargestellt. Die konservierten Cystein- und Serinreste sind gekennzeichnet. Die angegebenen Nummern beziehen sich auf ihre Position in der Aminosäuresequenz. Hydrophobe Sequenzen sind als schraffierte Rechtecke dargestellt und geladene Reste N-terminal der hydrophoben Bereiche mit Plus- und Minuszeichen markiert. MSS bezeichnet das mitochondriale Sortierungssignal von Grx5 und MPP die Schnittstelle, an der das Protein durch die mitochondriale prozessierende Peptidase geschnitten wird. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine ist an der rechten Seite angegeben.

der Substrate des Mia40-Erv1-Importweges nach der Oxidation durch Mia40 erneut reduziert werden, um Metallionen zu komplexieren. Für diesen Schritt würde eine Reduktase benötigt, die im Intermembranraum lokalisiert ist oder zumindest die katalytische Domäne dorthin exponiert. Mögliche Kandidaten sind Glutaredoxine, die mit Hilfe von Glutathion ihre Substrate reduzieren und ubiquitär in der Zelle vorkommen. Eine Suche wurde mit Grx1 mit Hilfe des BLAST-Programms der SGD-Datenbank gegen das Genom von *S. cerevisiae* durchgeführt. Dabei konnten neben den bekannten Glutaredoxinen aus Hefe Grx1-5 die beiden uncharakterisierten *offenen*

Leserahmen (OLR) YDL010w und YBR014c identifiziert werden. Sie kodieren putative Monothiolglutaredoxine, umfassen jeweils 231 bzw. 203 Aminosäuren und zeigen eine hohe Sequenzidentität von 45% zueinander. Die Identität zu anderen Glutaredoxinen liegt aber nur zwischen 14 und 21%. Im Folgenden werden die beiden Genprodukte als Grx6 (YDL010w) und Grx7 (YBR014c) bezeichnet. Wie für Monothiolglutaredoxine typisch, befindet sich im aktiven Zentrum nicht das klassische CXXC-, sondern ein modifiziertes CXXS-Motiv. Interessanterweise entsprechen beide Proteinsequenzen am N-Terminus den typischen Eigenschaften von Sortierungssignale, die von dem Vorhersageprogramm für subzelluläre Lokalisation TargetP (Emanuelson *et al.*, 2007) mit Wahrscheinlichkeiten von 0,938 für Grx6 und 0,875 für Grx7 bestätigt wurden. Es blieb nun zu klären in welche Kompartimente die beiden Proteine transportiert werden.

3.3.2 Grx6 und Grx7 sind im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert

Um die subzelluläre Lokalisation beider putativen Genprodukte experimentell zu untersuchen, konstruierten wir zwei Hefestämme, in denen jeweils einer der beiden OLRs um drei Hämagglutinin(HA)-Epitope erweitert wurde. Mit Hilfe eines Immunfluoreszenzexperimentes sollte dann die Lokalisation analysiert werden. Das folgende Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Anne Spang durchgeführt und war richtungsweisend für das weitere Vorgehen bei der Bearbeitung dieses Projektes.

Beide Stämme wurden bis zur frühen log-Phase in YPD angezogen. Nachdem die Zellen mit 5% Formaldehyd fixiert und mit Zymolyase sphäroplastiert waren, wurden sie mit α -HA-7-Antikörpern (Sigma) und α -GFP-Antikörpern (Torrey Pines) inkubiert. Cy3- und FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper wurden zur Visualisierung benutzt (Chiang und Schekman, 1991).

Abbildung 3.3.2 zeigt in den beiden linken Aufnahmen die auf Grx6 bzw. Grx7 zurückgehende rote Fluoreszenz. Daraus kann man direkt schließen, dass es sich bei Grx6 und Grx7 um tatsächlich exprimierte Proteine handelt. Beide Proteine erzeugen ein punktiertes Muster innerhalb der Zelle. Diese Immunfärbung entspricht nicht der für Mitochondrien, Nukleus oder perinukleäres endoplasmatisches Retikulum, sondern eher Golgi- oder Endosomenfärbung. Eine Überlagerung mit DAPI-gefärbter DNS war nicht sichtbar. Zur Identifikation des Kompartiments, in dem Grx6 und Grx7 lokalisiert sind, wurden zunächst neben Grx6-HA oder Grx7-HA die Markerproteine Sed5 oder Sec7 mit N-terminal fusioniertem GFP exprimiert. Anschließend wurden Doppelfärbungen

der Zellen mit HA- und GFP-Antikörpern vorgenommen. Sed5 ist ein Markerprotein des *cis*- und *Sec7* des *trans*-Golgi-Apparates. Die mittleren Aufnahmen in Abbildung 3.3.2 zeigen die Lokalisation von Sed5 (grün) und die rechten Aufnahmen die Überlagerung des *cis*-Golgi-Markers mit Grx6 bzw. Grx7. Die Fusion beider Signale wird als gelbes Licht detektiert. In blau mit DAPI gefärbt erscheinen DNS-enhaltende Organelle wie Nukleus und Mitochondrien. Mit *Sec7* konnte keine Überlagerung festgestellt werden (Aufnahmen nicht gezeigt). Die Lokalisation von Grx6 und Grx7 konnte somit auf den *cis*-Golgi-Apparat festgelegt werden.

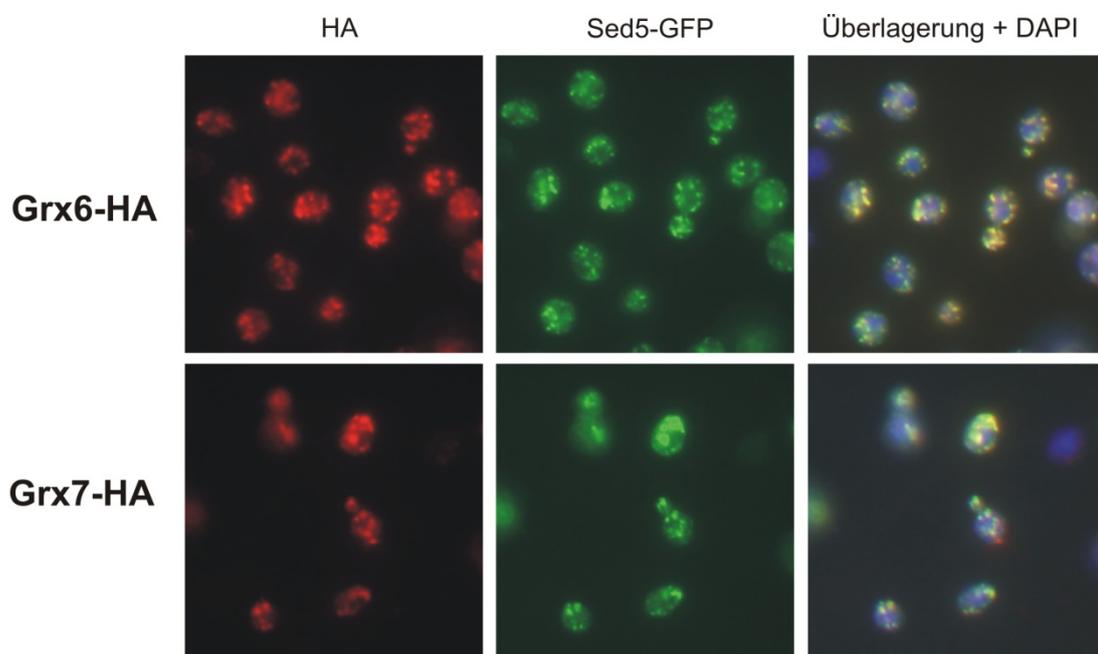


Abb. 3.3.2, Grx6 und Grx7 sind im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert (Anne Spang)

Sed5-GFP-Fusionsproteine wurden in Grx6-HA- und Grx7-HA-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden in YPD-Medium angezogen und für Immunfluoreszenzaufnahmen mit HA-Antikörpern aus Maus und GFP-Antikörpern aus Kaninchen inkubiert. Der Sekundäntikörper gegen Maus war an CY3 und der gegen Kaninchen an FITC gekoppelt. Fluoreszenzen der einzelnen Antikörper sind im linken und mittleren Teil der Abbildung gezeigt. Rechts ist die Überlagerung beider Signale dargestellt und die Färbung der DNS durch DAPI.

3.3.3 Grx7 exponiert seine lösliche Domäne zum Golgi-Lumen

Nachdem Grx6 und Grx7 im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert werden konnten, sollte die Topologie beider Proteine untersucht werden. Programme zur Vorhersage der Topologie von Proteinen gaben Hinweise auf eine Transmembrandomäne im N-terminalen Bereich von Grx6 und Grx7 (Abb. 3.3.3A). Um diese Vorhersage experimentell zu überprüfen und die daraus folgende Orientierung der Proteine in der Membran aufzuklären, wurden Golgi-enhaltende Mikrosomenfraktionen aus Grx7-HA-Zellen isoliert und gegen das HA-Epitop immundekoriert. Das folgende Experiment konnte nicht mit Grx6-HA-Mikrosomen durchgeführt werden, da Grx6-HA im Western Blot nicht mit diesen Antikörpern detektiert werden konnte. Grx7-HA-Mikrosomen wurden entweder direkt mit Proteinase K behandelt oder mit 0,2% Triton X-100 (TX) für 30 min auf Eis vorinkubiert und dann mit Proteinase K behandelt und in Probenpuffer aufgenommen. Als Kontrollen dienten Wildtypmikrosomen und Grx7-HA-Mikrosomen, die ohne weitere Behandlung in Probenpuffer aufgenommen und aufgetragen wurden. Desweiteren wurden Grx7-HA-Mikrosomen mit ungepuffertem 0,1 M Natriumcarbonat für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die lösliche von der Membranfraktion durch Zentrifugation getrennt. Die Proteine der löslichen Fraktion wurden mit TCA gefällt und wie die Membranfraktion in Laemmlipuffer aufgenommen. Die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immundekoriert.

Die Behandlung der mikrosomalen Fraktion mit Proteinase K führte nicht zum Abbau von Grx7-HA. Es konnte eine Proteinbande wie in der unbehandelten Probe nachgewiesen werden (3.3.3B). Dies ist aber nicht auf eine grundsätzliche Proteaseresistenz des Proteins zurückzuführen, da Proteasebehandlung nach Lyse der Membranen durch Triton X-100 zum Abbau des Proteins führt. Nach Carbonatextraktion befand sich Grx7-HA in der Membranfraktion, wie es für membranständige Proteine typisch ist. Zur Kontrolle wurde dieselbe Nitrozellulosemembran mit Antikörpern gegen Erp1, Ero1 und Pdi1 dekoriert. Das integrale Membranprotein Erp1 zeigte in diesem Experiment das gleiche Verhalten wie Grx7-HA. Pdi1 befindet sich in der löslichen Fraktion und das membranassoziierte Ero1 ist in beiden Fraktionen zu finden. Dies bestätigt, dass es sich bei Grx7 ebenfalls um ein integrales Membranprotein handelt, das die lösliche Domäne zum Golgi-Lumen exponiert, da Grx7-HA in intakten Mikrosomen Protease-resistent ist.

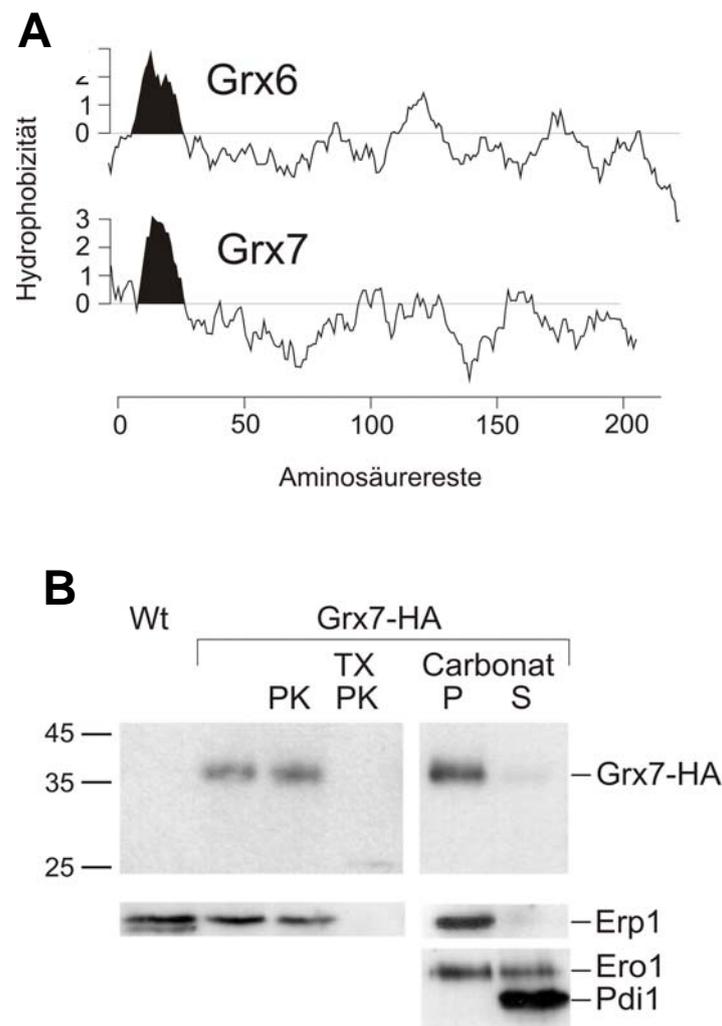


Abb. 3.3.3, Grx7 ist ein integrales Membranprotein und exponiert seine lösliche Domäne zum Golgilumen

A, Hydrophobizitätsprofile von Grx6 und Grx7 wurden mit Hilfe der DNAMAN (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) Software erstellt. N-terminale hydrophobe Bereiche sind schwarz gekennzeichnet.

