

**Charakterisierung und Rekonstitution des Mia40-Erv1-  
Disulfidtransfersystems in Mitochondrien**

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

vorgelegt von  
**Barbara Grumbt**  
aus  
Neuried

München 2009

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

---

Unterschrift

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Mitochondrien	1
1.2	Proteinimport in Mitochondrien	2
1.3	Proteinimport in den Intermembranraum von Mitochondrien	5
1.3.1	Mia40, Importrezeptor für cysteinreiche Proteine im Intermembranraum	6
1.3.2	Erv1, eine Sulphydryloxidase im Intermembranraum	8
1.3.3	Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems	11
1.4	Disulfidbrückenbildende Systeme	13
1.4.1	Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum	14
1.4.2	Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma von Bakterien	16
1.4.3	Bildung von Disulfidbrücken im Intermembranraum von Mitochondrien	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	22
2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	22
2.1.3	Restriktionsverdau von DNS	23
2.1.4	Ligation	23
2.1.5	Reinigung und Analyse von DNS	24
2.1.5.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNS	24
2.1.5.2	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.1.5.3	Bestimmung der DNS-Konzentration	24
2.1.6	Transformation elektrokompenter <i>E.coli</i> Zellen	24
2.1.6.1	Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	24
2.1.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	25
2.1.6.3	Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	25
2.1.6.4	Verwendete Medien für die Anzucht von <i>E.coli</i>	25
2.1.7	Verwendete Plasmide	26
2.1.8	Klonierungsstrategien	27
2.1.9	Hefetransformation	29
2.1.10	Verwendete Hefestämme	29

<b>2.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>30</b>
2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.2	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.2.3	Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.2.4	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	31
2.2.5	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	31
2.2.6	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	32
2.2.7	Autoradiographie und Densitometrie	32
2.2.8	Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	33
2.2.8.1	<i>In vitro</i> Transkription	33
2.2.8.2	<i>In vitro</i> Translation	33
2.2.8.3	Transkription-Translation gekoppeltes System (TNT)	33
2.2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.10	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	34
2.2.11	Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	34
2.2.12	Expression und Reinigung von Mia40 und Cysteinvarianten von Mia40	35
2.2.13	Expression und Reinigung von Tim10	35
2.2.14	Expression und Reinigung von Erv1	36
2.2.15	Expression und Reinigung von Hot13	37
2.2.16	Proteinmodifikation mit 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure (AMS)	37
2.2.17	Erzeugung verschiedener Redoxzustände gereinigter Proteine	37
<b>2.3</b>	<b>Methoden der Zellbiologie</b>	<b>38</b>
2.3.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	38
2.3.2	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus <i>S. cerevisiae</i>	39
2.3.3	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	39
2.3.4	