B, Mikrosomen wurden aus Wildtyp (Wt)- und Grx7-HA-Zellen isoliert. 100 µg der Fraktionen wurden in An- oder Abwesenheit von Proteinase K (PK) und Triton-X100 (TX) 30 min auf Eis inkubiert.

Für die Carbonatextraktion wurden die Mikrosomen in ungepuffertem 0,1 M Na₂CO₃ (Carbonat) 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation wurde dann die Membranfraktion (P) von der löslichen Fraktion (S) getrennt. Proteine im Überstand (S) wurden mit 12% TCA gefällt. Alle Proben wurden in reduzierendem Laemmli-Puffer aufgenommen und mit SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert.

3.3.4 Grx6 und Grx7 werden in Mikrosomen importiert

Zur Unterstützung dieses Befundes sollte auch der Import von Grx6 und Grx7 in Mikrosomen untersucht werden. Dafür wurde radioaktiv markiertes Grx6 und Grx7 in Kaninchenretikulozytenlysat synthetisiert und Mikrosomen wurden aus Wildtypzellen isoliert. Mikrosomen, die nicht über einen Saccharosegradienten aufgereinigt wurden, enthalten normalerweise noch Mitochondrien. Um zu unterscheiden, in welches Kompartiment Grx6 und Grx7 importiert werden, wurden deshalb die Bedingungen für den Import variiert wie im Folgenden beschrieben.

Radioaktiv markiertes Grx6 bzw. Grx7 wurde mit der Mikrosomenfraktion 20 min bei 30°C inkubiert. Zu den Reaktionen wurden 2 mM ATP und 2 mM NADH zum Aufbau oder 10 µM Valinomycin zur Zerstörung des Membranpotentials zugegeben. Anschließend wurden sie mit Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert, um nicht-importiertes Protein zu verdauen. Die Proben wurden mit SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie analysiert.

In Abbildung 3.3.4A ist der Import von Grx6 und Grx7 in Abhängigkeit von ATP und dem Membranpotential ψ dargestellt. Man kann beim Import beider Proteine die Abhängigkeit von ATP feststellen. Unter Anwesenheit von ATP findet der Import relativ effizient statt (Spuren 1 und 2), während er ohne ATP fast vollständig inhibiert ist (Spuren 3 und 4). Das Membranpotential dagegen scheint den Import nicht zu beeinflussen. Unabhängig von der Zugabe von Valinomycin (Spuren 2 und 4) findet der Import mit gleicher Effizienz statt wie bei NADH-Zugabe (Spuren 1 und 3). Dies spricht nicht für den Import von Grx6 und Grx7 in Mitochondrien, da Proteine, die ATP-abhängig importiert werden, auch eines intakten Membranpotentials bedürfen. Anders ist es beim Import ins endoplasmatische Retikulum (ER). Hier reicht die Verfügbarkeit von ATP für den Import von Vorläuferproteinen aus. Ein Membranpotential ist nicht erforderlich.

In einem weiteren Experiment wurden Grx7 und Su9-DHFR, ein mitochondriales Matrixprotein, in mikrosomale oder mitochondriale Fraktionen importiert. Die Mitochondrien wurden zusätzlich über einen Saccharosegradienten gereinigt, um mikrosomale Kontamination auszuschließen. Während man keinen Import von Grx7 in Mitochondrien beobachten kann, wird Su9-DHFR dort relativ effizient importiert (Abb. 3.3.4B). Dessen Import in Mikrosomen ist allerdings deutlich schwächer als in Mitochondrien. Im Gegensatz dazu wird Grx7 in die mikrosomale Fraktion importiert.

Vermutlich werden Grx6 und Grx7 nach oder während ihrer Synthese im Zytosol ins ER importiert und so in den sekretorischen Transportweg eingeschleust. Über das ER können sie dann zum Golgi-Apparat weitertransportiert werden.

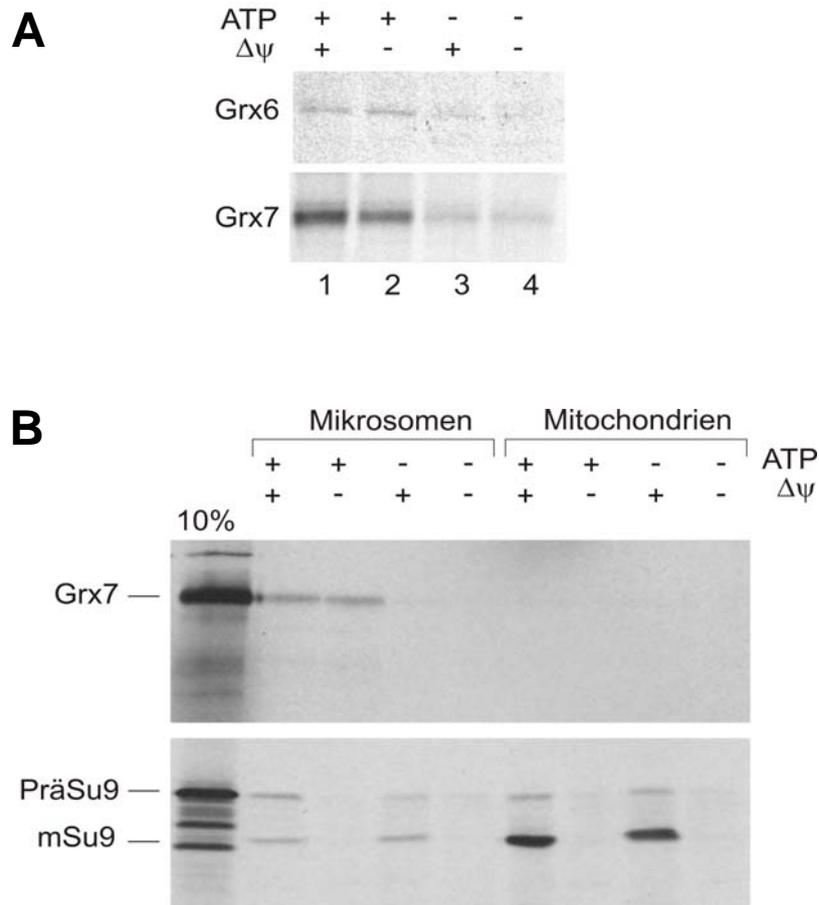


Abb. 3.3.4, Grx6 und Grx7 werden in Mikrosomen aber nicht in Mitochondrien importiert

A, Radioaktiv markiertes Grx6 und Grx7 wurde für 20 min bei 30°C in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP (Spuren 1 und 2), 2 mM NADH (Spuren 1 und 3) und 10 μ M Valinomycin (Spuren 2 und 4) mit isolierten Mikrosomen inkubiert. Durch Zugabe von Proteinase K wurde nicht-importiertes Material verdaut. Die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und autoradiographiert.

B, Grx7 und Su9-DHFR wurden wie oben beschrieben mit isolierten Mikrosomen oder Mitochondrien inkubiert. PräSu9 ist das Vorläuferprotein, das einer proteolytischen Prozessierung in der Matrix unterzogen und zu mSu9 umgesetzt wird.

3.3.5 Grx6 und Grx7 zeigen Glutaredoxinaktivität *in vitro*

Die Sequenzen von Grx6 und Grx7 weisen hohe Homologie zu bereits charakterisierten Glutaredoxinen auf (Vergl. 3.3.1). Es stellte sich daher die Frage, ob

die Proteine auch Glutaredoxinaktivität *in vitro* zeigen. Ein *in vitro*-Assay wurde entwickelt, der es ermöglicht, Glutaredoxinaktivität nachzuweisen (Holmgren und Aslund 1995). Der sogenannte HEDS(2-Hydroxyethyl-disulfid)-Assay weist die Fähigkeit eines Enzyms nach, gemischte Disulfide zwischen Glutathion und einer β -Mercaptoethanoleinheit des HEDS aufzulösen, er konnte aber bisher nur für Dithiolglutaredoxine erfolgreich angewendet werden. Bisher beschriebene Monothiolglutaredoxine zeigten keine Aktivität *in vitro* (Tamarit *et al.*, 2003, Deponte *et al.*, 2005). Obwohl es sich sowohl bei Grx6 als auch bei Grx7 um Monothiolglutaredoxine handelt, versuchten wir ihre Glutaredoxinaktivität mit diesem Assay nachzuweisen. In Abbildung 3.3.5A ist das Prinzip des Assays dargestellt. 2-Hydroxyethyl-disulfid (oxidiertes β -Mercaptoethanol) wird durch ein aktives Glutaredoxin unter Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH) reduziert. Dabei entsteht β -Mercaptoethanol und oxidiertes Glutathion (GSSG). Glutathion-Reduktase ist dann wiederum in der Lage, das entstandene GSSG unter NADPH-Verbrauch zu reduzieren. Der Verbrauch von NADPH kann photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm überwacht werden.

Für diesen Assay wurden N-terminal trunke Sequenzen ab Basenpaar 100 von Grx6 und Grx7 in den *E. coli*-Expressionsvektor pQE30 kloniert. Außerdem wurde eine Grx6-Mutante konstruiert, in der der Cysteinrest 136 im CXXS-Motiv gegen einen Serinrest ausgetauscht wurde. Alle drei Konstrukte wurden in *E. coli* mit N-terminalem His-Epitop ohne die Transmembrandomäne exprimiert und über eine NiNTA-Matrix aufgereinigt. Die Proteine wurden im HEDS-Assay mit einer Endkonzentration von 52 nM eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das Dithiolglutaredoxin PfGrx aus *Plasmodium falciparum*, dessen Aktivität im HEDS-Assay bereits nachgewiesen wurde (Rahlfs *et al.*, 2001).

Abbildung 3.3.5B zeigt das Ergebnis des HEDS-Assays. In der Graphik ist die spezifische Aktivität aller Glutaredoxine im Assay aufgetragen. Die beiden linken Säulen repräsentieren die Hintergrundaktivitäten, d.h. den NADPH-Verbrauch ohne Zugabe der Substrate HEDS oder GSH. Da eine gewisse Hintergrundreaktion messbar war, wurden alle weiteren Proben unter Verwendung einer Referenzküvette im Zweistrahlphotometer gemessen. Die Positivkontrolle PfGrx zeigte in unseren Messungen eine spezifische Aktivität von 0,21 U/nmol Enzym. Die spezifische Aktivität von Grx6 war mit 0,18 U/nmol der von PfGrx sehr ähnlich, wogegen Grx7 ungefähr zweieinhalb mal aktiver ist (0,51 U/nmol). Als Negativkontrolle diente die

Grx6^{C136S}-Mutante, die keinerlei Aktivität im Assay zeigte. Desweiteren konnte die Geschwindigkeit der Substratumsetzung in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Enzyms am Beispiel von Grx7 (Abb.3.3.5C) beobachtet werden. Für Grx7 konnte aus diesen Daten die spezifische Aktivität bestimmt werden (Abb.3.3.5D).

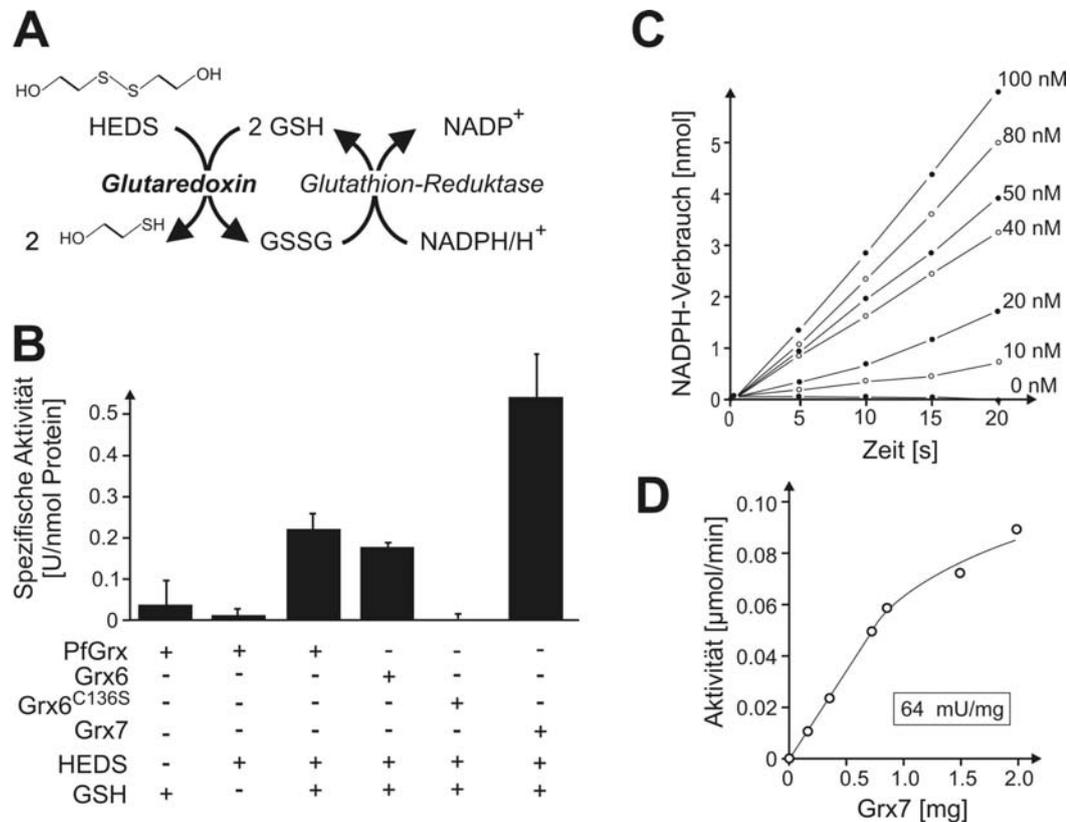


Abb. 3.3.5, Grx6 und Grx7 zeigen Glutaredoxinaktivität im HEDS-Assay

A, Schematische Darstellung des HEDS-Assays

B, Rekombinantes PfGrx, Grx6, Grx6^{C136S} und Grx7 wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Ihre Aktivität wurde bei 340 nm photospektrometrisch in einem gekoppelten Enzymassay bestimmt. Alle Proteine lagen während der Messungen in einer Konzentration von 52 nM vor. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde die NADPH-Oxidation in Abwesenheit von HEDS oder GSH mit PfGrx gemessen. Alle folgenden Messungen wurden in einem Zweistrahlphotometer unter Verwendung einer Referenzküvette durchgeführt.

C, Der NADPH-Verbrauch über die Dauer der Reaktion wurde in Abhängigkeit von der Grx7-Konzentration bestimmt.

D, Die Aktivität von Grx7 wurde gegen die Menge des eingesetzten Proteins aufgetragen und die spezifische Aktivität aus den Messwerten von 0 bis 1 mg Grx7 bestimmt.

Der Aktivitätsnachweis von Grx6 und Grx7 im HEDS-Assay war unerwartet, da für bisher charakterisierte Monothiolglutaredoxine keine Aktivität gefunden worden

war. Aus dem Ergebnis kann man schließen, dass Grx6 und Grx7 fähig sind unter Verbrauch von GSH oxidierte Substrate zu reduzieren. Es handelt sich hier offensichtlich um neuartige Monothiolglutaredoxine, die andere Eigenschaften als Grx3, Grx4 und Grx5 besitzen.

3.3.6 Grx6 kompensiert oxidativen Stress

Da alle bisher charakterisierten Glutaredoxine eine entscheidende Rolle bei Redoxprozessen in der Zelle spielen, sollte überprüft werden, ob Grx6 ebenfalls in solche Reaktionen involviert ist. Dazu wurde eine Grx6-Mutante konstruiert. Zur Herstellung der $\Delta grx6$ -Mutante wurden der gesamte kodierende Bereich des Gens durch die *HIS3*-Kassette ersetzt. Anschließend sollte das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter oxidativen Bedingungen beobachtet werden.

Dafür wurde die $\Delta grx6$ -Mutante neben dem korrespondierenden Wildtyp auf Glukose-haltigem Medium kultiviert. Die Über-Nacht-Kulturen wurden am Morgen verdünnt, und die Zellen wurden weiter bis zu einer OD_{600} von 0,6 herangezogen. Anschließend wurden die Kulturen auf eine OD_{600} von 0,01 eingestellt und 100 μ l wurden auf YPD-Platten ausplattiert. In der Mitte der Platten wurde ein mit Diamid oder H_2O_2 getränktes Filterpapier platziert. Diese Platten wurden dann für zwei Tage bei 30°C inkubiert und die Hofgröße um das Filterpapier herum wurde dokumentiert.

Außerdem wurde ein Tüpfeltest mit den beiden Hefestämmen durchgeführt. Dafür wurden sie wie oben beschrieben in einer Übernachtskultur angezogen, morgens verdünnt und bis zur mittleren log-Phase weiter kultiviert. Dann wurden die Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 mit Wasser eingestellt und von dieser Suspension wurden vier fortlaufende 1:10-Verdünnungen angefertigt. Diese Verdünnungen wurden tropfenweise auf YPD-Platten mit oder ohne 5 mM H_2O_2 aufgetragen, um das Wachstum der Zellen genauer beurteilen zu können. Im Vergleich mit dem Wildtyp wies die $\Delta grx6$ -Mutante einen schwachen Phänotyp auf (Abb. 3.3.6A). Die Sensitivität gegenüber H_2O_2 und Diamid ist ein wenig verstärkt. Ein ähnliches Ergebnis lieferte der Tüpfeltest (Abb. 3.3.6B). Beide Stämme wuchsen auf YPD. Auf YPD-Platten, die zusätzlich 5 mM H_2O_2 enthalten, ist zwar das Wachstum des Wildtyps retardiert, die $\Delta grx6$ -Mutante ist aber noch stärker betroffen. Daraus kann man schließen, dass Grx6 eine Rolle bei der Kompensation von oxidativem Stress spielt.

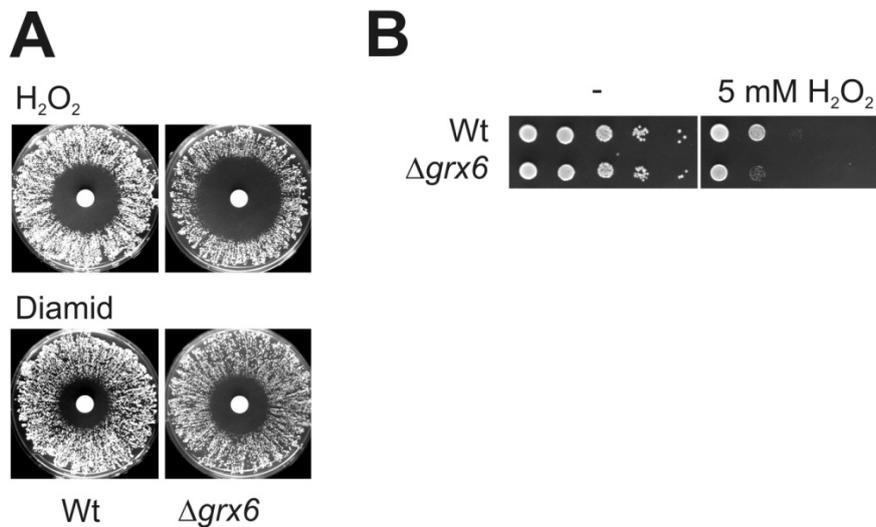


Abb. 3.3.6, Grx6 erhöht die Toleranz gegenüber oxidativem Stress

A, $\Delta grx6$ und der korrespondierende Wildtyp wurden bis zur log-Phase in YPD angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,01 verdünnt. Jeweils 100 μ l wurden auf YPD ausplattiert. Ein Filterpapier wurde in der Mitte des Zellrasens platziert. Das Filterpapier wurde mit 10 μ l 0,5 M Diamid oder 9,8 M H₂O₂ getränkt. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

B, Die beiden Stämme wurden wie oben beschrieben in YPD angezogen und auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Die Kulturen wurde vier weitere Male jeweils 1:10 verdünnt und tropfenweise auf YPD-Platten mit oder ohne 5 mM H₂O₂ im Medium aufgetragen.

3.3.7 Grx7 hat keinen Einfluss auf die Pdi1-Aktivität

Ob Grx6 und Grx7 dennoch einen Einfluss auf die Faltung zu sekretierender Proteine haben, blieb ungeklärt. Daher sollte untersucht werden, ob die Deletion von *GRX6* und *GRX7* möglicherweise die Expression von Pdi1 oder Ero1 über die *unfolded proteine response* induziert.

Um die endogenen Level von Pdi1 und Ero1 zu überprüfen, wurden Mikrosomen aus Wildtyp- und $\Delta grx6\Delta grx7$ -Zellen isoliert. Die Mikrosomenfraktion enthält sowohl ER als auch Golgi-Apparat und geringe Mengen Mitochondrien (vergl. Abb. 3.3.4B). Die Mikrosomenfraktionen beider Stämme wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen Ero1, Pdi1 und das mitochondriale Hep1 dekoriert.

Abbildung 3.3.7A zeigt die endogenen Level von Ero1, Pdi1 und Hep1. Es konnte kein Unterschied in der Ero1- oder Pdi1-Expression abhängig von der *GRX6*- und *GRX7*-Deletion festgestellt werden. Hep1 dient hier als Ladekontrolle und ist in Wildtyp- und $\Delta grx6\Delta grx7$ -Mikrosomen gleich stark detektierbar.

Desweiteren sollte in einem *in vitro*-Assay der Einfluss von Grx7 auf die Aktivität

von Pdi1 kontrolliert werden. Da Pdi1 ein lösliches Protein im sekretorischen Transportweg ist, gelangt es durch den vesikulären Transport von Proteinen aus dem ER in den Golgi-Apparat. Pdi1 ist aber nicht zur Sekretion bestimmt und trägt daher ein C-terminales Retentionssignal (HDEL), das seine Sekretion durch den Rücktransport ins ER verhindert (Pelham *et al.*, 1989). Dennoch könnte Pdi1 auf diesem Wege in Kontakt mit Grx6 und Grx7 kommen.

Der Ribonuklease-Rückfaltungsassay ist eine anerkannte Methode Pdi1-Aktivität nachzuweisen (Frickel *et al.*, 2004). Pdi1 besitzt neben seiner Oxidasefunktion auch die Fähigkeit, bestehende Disulfidbrücken zu isomerisieren (Laboissiere *et al.*, 1995). Diese Funktion ist entscheidend für den RNase-Rückfaltungsassay. Native RNase ist in der Lage zyklisches Cytidinmonophosphat (cCMP) zu hydrolysieren. Dies kann photospektrometrisch detektiert werden. Im Assay wird aber fehlerhaft gefaltete RNase eingesetzt, die sich durch zufällig gebildete Disulfidbrücken auszeichnet. Dadurch wird die RNase in ihrer Funktion gestört. Aktives Pdi1 soll nun die Rückfaltung der RNase katalysieren und somit zu einer Zunahme der RNase-Aktivität führen.

Zunächst wurde *PDII* aus *S. cerevisiae* in den *E. coli*-Expressionsvektor pQE30 kloniert, ebenso wie *GRX7* (vergl. Kapitel 3.3.5) in *E. coli* exprimiert und über eine Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. RNase aus Rinderpankreas wurde nach vollständiger Reduktion willkürlich oxidiert und zusammen mit Pdi1 und gegebenenfalls Grx7 eingesetzt. 4,5 mM cCMP wurde in 100 mM TRIS pH 8,0, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG und 1 mM EDTA hydrolysiert und bei 296 nm Wellenlänge detektiert.

In Abbildung 3.3.7B wird die RNase-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen graphisch dargestellt. Die Hintergrundaktivität der willkürlich oxidierten RNase wurde gemessen und gleich dem Wert 1 gesetzt. Anschließende Messungen wurden in Relation zu der Hintergrundaktivität gesetzt und die x-fache Stimulation der Aktivität wurde daraus berechnet. Zugabe von Grx7 bewirkte im Gegensatz zur Zugabe von Pdi1 zum Ansatz keine Steigerung der cCMP-Hydrolyse. Die Zugabe von Pdi1 dagegen erhöht die Aktivität ungefähr um das 6-fache. Werden Pdi1, Grx7 und RNase in einem Ansatz kombiniert, kommt es wiederum zu keiner maßgeblichen Stimulation der RNase im Vergleich zur Probe die ausschließlich RNase und Pdi1 enthält.

Daraus kann man schließen, dass Grx7 keine Rolle, weder direkt noch indirekt, bei der Pdi1-abhängigen Proteinfaltung im sekretorischen Transportweg spielt.

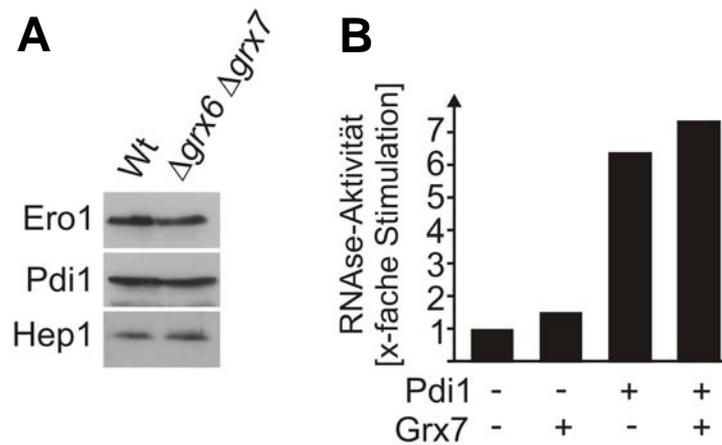


Abb. 3.3.7, Grx7 hat keinen Einfluss auf die endogenen Level von Pdi1 und Ero1 oder die Pdi1-Aktivität

A, Aus Wildtyp- (Wt) und $\Delta grx6 \Delta grx7$ -Zellen wurden Mikrosomen isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und gegen Ero1, Pdi1 und mitochondriales Hep1 (Ladekontrolle) immundekoriert.

B, Rekombinantes Grx7 und Pdi1 wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. cCMP und denaturierte RNase wurden in An- oder Abwesenheit von Grx7 und Pdi1 inkubiert und die Hydrolyse von cCMP wurde bei 296 nm photospektrometrisch gemessen.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Mia40 und Erv1 im Importprozess löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven

In der vorliegenden Arbeit wurde der Import löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven untersucht. Da diese Proteine keine typischen N-terminalen Präsequenzen besitzen und ihr Import weder vom Membranpotential, noch von der Hydrolyse von ATP oder von der Bindung von Kofaktoren abhängt, muss er auf einem bislang unbekanntem Importprinzip basieren. Vor kurzem wurde eine essentielle Komponente des Intermembranraums namens Mia40 identifiziert und ihr Einfluss auf die Biogenese löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven gezeigt (Naoé *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005, Chacinska *et al.*, 2004).

4.1.1 Die Mia40-Substrat-Interaktion

Um die Translokation von Klasse II-Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven und ihre Interaktion mit Mia40 genauer zu untersuchen, wurden Cox17 und Tim13 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt bzw. *in vitro* synthetisiert. Diese Proteine wurden daraufhin als Substrate verwendet, um den Import in isolierte Mitochondrien zu beobachten. In Anlehnung an vorangegangene Experimente, die eine Interaktion zwischen Tim9 und Mia40 über Disulfidbrücken nahelegten (Chacinska *et al.*, 2004), wurde hier auch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Mia40 und frisch importiertem Cox17 nachgewiesen. In Übereinstimmung konnte kein gemischtes Disulfid zwischen Mia40 und einer Tim13-Mutante nachgewiesen werden, in der alle Cysteinreste zu Serinresten mutiert worden waren (Terziyska *et al.*, 2005). Dies zeigt zunächst, dass die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken grundlegend für Mia40-Substrate zu sein scheint.

Intermembranraumproteine der Klasse II folgen einem unidirektionalen Transport über die Außenmembran, für den ihre stabile Faltung im Intermembranraum entscheidend ist (Lutz *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1991; Diekert *et al.*, 2001). Bisher wurde kontrovers diskutiert, wodurch eine Proteinfaltung selektiv im

Intermembranraum gewährleistet wird (Allen *et al.*, 2003; Lutz *et al.*, 2003; Koehler, 2004; Lu *et al.*, 2004a/b). Bekannt ist, dass Apo-Cytochrom *c* durch die die Interaktion mit der Cytochrom *c*-Hämlyase und der daraus resultierenden Übertragung der Häm-Gruppe in die stabil gefaltete Holoform überführt wird (Nicholson *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1991; Diekert *et al.*, 2001). Somit ist die stabilisierende Wirkung des Häm-Kofaktors für den Netto-Transport von Cytochrom *c* maßgeblich. Cytochrom *c* und die Proteine mit konservierten Cysteinmotiven wie z.B. Tim13 unterscheiden sich allerdings im Bezug auf ihren Importmechanismus deutlich (Kurz *et al.*, 1999). Sod1 ist ein anderes Intermembranraumprotein, für das die Bindung von Kofaktoren (Cu^{2+} , Zn^{2+}) wichtig ist. Darüberhinaus bildet Sod1 eine intermolekulare Disulfidbrücke aus, die den Verbleib im Intermembranraum gewährleistet (Field *et al.*, 2003).

4.1.2 Die stabile Faltung beruht auf der Bildung von Disulfidbrücken

In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, welche Faktoren bei der Faltung von Tim13 und Cox17 eine Rolle spielen, um zu klären, ob die Ausbildung von Disulfidbrücken oder die Komplexierung von Metallionen die treibende Kraft für die Translokation in den Intermembranraum ist. Da durch Zugabe von DTT sowohl der Import von Tim13 als auch von Cox17 beeinträchtigt wurde, scheint die Disulfidbrückenbildung ein essentieller Schritt während ihres Importprozesses zu sein. Allerdings inhibiert auch der Einsatz von Chelatoren den Tim13-Import und kann durch Zn^{2+} -Zugabe wieder regeneriert werden. Darüberhinaus unterstützt die Zugabe von Zn^{2+} -Ionen zu der Importreaktion die Bildung eines Mia40-Substrat-Intermediates (Lutz *et al.*, 2003; Chacinska *et al.*, 2004). Mit denen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnten diese Befunde allerdings nicht bestätigt werden, da zumindest der Import von Cox17 von der Anwesenheit von Chelatoren, Cu^{2+} -Ionen oder dem Kofaktor FAD unbeeinträchtigt ist. Möglicherweise sind *in vivo* Metallionen in Schritte dieses Importweges involviert, die unter unseren *in vitro*-Bedingungen umgangen werden können.

4.1.3 Die Sulphydryloxidaseaktivität von Erv1 ist essentiell für die Biogenese von Intermembranraumproteinen

Die Relevanz von Disulfidbrücken für den Import von Tim13 und Cox17 deutete

auf eine Sulfhydryloxidation im mitochondrialen Intermembranraum hin. Tatsächlich ist dort die Sulfhydryloxidase Erv1 lokalisiert, für die bis dahin noch keine Substrate bekannt waren (Becher *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hefestamm generiert, der das essentielle Protein Erv1 unter dem regulierbaren *GALI0*-Promotor exprimiert. Die Depletion von Erv1 führte dabei zum spezifischen Verlust von Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven in Mitochondrien. Zumindest Cox17 bleibt dabei stabil, akkumuliert aber unnatürlicherweise im Zytosol. Somit wurde der direkte Einfluss von Erv1 auf den Import bestätigt. Ob die Funktion von Erv1 in diesem Prozess tatsächlich auf seiner Sulfhydryloxidaseaktivität beruhte, wurde durch verschiedene Experimente nachgewiesen. Zum einen zeigten Erv1-depletierte Hefen eine erhöhte DTT-Sensitivität *in vivo*. Zum anderen ergab sich sowohl für die DTT- als auch für die GSH-Titration des Imports von Tim13 und Cox17 eine deutliche Erv1-Abhängigkeit. Andere Sulfhydryloxidasen wie Erv2, Ero1 und DsbB interagieren über Partnerproteine wie Pdi1 und DsbA mit einem breiten Substratspektrum. Vermutlich nutzt auch Erv1 einen Vermittler für sein Oxidationspotential. Die Ergebnisse zur Importintermediatbildung durch Disulfidbrücken legten nahe, dass es sich bei Mia40 um das erste identifizierte Substrat von Erv1 handelt.

4.1.4 Die Oxidation von Mia40 durch Erv1 ist notwendig für den Import

Wie bereits erwähnt war ein grundlegendes Experiment zur Charakterisierung von Mia40 der Nachweis eines Intermediates mit Tim9 bzw. Tim13 (Chacinska *et al.*, 2004, Terziyska *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von Importexperimenten mit rekombinantem Cox17 weiterführend gezeigt werden, dass die Bildung dieses Intermediates von Erv1 abhängt. In Erv1-depletierten Mitochondrien war die Bildung beeinträchtigt.

Da die C-terminale Domäne von Mia40 sechs konservierte Cysteinreste beinhaltet, kann das Protein in reduzierter oder oxidiertem Konformation vorliegen. Zwei Mia40-Konformere sind im SDS-Gel detektierbar, die mit der Importkompetenz der Mitochondrien korrelieren. Nur in Mitochondrien, in denen Mia40 oxidiert ist, findet effizienter Import von Tim13 und Cox17 statt. Interessanterweise überführt der Import von Cox17 oxidiertes Mia40 dabei in die reduzierte Form. In Erv1-depletierten Mitochondrien ist das Gleichgewicht der Mia40-Konformere zur reduzierten Form verschoben. Folglich beruht die Oxidation von Mia40 auf der Aktivität von Erv1 und

importkompetentes Mia40 entspricht der durch Erv1 oxidierten Form.

4.1.5 Der Mia40-Erv1-Zyklus

Die beiden essentiellen Proteine Mia40 und Erv1 kooperieren im Importprozess löslicher Intermembranraumproteine mit konservierten Cysteinmotiven. Oxidiertes Mia40 interagiert unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Cysteinresten mit neu importierten Polypeptiden und bildet so ein gemischtes Disulfid. Die Auflösung des Intermediates überführt Mia40 in die reduzierte, inaktive Konformation. Anschließend wird Mia40 Erv1-abhängig oxidiert. Dies geschieht über eine direkte Interaktion von Erv1 mit Mia40 (Mesecke *et al.*, 2005). Anhand dieser Ergebnisse wurde folgendes Modell für den Importmechanismus postuliert. Neu synthetisierte Intermembranraumproteine passieren die mitochondriale Außenmembran über den TOM-Komplex in reduzierter ungefalteter Konformation (Lu *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2003). Im Intermembranraum interagieren diese Proteine dann mit oxidiertem Mia40. Durch die Umlagerung von Disulfidbrücken kommt es zur Ausbildung eines kovalent verbundenen Importintermediates zwischen Mia40 und seinem Substrat. Durch einen weiteren Isomerisierungsschritt kommt es zur erneuten Umlagerung von Disulfidbrücken. Dabei wird das Substrat von Mia40 in oxidiert und somit gefalteter Form freigesetzt, während Mia40 in reduzierter Form zurückbleibt. An dieser Stelle wird nun die Sulphydryloxidase Erv1 benötigt, um reduziertes Mia40 zu reoxidieren. Dieser Schritt ist notwendig, um Mia40 zu reaktivieren und den weiteren Import zu ermöglichen. Dieses Modell ist in Übereinstimmung mit dem *folding-trap*-Mechanismus, der bereits zuvor für Klasse II-Proteine des Intermembranraums postuliert wurde. Dabei ist die stabile Faltung der Proteine für ihr Verbleiben im Intermembranraum notwendig (Lu *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2003). Die Interaktion mit Mia40 führt zur Einführung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten, stabilisiert somit die Tertiärstruktur und verhindert die Freisetzung des Substrates in das Zytosol.

Anhand der NMR-Struktur des TIM9-TIM10-Komplexes wurde bereits vor der Entdeckung der oxidativen Proteinfaltung im Intermembranraum gezeigt, dass die kleinen Tim-Proteine im funktionellen Komplex oxidiert vorliegen (Lu *et al.*, 2004). Neue Arbeiten an der Rekonstitution dieses Mechanismus konnten die Oxidation von Mia40 durch Erv1 *in vitro* nachweisen, wobei keine weiteren Faktoren für diesen Schritt benötigt wurden (Grumbt *et al.*, 2007). In weiterer Übereinstimmung mit unserem

Modell wurde von Chacinska und Kollegen gezeigt, dass die Substrate von Mia40 nach ihrer Freisetzung in der oxidierten Konformation vorliegen (Müller *et al.*, 2007). Im Intermembranraum herrscht aufgrund der permeablen Porine die gleiche GSH-Konzentration wie im reduzierenden Zytosol. Da Proteinoxidation offensichtlich unabhängig von der Glutathionkonzentration auch im Intermembranraum stattfinden

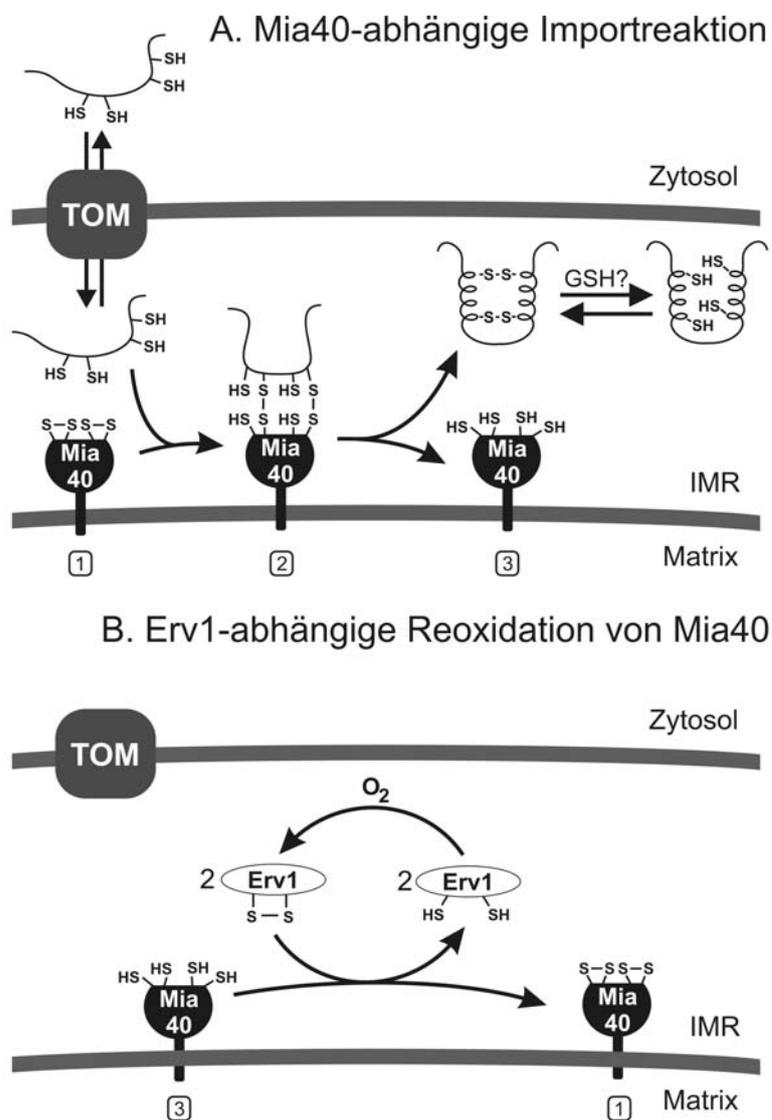


Abb. 4.1. Modell des Mia40-Erv1-abhängigen Imports

A, Stufe 1: Mia40 liegt in Mitochondrien in der oxidierten, aktiven Form vor und kann mit neu importierten reduzierten Substratproteinen interagieren. Stufe 2: Mia40 bildet intermolekulare Disulfidbrücken mit dem Substrat aus, was zum Zurückhalten des Substrats im Intermembranraum führt. Stufe 3: das Substrat wurde in oxidiert und gefalteter Konformation von Mia40 freigesetzt. Mia40 bleibt in reduzierter, inaktiver Form zurück.

B, Reduziertes Mia40 wird durch die Sulphydryloxidase Erv1 reoxidiert und so für den nächsten Importzyklus regeneriert.

kann, scheint im Zytosol nur das Fehlen einer Sulphydryloxidase die reduzierende Umgebung zu gewährleisten. Während früher der oxidierende oder reduzierende Charakter eines Kompartiments auf das vorliegende GSH/GSSG-Verhältnis zurückgeführt wurde, spricht die Entdeckung der oxidativen Proteinfaltung im Intermembranraum dafür, dass die enzymatischen Funktionen der Proteine eines Kompartiments seinen Charakter bestimmen. Das GSH/GSSG-Verhältnis könnte nach neueren Einschätzungen auch nur ein Resultat der metabolischen Prozesse sein (Chakravarthi *et al.*, 2006).

4.1.6 Die Rolle der Atmungskette im Importprozess der Intermembranraumproteine

Das vorgestellte Modell impliziert, dass die Importreaktion durch den Elektronenfluss vom neu importierten Substrat ausgehend über Mia40 und Erv1 auf einen weiteren Endakzeptor angetrieben wird. Da sich dieser Prozess im mitochondrialen Intermembranraum, also in der Nähe der Atmungskette abspielt, könnten die Elektronen über die Atmungskette auf elementaren Sauerstoff als Endakzeptor abgeführt werden.

Verschiedene Sulphydryloxidasen können Elektronen auf elementaren Sauerstoff übertragen. Erv1 reduziert elementaren Sauerstoff *in vitro* und Ero1 kann ebenfalls Elektronen in Abhängigkeit von FAD auf ihn übertragen. Bei diesen Reaktionen kommt es zur Bildung von Hydrogenperoxid (Lee *et al.*, 2000; Tu und Weissmann, 2002; Bihlmaier *et al.*, 2007), das schädigend auf die Zelle wirkt. Interessanterweise kann ALR, das menschliche Homolog von Erv1, Elektronen auf Cytochrom *c* in einer Reaktion transferieren, die wesentlich effizienter abläuft als der Transfer auf Sauerstoff (Farrell und Thorpe, 2005). Von Tokatlidis und Kollegen wurde ein analoger Mechanismus für Erv1 aus Hefe vorgeschlagen (Lu *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005). Mittlerweile wurde die Übertragung von Elektronen von Erv1 auf Cytochrom *c* *in vitro* nachgewiesen und auch *in vivo* konnte die Abhängigkeit des Mia40-Redoxzustands von Cytochrom *c* und der Cytochrom *c*-Oxidase gezeigt werden (Bihlmaier *et al.*, 2007; Dabir *et al.*, 2007). Die direkte Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff und damit verbundene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies während des Imports reduzierter Substrate über Mia40 kann somit vermieden werden.

4.1.7 Vergleich verschiedener Systeme oxidativer Proteinfaltung

Die durch Erv1 katalysierte Sulfhydryloxidation von Mia40 erinnert an Redoxprozesse im endoplasmatischen Retikulum oder im Periplasma der Bakterien. Da Mitochondrien evolutionär auf die Endosymbiose eines α -Proteobakteriums zurückzuführen sind, entspricht evolutionsgeschichtlich der periplasmatische Raum der Bakterien dem Intermembranraum der Mitochondrien. Im bakteriellen Periplasma ist ein relativ komplexes System oxidativer Proteinfaltung angesiedelt. Es besteht aus vier Hauptkomponenten namens DsbA, DsbB, DsbC und DsbD. DsbA ist ein lösliches Protein, das Disulfidbrücken in ein breites Substratspektrum einführen kann. DsbA selbst wird wiederum vom membranständigen DsbB oxidiert, das die aufgenommenen Elektronen über die Atmungskette abführen kann. Parallel arbeitet das DsbC/DsbD-System, durch das falsch gebildete Disulfidbrücken mit Hilfe von NADPH und Thioredoxin A isomerisiert werden können (Hiniker und Bardwell, 2004; Kadokura *et al.*, 2003). Ein weiterer gut untersuchter und im Detail verstandener Mechanismus ist im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen lokalisiert (vergl. Kapitel 1.2.2; Sevier und Kaiser, 2002). Hier werden Disulfidbrücken *de novo* von Ero1 und Erv2, einem Erv1-Homolog, gebildet und anschließend sequentiell auf Pdi1 und von dort auf neu importierte Substrate transferiert.

DsbA und DsbB bzw. Pdi1 und Ero1 weisen auf der Primärsequenzebene keine Homologie zu Mia40 oder Erv1 auf, ihre tertiäre Faltung und damit die Ausbildung einer 4-Helix-Struktur ist ihnen aber gemein. Außerdem folgt Erv1 wie alle bisher charakterisierten Mitglieder der ERV/ALR-Familie und die *de novo*-Sulfhydryloxidasen Ero1 und DsbB dem Prinzip, über Partnerproteine zu agieren. Dies ermöglicht die Interaktion mit einem breiteren Substratspektrum.

4.1.8 Substrate des Mia40-Erv1-abhängigen Importweges

Tatsächlich wurden bereits einige Proteine des Intermembranraums mit Disulfidbrücken beschrieben, wie z. B. das Rieske-Protein, Ccs1, Sod1, Sco1 und die kleinen Tim-Proteine. Für einige von ihnen und auch Cox17 und Cox19 wurde der Mia40-Erv1-abhängige Import in den Intermembranraum nachgewiesen. Kürzlich wurden weitere Substrate von Mia40 identifiziert. So konnte für zwei bisher uncharakterisierte Proteine mit CX₉C-Motiven, die Mic14 und Mic17 (*mitochondrial IMS cysteine motif protein of 14/17 kDa*) genannt wurden, und Mdm35, das bei der

Suche nach putativen Proteinen mit Einfluss auf die mitochondriale Morphologie identifiziert wurde, der Mia40-Erv1-abhängige Import nachgewiesen werden (Gabriel *et al.*, 2006; Dimmer *et al.*, 2002). Desweiteren wird auch der Import von Erv1 selbst durch Mia40 katalysiert. Der Einfluss von endogenem Erv1 auf diesen Prozess konnte aber nicht zufriedenstellend geklärt werden (Gabriel *et al.*, 2006; Terziyska *et al.*, 2007).

Bemerkenswerterweise gleicht das Muster der letzten beiden Cysteinpaare im C-Terminus von Mia40 dem einiger Substratproteine (vergl. Tabelle 1.1), die Bedeutung dieser Symmetrie konnte aber noch nicht aufgeklärt werden. Zunächst wurde diskutiert, ob die Interaktion über Disulfidbrücken zwischen Mia40 und seinen Substraten auf den identischen Cysteinmotiven basieren könnte. Mittlerweile ist aber bekannt, dass das CPC-Motiv von Mia40 durch Erv1 oxidiert wird (Grumbt *et al.*, 2007). Ob das CPC-Motiv wiederum direkt mit den Substraten interagiert oder ob die Substratoxidation von den Cysteinresten in den CX₉C-Motiven vermittelt wird, ist nicht klar. Dabei könnten Importexperimente mit Mia40-Mutanten hilfreich sein, bei denen der Abstand zwischen den Cysteinresten der CX₉C-Motive verkürzt oder vergrößert wurde.

4.2 Welche Funktion übernimmt Hot13 im Intermembranraum?

4.2.1 Hot13 hat keinen Einfluss auf die endogenen Mengen mitochondrialer Intermembranraumproteine

Um die Funktion des mitochondrialen Intermembranraumproteins Hot13 besser charakterisieren zu können, wurden $\Delta hot13$ -Mutanten in *S. cerevisiae* hergestellt und untersucht. So konnte nach Deletion von Hot13 keine Beeinträchtigung der endogenen Level von Erv1, Mia40, Tim13, Cox17 oder Sod1 beobachtet werden. Dabei überraschen vor allem die unveränderten Tim13-Level in der Deletionsmutante, da zuvor von einem Effekt auf den Import und die endogenen Mengen aller kleinen Tim-Proteine berichtet wurde (Curran *et al.*, 2004). Auch der beschriebene Importdefekt für die kleinen Tim-Proteine in $\Delta hot13$ -Mitochondrien konnte in dieser Arbeit mit *in vitro* translatiertem Tim13 nicht reproduziert werden. Ob es in unserer Mutante allerdings zur Assemblierung des TIM8-TIM13-Komplexes kommt, wurde nicht überprüft. Laut Koehler und Kollegen beeinträchtigt die Hot13-Deletion den Import der kleinen Tim-Proteine nur bedingt, die Assemblierung aber fast vollständig (Curran *et al.*, 2004). Möglicherweise gelangen die Proteine noch in den Intermembranraum, können aber

nicht mehr von Mia40 oxidiert werden, so dass ihre Assemblierung zu Komplexen weitgehend unterbunden ist.

In Importexperimenten mit dem ADP/ATP-Carrier konnte die Insertion des Carriers in die mitochondriale Innenmembran zunächst durch t-BOOH inhibiert und anschließend durch DTT vervollständigt werden. Außerdem wurde eine erhöhte Sensitivität der $\Delta hot13$ -Mutante gegenüber t-BOOH beobachtet. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Redoxregulation des TIM9-TIM10-Komplexes durch Hot13 vorgeschlagen (Curran *et al.*, 2004). Im Widerspruch dazu stehen allerdings die unveränderten endogenen Level vom ADP/ATP-Carrier in Hot13-depletierten Mitochondrien. Eine Veränderung des Redoxstatus der kleinen Tim-Proteine durch Hot13 wurde nicht nachgewiesen (Curran *et al.*, 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass ein bereits assemblierter TIM9-TIM10-Komplex, einmal oxidiert, nicht durch Zugabe von DTT reduziert werden kann. Und auch der Versuch, Zinkionen in den bereits assemblierten TIM9-TIM10-Komplex zu inkorporieren, schlug fehl, wodurch ein Wechsel zwischen verschiedenen Redoxkonformationen im assemblierten Komplex ausgeschlossen werden kann (Lu *et al.*, 2004b). Daher ist der Einfluss von DTT auf den Redoxzustand der kleinen Tim-Proteine im Komplex eher unwahrscheinlich, aber es könnte eine andere Komponente stromaufwärts in der mitochondrialen Biogenese betroffen sein.

4.2.2 Hot13 unterstützt die Oxidation von Mia40

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensitivität einer $\Delta hot13$ -Mutante gegenüber reduzierenden und oxidierenden Bedingungen überprüft, da zuvor eine erhöhte Empfindlichkeit der Mutante gegenüber dem Oxidationsmittel t-BOOH beobachtet wurde (Curran *et al.*, 2004). Wir konnten aber kein vermindertes Zellwachstum nach Zugabe von H_2O_2 , Diamid oder DTT feststellen. Dies macht eine direkte Reduktase- oder Oxidaseaktivität von Hot13 unwahrscheinlich. Dennoch stellten wir die Abhängigkeit des Mia40-Redoxzustandes von Hot13 fest. Mia40 wird in Abwesenheit von Hot13 bereits durch 7,5 mM GSH vollständig reduziert, während es in Wildtyp-Mitochondrien bis zu einer GSH-Konzentration von 22,5 mM größtenteils oxidiert vorliegt. Ein ähnliches Verhalten konnte in Erv1-depletierten Mitochondrien beobachtet werden, der Phänotyp war dort aber deutlich stärker ausgeprägt. So liegt Mia40 in Erv1-depletierten Mitochondrien bereits ohne Zugabe von Reduktionsmitteln zu 50% in der reduzierten Form vor, während in Mitochondrien der $\Delta hot13$ -Mutante Mia40 erst durch

Zugabe beträchtlicher GSH-Konzentrationen reduziert wird. Da auch in $\Delta hot13$ -Mitochondrien Mia40 teilweise oxidiert ist, ist es nicht verwunderlich, dass Hot13 nicht essentiell ist. Dennoch zeigt dieses Ergebnis entgegen den Erwartungen, dass Hot13 die Funktion von Erv1 während des Importprozesses vielmehr unterstützt als ihr entgegenwirkt. Nun muss man sich aber fragen, welcher Art die scheinbar oxidierende Funktion von Hot13 tatsächlich ist, da Hot13 selbst keine Oxidaseaktivität aufweist. Aktiviert es die Funktion von Erv1? Oder koordiniert es Metallionen, die Mia40 zuvor gebunden hatte und die seine Oxidation verhindern? Dazu wurde ein Experiment durchgeführt, in dem wiederum Wildtyp- und $\Delta hot13$ -Mitochondrien mit GSH in Gegenwart von EDTA und *o*-Phenanthrolin inkubiert wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Hot13 durch Zugabe von Chelatoren supprimiert werden kann. Das legt nahe, dass Hot13 Metallionen koordiniert. Tatsächlich zeigten Metallmessungen mit rekombinantem Hot13, dass Zinkionen von Hot13 im Verhältnis 0,8:1 gebunden werden können (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Die Rolle von Metallionen im Importprozess

Wie bei den meisten mitochondrialen Proteinen ist der erste Schritt im Importprozess von Tim13 und Cox17 die Überquerung der Außenmembran mit Hilfe des TOM-Komplexes (Lutz *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Proteinen mit N-terminalen oder internen Sortierungssignalen benötigen sie aber die Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes Tom20 und Tom70 nicht (Kurz *et al.*, 1999). Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, kommt es anschließend im Intermembranraum zur Interaktion mit dem Rezeptor Mia40, der durch Oxidation des Polypeptids für eine stabile Faltung sorgt. Allerdings gibt es Evidenz für die Bindung von Zinkionen durch Tim13 in Abhängigkeit von den Cysteinmotiven *in vitro* (Hofmann *et al.*, 2002; Sirrenberg *et al.*, 1998; Paschen *et al.*, 2000), und *in vivo* konnte die reduzierte Konformation nachgewiesen werden (Lutz *et al.*, 2003). Da sich in vorherigen Experimenten nur denaturiertes Protein als importkompetent erwies, nahm man an, dass sich die Faltung von Tim13 erst nach Erreichen des Intermembranraums einstellt (Lutz *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde aber zumindest für Cox17 gezeigt, dass es in Assoziation mit Metallionen die Außenmembran passieren und mit Mia40 interagieren kann. Dabei wird Mia40 in die reduzierte Konformation überführt. Interessanterweise würde das Redoxpotential der kleinen Tim-Proteine eine Oxidation ihrer Cysteinreste direkt nach der Synthese im Zytosol zulassen. Daher wurde vorgeschlagen, dass sie dort bereits

Zinkionen binden, um die für den Import notwendige reduzierte Konformation zu stabilisieren (Lu *et al.*, 2005). Der Porendurchmesser von Tom40 würde den Import von Zink-bindendem Tim13 erlauben und auch der ADP/ATP-Carrier und Tim23 passieren den TOM-Komplex in partiell gefalteter Konformation (Endres *et al.*, 1999). Proteine mit konservierten Cysteinmotiven könnten in Assoziation mit Metallionen in den Intermembranraum gelangen. Dort könnte durch Interaktion mit Mia40 nicht nur der Transfer von Disulfidbrücken auf das Substrat, sondern auch die Übertragung von Metallionen auf Mia40 stattfinden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Chelatoren in einer $\Delta hot13$ -Mutante den Effekt auf den Mia40-Redoxstatus komplementieren kann. Übereinstimmend ist eine mögliche Funktion von Hot13 die Koordination von Zink, das von Mia40 gebunden wird, wodurch eine effizientere Oxidation ermöglicht würde. Für rekombinantes Mia40 wurde bereits nachgewiesen, dass es spezifisch Zink- und Kupferionen binden kann (Terziyska *et al.*, 2005). Ob Mia40 allerdings *in vivo* Metallionen komplexiert solange es im reduzierten Zustand vorliegt, bleibt zu untersuchen. *In vivo* scheint Mia40

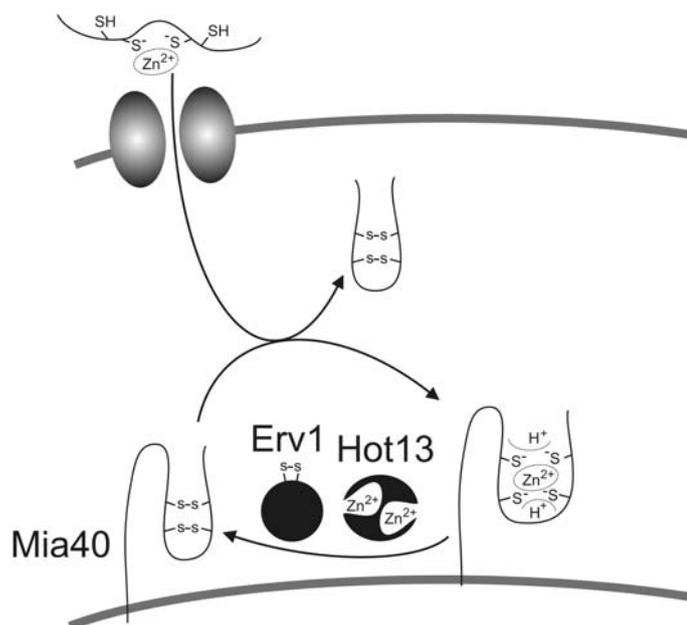


Abb.4.2. Modell der Regeneration von Mia40 durch Erv1 und Hot13

Durch den Import von reduzierten, Zink-bindenden Substratproteinen wird Mia40 in die reduzierte Konformation überführt. In reduzierter Form können die Cysteinreste von Mia40 das Zink aus dem Substrat koordinieren. Durch Hot13 kann das Zink anschließend gebunden und die Cysteinreste freigegeben werden. Nun kann Erv1 mit den freien Thiolgruppen interagieren und diese oxidieren.

vornehmlich in oxidiertem Zustand vorzuliegen. Durch die Modifikation der Sulfhydrylgruppen in Mia40 mit AMS in isolierten Mitochondrien konnte der Großteil in der oxidierten Konformation nachgewiesen werden. Ein geringer Teil lag aber in der reduzierten Form vor (Grumbt *et al.*, 2007)

Für Sod1, einem Kupfer- und Zink-bindenden Protein im Intermembranraum der Mitochondrien, wurde ebenfalls ein Kupferionen- und Disulfidbrückentransfer vorgeschlagen. In dem Fall ist der Transfer allerdings unidirektional (Field *et al.*, 2003). Holo-Sod1 koordiniert neben Kupfer noch ein Zinkion. Wie dieses in das Protein gelangt, ist nicht bekannt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bereits beim Eintritt in den Intermembranraum gebunden ist.

4.3 Glutaredoxine im sekretorischen Transportweg

Die Daten dieser Arbeit zum Mia40-Erv1-abhängigen Import von Intermembranraumproteinen legen nahe, dass Substrate nach der Interaktion mit Mia40 zunächst oxidiert freigesetzt werden. In anderen Arbeiten wurde endogenes Tim13 in reduzierter Konformation nachgewiesen (Lutz *et al.*, 2003, vergl. 4.2.3). Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch einen an die Mia40-Substrat-Interaktion anschließenden reduktiven Schritt erklärt werden. Zunächst schien Hot13 ein Kandidat zu sein, der oxidiertes Tim13 wieder reduzieren könnte. Nach der Überprüfung früherer Daten von Koehler und Kollegen konnte die Reduktasefunktion von Hot13 aber ausgeschlossen werden (vergl. Kapitel 4.2.2). Daher galt es zu überprüfen, ob andere Enzyme mit reduzierender Aktivität im Intermembranraum lokalisiert sind.

4.3.1 Die Entdeckung neuartiger Monothiolglutaredoxine

Die Glutaredoxin-Familie umfasst eine größere Gruppe verwandter Enzyme, die ubiquitär in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vorkommen. Es wurden sogar, wie in Abbildung 3.3.1 dargestellt, bereits zwei bekannte Glutaredoxine in Mitochondrien lokalisiert. Dabei handelt es sich um Grx2 und Grx5. Grx5 liegt ausschließlich in der mitochondrialen Matrix vor. Grx2 wird ausgehend von zwei alternativen Startcodons gebildet. Die längere Variante besitzt eine N-terminale Präsequenz, die das Protein in die Matrix leitet. Die Doppeldeletion von Grx2 und Grx5, nicht aber die Einzeldelationen, ist letal für die Hefe, was bedeutet, auch Grx2 übt seine Funktion in der mitochondrialen Matrix aus (Luikenhuis *et al.*, 1998; Rodríguez-

Manzanaque *et al.*, 1999; Porras *et al.*, 2006). Daher wollten wir weitere Glutaredoxine mit putativer Lokalisation im mitochondrialen Intermembranraum identifizieren.

In dieser Arbeit werden zwei neuartige Mitglieder dieser Familie beschrieben, die Grx6 und Grx7 genannt wurden und sich strukturell sehr ähneln. Im Laufe der Evolution kam es zur Verdopplung des Genoms von *S. cerevisiae* (Wolfe und Shields, 1997) und dabei möglicherweise auch zur Duplikation eines Vorläufers von *GRX6* und *GRX7*. In anderen Pilzen, deren Genom nicht verdoppelt wurde, konnte jeweils nur ein Protein mit Homologie zu Grx6 und Grx7 nachgewiesen werden.

4.3.2 Lokalisation und Topologie von Grx6 und Grx7

Sowohl Grx6 als auch Grx7 tragen N-terminale Signalsequenzen und wurden in isolierte Mikrosomen ATP-, aber nicht Membranpotential-abhängig importiert. Dies ist charakteristisch für den Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum, nicht aber für Mitochondrien. In Immunfluoreszenzexperimenten (siehe Kapitel 3.3.2) konnten sowohl Grx6 als auch Grx7 mit Sed5, einem Markerprotein des *cis*-Golgi-Apparates, kolokalisiert werden. Zusätzlich zeigte die zelluläre Subfraktionierung (Daten hier nicht gezeigt) die Komigration mit Anp1, das ebenfalls im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert ist. Somit konnte die mitochondriale Lokalisation und eine Rolle beim Import in den mitochondrialen Intermembranraum für beide Glutaredoxine ausgeschlossen werden. Dennoch waren sie von besonderem Interesse, da zuvor keine redoxaktiven Proteine im Golgi-Apparat beschrieben worden waren.

Die Hydrophobizitätsanalyse von Grx6 und Grx7 sagte einen stark hydrophoben Bereich am N-Terminus der Proteine voraus. Dieser Bereich bildet möglicherweise eine Transmembrandomäne, die die Proteine in der *cis*-Golgi-Membran verankert. Durch eine Carbonatextraktion aus isolierten Mikrosomen wurde dies überprüft. Grx7 wurde in der Pelletfraktion mit Erp1 gefunden, was für die Membranintegration des Glutaredoxins spricht. Da das Protein in intakten Mikrosomen Protease-resistent war, muss die lösliche katalytische Domäne zum Golgi-Lumen orientiert sein. Proteine, die dem sekretorischen Transportweg folgen, werden typischerweise während ihrer Insertion ins endoplasmatische Retikulum oxidiert und man hat angenommen, dass sie diese Konformation beibehalten. Daher war die Entdeckung von Glutaredoxinen im Golgi-Apparat überraschend. In Übereinstimmung mit einer unvermuteten Reduktion in den beteiligten Kompartimenten wurde kürzlich ein neuer Regulationsmechanismus für Ero1 beschrieben. Ero1 verfügt über 14 Cysteinreste, von denen 4 essentiell für die

katalytische Aktivität sind. Um die Oxidation von Pdi1 zu katalysieren, müssen diese Cysteinreste selbst zuvor oxidiert vorliegen. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass Ero1, wenn bestimmte Cysteinreste außerhalb des aktiven Zentrums oxidiert sind, eine geringere katalytische Aktivität aufweist als partiell reduziertes Protein (Sevier *et al.*, 2007). Offensichtlich ist auch im endoplasmatischen Retikulum das Redoxgleichgewicht nicht vollständig auf die Seite der Oxidation verschoben und es gibt Mechanismen, die eine Überoxidation dieses Kompartiments verhindern.

4.3.3 Grx6 und Grx7 besitzen Glutaredoxinaktivität

Zunächst hatten wir Grx6 und Grx7 aufgrund ihrer Homologie zur Glutaredoxindomäne von Grx1-5 den Glutaredoxinen zugeordnet. Um zu überprüfen, ob Grx6 und Grx7 tatsächlich Glutaredoxinaktivität besitzen, wurden sie im sogenannten HEDS(2-Hydroxyethyl-disulfid)-Assay getestet. Grx6 zeigte vergleichbare Aktivität mit der Positivkontrolle PfGrx, während die von Grx7 sogar deutlich höher war. Bisher konnte nur die Aktivität von Dithiolglutaredoxinen im HEDS-Assay gemessen werden. Vorhergehende Versuche mit anderen Monothiolglutaredoxinen wie Grx4 aus *E. coli* (Fernandes *et al.*, 2005), Glps (*Glutaredoxin like proteins*) aus *Plasmodium falciparum* (Deponte *et al.*, 2005; Rahlfs *et al.*, 2001), und Grx3, Grx4 und Grx5 aus Hefe (Tamarit *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2007) konnten keine Glutaredoxinaktivität nachweisen. Der Reaktionsmechanismus der Dithiolglutaredoxine ist gut verstanden, wohingegen der der Monothiolglutaredoxine weitgehend ungeklärt ist und möglicherweise auch innerhalb der Gruppe variiert. Zum Beispiel besitzt Grx5 einen zweiten Cysteinrest außerhalb des aktiven Zentrums, der wahrscheinlich in den Elektronentransfer involviert ist (Tamarit *et al.*, 2003). Grx6 und Grx7 enthalten aber kein weiteres Cystein außerhalb des CXXS-Motivs und müssen daher einem abweichenden Mechanismus folgen. Interessanterweise kann bei Dithiolmutanten, in deren katalytischem Zentrum ein Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde, noch Glutaredoxinaktivität gemessen werden. Daher wurde für diese Mutanten ein Mechanismus postuliert, bei dem ein gemischtes Disulfid zwischen Substratprotein und GSH gebildet wird, das anschließend vom Glutaredoxin in das reduzierte Substrat und GSSG konvertiert wird (Bushweller *et al.*, 1992). Bemerkenswerterweise besteht strukturell eine höhere Ähnlichkeit von Grx6 und Grx7 mit bereits charakterisierten Dithiolglutaredoxinen wie Grx1 und Grx2. Unter anderem ist dies auf eine Insertion von fünf Aminosäuren zwischen einem hochkonservierten Lysinrest und dem Cysteinrest

des aktiven Zentrums bereits charakterisierter Monothiolglutaredoxine zurückzuführen, die in Grx6 und Grx7 und den Dithiolglutaredoxinen nicht vorkommt (Mesecke *et al.*, 2008).

Dies bedeutet, dass Proteine des sekretorischen Transportweges nicht nur hohen Mengen Glutathion ausgesetzt werden, sondern auch reduzierenden Enzymen. Allerdings gibt es keine Evidenz für eine spätere Reduktion sekretorischer Proteine nach der Oxidation im endoplasmatischen Retikulum. Das bedeutet, Grx6 und Grx7 erfüllen vermutlich keine generelle Funktion als Reduktase im *cis*-Golgi-Apparat.

Für rekombinantes Grx6 konnte die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters *in vitro* ähnlich der im humanen Grx2 gezeigt werden. Desweiteren wurden mit der Eisen-Schwefel-Cluster bindenden oder freien Form unterschiedlich starke Glutaredoxinaktivitäten assoziiert (Mesecke *et al.*, 2008). Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit die erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress in der Δ grx6-Mutante beobachtet. Möglicherweise nimmt es wie menschliches Grx2 in Mitochondrien eine Sensorfunktion für oxidativen Stress im sekretorischen Transportweg ein (Lillig *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2007).

4.3.4 Grx7 zeigt keinen Einfluss auf die oxidative Proteinfaltung durch Pdi1

Um zu überprüfen, ob die Glutaredoxine einen generellen Einfluss auf die oxidative Proteinfaltung im sekretorischen Transportweg z.B. durch die Modifikation der Pdi1-Isomeraseaktivität haben, wurde die Aktivität von RNase, einem Modellsubstrat von Pdi1, gemessen. Dabei konnte Pdi1 falsche Disulfidbrücken in der RNase isomerisieren und somit die RNase regenerieren. Die Inkubation von RNase mit Grx7 hatte aber keinen nennenswerten Einfluss auf ihre Aktivität. Das bedeutet, Grx7 besitzt im Gegensatz zu Pdi1 keine Isomeraseaktivität zur Regeneration der RNase. Da es sich bei Pdi1 um ein lösliches Protein handelt, kann es durch den Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum in den *cis*-Golgi-Apparat gelangen. Aufgrund seines Retentionssignals akkumuliert es aber durch Retrotransport im endoplasmatischen Retikulum. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass Pdi1 mit Grx7 interagiert und Reduktionsäquivalente von dem Glutaredoxin bezieht, die für Isomerisierungsreaktionen im endoplasmatischen Retikulum benötigt werden. Allerdings zeigte auch die Kombination von Grx7 und Pdi1 keine nennenswerte Veränderung der Pdi1-Aktivität. Weitere Versuche, Pdi1 vor der Inkubation mit RNase zu oxidieren und anschließend durch Grx7 zu reduzieren, schlugen fehl. Einmal

oxidiertes Pdi1 konnte nicht wieder durch Grx7 reduziert werden und Aktivität im RNase-Rückfaltungsassay war nicht mehr detektierbar (Daten hier nicht gezeigt).

5 Zusammenfassung

Nahezu alle mitochondrialen Proteine sind im Zellkern kodiert und werden im Zytosol synthetisiert. Von ihrem Synthesort gelangen diese Proteine über spezifische Mechanismen an ihren Bestimmungsort. Die Komplexe, die den Import von Außenmembran-, Innenmembran- und Matrixproteinen katalysieren, sind relativ gut untersucht. Der Import von Proteinen des mitochondrialen Intermembranraums ist dagegen weniger gut verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Importmechanismus für lösliche Intermembranraumproteine untersucht werden, die durch konservierte Cysteinmotive charakterisiert sind. Vor kurzem konnte Mia40 als erste Komponente dieses Importweges identifiziert werden.

Mia40 interagiert mit neu importierten Intermembranraumproteinen mit konservierten Cysteinmotiven über Disulfidbrücken. Die Ausbildung dieser Disulfidbrücken ist essentiell für den Import der Proteine, wohingegen die Bindung von Kofaktoren den Import nicht direkt zu beeinflussen scheint.

Die Sulphydryloxidase Erv1 konnte als eine weitere Komponente dieses Systems identifiziert werden. Ihre Sulphydryloxidaseaktivität wurde *in vivo* nachgewiesen. Erv1 interagiert direkt mit Mia40 und erhält es im oxidierten, aktiven Zustand. Oxidiertes Mia40 wirkt als Importrezeptor, der ein gemischtes Disulfid mit neu importierten Proteinen bildet. Durch Isomerisierung überträgt Mia40 seine Disulfidbrücke schließlich auf das Substratprotein, was zur Reduktion von Mia40 führt. Um importkompetentes Mia40 zu regenerieren, muss die Oxidation von Mia40 durch Erv1 erfolgen.

Dieser Importweg ähnelt Mechanismen der oxidativen Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum und im bakteriellen Periplasma. Im endoplasmatischen Retikulum sind Proteine der ERV/ALR-Familie an der Oxidation sekretierter Proteine beteiligt.

Da in früheren Arbeiten reduziertes Tim13 *in vivo* nachgewiesen wurde, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich möglicherweise ein Reduktionsschritt an den Mia40-Erv1-abhängigen Importprozess anschließt. Das Intermembranraumprotein Hot13 wurde zuvor als Assemblierungsfaktor für die kleinen Tim-Proteine mit Reduktaseaktivität beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Reduktaseaktivität von Hot13 nachgewiesen werden. Hot13 ist allerdings in der Lage, die Oxidation von Mia40 zu unterstützen. Dies erfolgt wahrscheinlich durch die

Bindung von Zink an Hot13, durch die die Oxidation des metallfreien Mia40 vereinfacht wird.

Auf der Suche nach einer Reduktase im mitochondrialen Intermembranraum wurden zwei neuartige Glutaredoxine identifiziert, die als Grx6 und Grx7 bezeichnet wurden. Grx6 und Grx7 sind im *cis*-Golgi-Apparat lokalisiert. Somit konnte ihre Rolle im Importprozess in Mitochondrien ausgeschlossen werden. Dennoch sind sie aufgrund der Lokalisation im sekretorischen Transportweg von besonderem Interesse. Ihre Glutaredoxinaktivität konnte *in vitro* nachgewiesen werden, sie haben aber keinen Einfluss auf die Isomerisierung sekretorischer Proteine durch die Proteindisulfidisomerase.

6 Literaturverzeichnis

- Abajian C, Yatsunyk LA, Ramirez BE, Rosenzweig AC (2004) Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding. *J Biol Chem* **279**: 53584-53592
- Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *The EMBO journal* **18**: 313-319
- Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *Journal of molecular biology* **353**: 937-944
- Allen S, Lu H, Thornton D, Tokatlidis K (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem* **278**: 38505-38513
- Anfinsen CB, Haber E (1961) Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* **236**: 1361-1363
- Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I, Winge DR (2005) Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure* **13**: 713-722
- Bauer MF, Hofmann S, Neupert W, Brunner M (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends in cell biology* **10**: 25-31
- Becher D, Kricke J, Stein G, Lisowsky T (1999) A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 1171-1181
- Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM (2007) The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *The Journal of cell biology* **179**: 389-395
- Biswas S, Chida AS, Rahman I (2006) Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical pharmacology* **71**: 551-564
- Borst P, Grivell LA (1978) The mitochondrial genome of yeast. *Cell* **15**: 705-723
- Bushweller JH, Aslund F, Wuthrich K, Holmgren A (1992) Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**: 9288-9293

- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* **23**: 3735-3746
- Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ (2006) The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO reports* **7**: 271-275
- Coppock DL, Thorpe C (2006) Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxidants & redox signaling* **8**: 300-311
- Cotgreave IA, Gerdes RG (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochemical and biophysical research communications* **242**: 1-9
- Curran SP, Leuenberger D, Leverich EP, Hwang DK, Beverly KN, Koehler CM (2004) The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J Biol Chem* **279**: 43744-43751
- Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO journal* **21**: 942-953
- Curran SP, Leuenberger D, Schmidt E, Koehler CM (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *The Journal of cell biology* **158**: 1017-1027
- Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM (2007) A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *The EMBO journal* **26**: 4801-4811
- Davis AJ, Sepuri NB, Holder J, Johnson AE, Jensen RE (2000) Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *The Journal of cell biology* **150**: 1271-1282
- Deponte M, Becker K, Rahlfs S (2005) Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biological chemistry* **386**: 33-40
- Diekert K, de Kroon AI, Ahting U, Niggemeyer B, Neupert W, de Kruijff B, Lill R (2001) Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *The EMBO journal* **20**: 5626-5635
- Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B (2002) Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**: 847-853
- Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman F (1991) Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**: 5487-5496

- Dumont ME, Ernst JF, Sherman F (1988) Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem* **263**: 15928-15937
- Endo T, Yamamoto H, Esaki M (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *Journal of cell science* **116**: 3259-3267
- Endres M, Neupert W, Brunner M (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *The EMBO journal* **18**: 3214-3221
- Farrell SR, Thorpe C (2005) Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* **44**: 1532-1541
- Fernandes AP, Fladvad M, Berndt C, Andresen C, Lillig CH, Neubauer P, Sunnerhagen M, Holmgren A, Vlamis-Gardikas A (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **280**: 24544-24552
- Fernandes AP, Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* **6**: 63-74
- Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* **278**: 28052-28059
- Frand AR, Kaiser CA (1998) The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **1**: 161-170
- Frand AR, Kaiser CA (1999) Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **4**: 469-477
- Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Muller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C (2007) Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *Journal of molecular biology* **365**: 612-620
- Gerber J, Muhlenhoff U, Hofhaus G, Lill R, Lisowsky T (2001) Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem* **276**: 23486-23491
- Ghezzi P (2005) Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society transactions* **33**: 1378-1381
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS letters* **546**: 355-358
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**: 809-822

- Gross E, Sevier CS, Vala A, Kaiser CA, Fass D (2002) A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nature structural biology* **9**: 61-67
- Grumbt B, Stroobant V, Terziyska N, Israel L, Hell K (2007) Functional Characterization of Mia40p, the Central Component of the Disulfide Relay System of the Mitochondrial Intermembrane Space. *J Biol Chem* **282**: 37461-37470
- Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE (1994) Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8142-8146
- Haucke V, Ocana CS, Honlinger A, Tokatlidis K, Pfanner N, Schatz G (1997) Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b5 reductase to two locations within yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology* **17**: 4024-4032
- Herrero E, de la Torre-Ruiz MA (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1518-1530
- Herrmann JM, Hell K (2005) Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **30**: 205-211
- Herrmann JM, Kohl R (2007) Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *The Journal of cell biology* **176**: 559-563
- Herrmann JM, Neupert W (2000a) Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology* **3**: 210-214
- Herrmann JM, Neupert W (2000b) What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochimica et biophysica acta* **1459**: 331-338
- Hiniker A, Bardwell JC (2004) In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* **279**: 12967-12973
- Hofhaus G, Stein G, Polimeno L, Francavilla A, Lisowsky T (1999) Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. *European journal of cell biology* **78**: 349-356
- Hofmann S, Rothbauer U, Muhlenbein N, Baiker K, Hell K, Bauer MF (2005) Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *Journal of molecular biology* **353**: 517-528
- Hofmann S, Rothbauer U, Muhlenbein N, Neupert W, Gerbitz KD, Brunner M, Bauer MF (2002) 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* **277**: 23287-23293

- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**: 13963-13966
- Hoogenraad NJ, Ward LA, Ryan MT (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1592**: 97-105
- Hornig YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* **279**: 35334-35340
- Hurt EC, Pesold-Hurt B, Schatz G (1984a) The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *The EMBO journal* **3**: 3149-3156
- Hurt EC, Pesold-Hurt B, Schatz G (1984b) The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS letters* **178**: 306-310
- Jensen RE, Dunn CD (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochimica et biophysica acta* **1592**: 25-34
- Johansson C, Kavanagh KL, Gileadi O, Oppermann U (2007) Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J Biol Chem* **282**: 3077-3082
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry* **72**: 111-135
- Koehler CM (2004) New developments in mitochondrial assembly. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 309-335
- Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K (1998) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *The EMBO journal* **17**: 6477-6486
- Kurz M, Martin H, Rassow J, Pfanner N, Ryan MT (1999) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell* **10**: 2461-2474
- Laboissiere MC, Sturley SL, Raines RT (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J Biol Chem* **270**: 28006-28009
- Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* **2**: 715-720

- Lee JG, Cho SP, Lee HS, Lee CH, Bae KS, Maeng PJ (2000) Identification of a cryptic N-terminal signal in *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal citrate synthase that functions in both peroxisomal and mitochondrial targeting. *Journal of biochemistry* **128**: 1059-1072
- Lill R, Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* **22**: 457-486
- Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, Lonn ME, Hudemann C, Bill E, Holmgren A (2005) Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8168-8173
- Linke K, Jakob U (2003) Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxidants & redox signaling* **5**: 425-434
- Lisowsky T (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* **232**: 58-64
- Lisowsky T (1994) ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **26**: 15-20
- Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, Arrigoni G, Casonato S, Ruzzene M, Pinna LA, Carignani G (2004) Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *The Biochemical journal* **377**: 395-405
- Lu H, Allen S, Wardleworth L, Savory P, Tokatlidis K (2004a) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem* **279**: 18952-18958
- Lu H, Golovanov AP, Alcock F, Grossmann JG, Allen S, Lian LY, Tokatlidis K (2004b) The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J Biol Chem* **279**: 18959-18966
- Lu H, Woodburn J (2005) Zinc binding stabilizes mitochondrial Tim10 in a reduced and import-competent state kinetically. *Journal of molecular biology* **353**: 897-910
- Luciano P, Vial S, Vergnolle MA, Dyall SD, Robinson DR, Tokatlidis K (2001) Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *The EMBO journal* **20**: 4099-4106
- Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW, Grant CM (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**: 1081-1091
- Lutz T, Neupert W, Herrmann JM (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO journal* **22**: 4400-4408
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru, II, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh CE, Buttle K, Marko M (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB life* **52**: 93-100

- Manning-Krieg UC, Scherer PE, Schatz G (1991) Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *The EMBO journal* **10**: 3273-3280
- Margulis L (1971) Symbiosis and evolution. *Scientific American* **225**: 48-57
- Martin J, Mahlke K, Pfanner N (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* **266**: 18051-18057
- Matthews JM, Sunde M (2002) Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB life* **54**: 351-355
- Mayer A, Neupert W, Lill R (1995) Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **270**: 12390-12397
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**: 1059-1069
- Mesecke N, Mittler S, Eckers E, Herrmann JM, Deponte M (2008) Two Novel Monothiol Glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* Provide Further Insight into Iron-Sulfur Cluster Binding, Oligomerization, and Enzymatic Activity of Glutaredoxins. *Biochemistry* **47**: 1452-1463
- Michaelis G, Esser K, Tursun B, Stohn JP, Hanson S, Pratje E (2005) Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome C peroxidase. *Gene* **354**: 58-63
- Milenkovic D, Gabriel K, Guiard B, Schulze-Specking A, Pfanner N, Chacinska A (2007) Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem* **282**: 22472-22480
- Molina MM, Belli G, de la Torre MA, Rodriguez-Manzanique MT, Herrero E (2004) Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* **279**: 51923-51930
- Muhlenhoff U, Lill R (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1459**: 370-382
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Barrell D, Bateman A, Binns D, Biswas M, Bradley P, Bork P, Bucher P, Copley RR, Courcelle E, Das U, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Griffiths-Jones S, Haft D, Harte N, Hulo N, Kahn D, Kanapin A, Krestyaninova M, Lopez R, Letunic I, Lonsdale D, Silventoinen V, Orchard SE, Pagni M, Peyruc D, Ponting CP, Selengut JD, Servant F, Sigrist CJ, Vaughan R, Zdobnov EM (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic acids research* **31**: 315-318

- Muller JM, Milenkovic D, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A (2007) Precursor Oxidation by Mia40 and Erv1 Promotes Vectorial Transport of Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space. *Mol Biol Cell*
- Naoe M, Ohwa Y, Ishikawa D, Ohshima C, Nishikawa S, Yamamoto H, Endo T (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* **279**: 47815-47821
- Nargang FE, Drygas ME, Kwong PL, Nicholson DW, Neupert W (1988) A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem* **263**: 9388-9394
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* **66**: 863-917
- Nicholson DW, Neupert W (1989) Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 4340-4344
- Nobrega MP, Bandeira SC, Beers J, Tzagoloff A (2002) Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **277**: 40206-40211
- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 17661-17669
- Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR (2004) Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *The Journal of cell biology* **166**: 337-345
- Palmisano A, Zara V, Honlinger A, Voza A, Dekker PJ, Pfanner N, Palmieri F (1998) Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *The Biochemical journal* **333 (Pt 1)**: 151-158
- Paschen SA, Neupert W, Rapaport D (2005) Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **30**: 575-582
- Paschen SA, Rothbauer U, Kaldi K, Bauer MF, Neupert W, Brunner M (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *The EMBO journal* **19**: 6392-6400
- Pedrajas JR, Porras P, Martinez-Galisteo E, Padilla CA, Miranda-Vizuete A, Barcena JA (2002) Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *The Biochemical journal* **364**: 617-623
- Pfanner N, Craig EA, Honlinger A (1997) Mitochondrial preprotein translocase. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 25-51

- Pfanner N, Hoeben P, Tropschug M, Neupert W (1987) The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J Biol Chem* **262**: 14851-14854
- Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C, Lithgow T (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nature structural & molecular biology* **11**: 1044-1048
- Polimeno L, Lisowsky T, Francavilla A (1999) From yeast to man--from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Italian journal of gastroenterology and hepatology* **31**: 494-500
- Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS (1998) Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **1**: 171-182
- Porrás P, Padilla CA, Krayl M, Voos W, Barcena JA (2006) One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 16551-16562
- Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz MA (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* **119**: 4554-4564
- Rahlfs S, Fischer M, Becker K (2001) *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J Biol Chem* **276**: 37133-37140
- Rehling P, Brandner K, Pfanner N (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature reviews* **5**: 519-530
- Rigby K, Zhang L, Cobine PA, George GN, Winge DR (2007) characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**: 10233-10242
- Rodriguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabiscol E, Sorribas A, Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**: 8180-8190
- Rodriguez-Manzaneque MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121
- Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Human molecular genetics* **11**: 477-486
- Roise D, Theiler F, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH, Allison DS, Schatz G (1988) Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *The EMBO journal* **7**: 649-653

Sevier CS, Cuozzo JW, Vala A, Aslund F, Kaiser CA (2001) A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nature cell biology* **3**: 874-882

Sevier CS, Kaiser CA (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature reviews* **3**: 836-847

Sevier CS, Qu H, Heldman N, Gross E, Fass D, Kaiser CA (2007) Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell* **129**: 333-344

Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**: 912-915

Smagula C, Douglas MG (1988a) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation. *J Biol Chem* **263**: 6783-6790

Smagula CS, Douglas MG (1988b) ADP-ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mitochondrial import signal between amino acids 72 and 111. *Journal of cellular biochemistry* **36**: 323-327

Srinivasan C, Posewitz MC, George GN, Winge DR (1998) Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **37**: 7572-7577

Stuart RA, Ono H, Langer T, Neupert W (1996) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Cell structure and function* **21**: 403-406

Tamarit J, Belli G, Cabisco E, Herrero E, Ros J (2003) Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* **278**: 25745-25751

Terziyska N, Grumbt B, Bien M, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2007) The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS letters* **581**: 1098-1102

Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS letters* **579**: 179-184

Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Archives of biochemistry and biophysics* **405**: 1-12

Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, NY)* **290**: 1571-1574

Tu BP, Weissman JS (2002) The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **10**: 983-994

- Vala A, Sevier CS, Kaiser CA (2005) Structural determinants of substrate access to the disulfide oxidase Erv2p. *Journal of molecular biology* **354**: 952-966
- van der Laan M, Rissler M, Rehling P (2006) Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS yeast research* **6**: 849-861
- von Heijne G (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO journal* **5**: 1335-1342
- Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapaport D (2004) Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO reports* **5**: 704-709
- Webb CT, Gorman MA, Lazarou M, Ryan MT, Gulbis JM (2006) Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Molecular cell* **21**: 123-133
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 14473-14476
- Wiedemann N, Pfanner N, Chacinska A (2006) Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Molecular cell* **21**: 145-148
- Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS letters* **579**: 179-184
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**: 1059-1069
- Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM (2007) The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *The Journal of cell biology* **179**: 389-395
- Herrmann JM, Bihlmaier K, and Mesecke N (2007) The Role of the Mia40-Erv1 Disulfide Relay System in Import and Folding of Proteins of the Intermembrane Space of Mitochondria, in *The Enzymes, Vol 25; Molecular Machines Involved in Protein Transport across Cellular Membranes* (Dalbey R, Koehler C & Kamanoi F, eds.), Academic Press/Elsevier, 2007
- Bihlmaier K, Mesecke N, Kloeppe C, and Herrmann JM (2007) The disulfide relay of the intermembrane space of mitochondria: An oxygen-sensing system? *Annals of the New York Academy of Sciences*, (in press)

Mesecke N, Mittler S, Eckers E, Herrmann JM, Deponte M (2008) Two Novel Monothiol Glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* Provide Further Insight into Iron-Sulfur Cluster Binding, Oligomerization, and Enzymatic Activity of Glutaredoxins. *Biochemistry* **47**: 1452-1463

Mesecke N, Spang A, Deponte M, Herrmann JM (2008) A Novel Group of Glutaredoxins in the *cis*-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Molecular Biology of the Cell*, April 9. [Epub ahead of print]

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| g | Erdbeschleunigung |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| A | Absorption |
| Amp | Ampicillin |
| AMS | 4-Acetamido-4'-((iodoacetyl)amino)stilbene-2,2'-disulfonsäure |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumine</i> |
| Ci | Curie |
| cm | Zentimeter |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| D | Dextrose/Glukose |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| GSH | Glutathion, reduziert |
| GSSG | Glutathion, oxidiert |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert |
| NEM | <i>N</i> -Ethylmaleimid |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| U | Units |

Danksagung

Prof. Dr. Dr. Walter Neupert danke ich dafür, dass ich meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen durfte. Ich konnte an seinem Institut nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene sehr viel lernen. Sein Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung auch bei der Bewerbung auf Förderprogramm- und Stipendienstellen hat mich immer wieder von Neuem motiviert.

Ich danke Prof. Dr. Jürgen Soll für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie.

Ich danke Prof. Dr. Hannes Herrmann für die Betreuung meiner Arbeit. Er hat mich besonders in meiner Anfangsphase sehr unterstützt und war ein großartiger Lehrer. Durch immer neue Herausforderungen hat er mir gezeigt, dass man oft viel mehr erreichen kann, als man vermutet. Er war zu jeder Zeit, auch in Kaiserslautern, ein Ansprechpartner für mich und immer für alle Ideen offen.

Dr. Kai Hell danke ich für das offene Ohr, das er immer für mich hatte, nachdem ich als Redox-Waise der H-Group zurückgeblieben war.

Ich danke Dr. Anne Spang und Dr. Marcel Deponte für die gute Zusammenarbeit auf dem Feld der Glutaredoxine.

Helga Döge, Christine Werner und Frau Hauck danke ich für die administrative Unterstützung und für die Versorgung mit Keksen in Notsituationen.

Unserer Werkstatt danke ich für Hilfe bei technischen Problemen aller Art, unseren Spülfrauen und Laborhilfen für die Bereitstellung des notwendigen Arbeitsmaterials und dem Tierstall für die Betreuung meiner Hasen.

Petra Robisch und Sandra Esser danke ich für die exzellente technische Unterstützung und die netten Gespräche.

Ich danke dem Elite Netzwerk Bayern und der Bayerischen Eliteförderung für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit, von Konferenzbesuchen und der Teilnahme an verschiedenen Kursen zur beruflichen und persönlichen Weiterbildung.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Girlies Sole, Heike, Sandra und Martin, die die letzten Jahre im Labor zu einer tollen Zeit gemacht haben. Vielen Dank für die Unterstützung und Beratung in allen Situationen und den Spaß, den wir im Labor und außerhalb zusammen hatten. Außerdem möchte ich mich noch bei meinen Arbeitsgruppenmitgliedern in Kaiserslautern bedanken, besonders bei Karl und Melanie für die hervorragende Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Disulfidbrückenumlagerung und darüber hinaus.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die ständige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und bei Johannes für die wissenschaftliche und private Unterstützung während der Jahre meiner Doktorarbeit.

Lebenslauf

| | |
|------------|---|
| | Nikola Mesecke |
| 11.10.1978 | geboren in Göttingen |
| 1985-1989 | Besuch der Grundschule Herberhausen |
| 1989-1991 | Besuch der Lutherschule (Orientierungsstufe), Göttingen |
| 1991-1998 | Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums, Göttingen |
| Juni 1998 | Abitur am Theodor-Heuss-Gymnasiums, Göttingen |
| 1998-2002 | Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen |
| 2002-2003 | Diplomarbeit an der Georg-August-Universität Göttingen im Institut für Biochemie der Pflanze mit dem Titel „Studien zu Metabolismus und Transport neuartiger Disaccharide in <i>Datisca glomerata</i> “ |
| 2003-2004 | Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der Pflanze |
| 2004 | Beginn der vorliegenden Arbeit an der LMU München am Institut von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert in der Arbeitsgruppe von Dr. Johannes Herrmann |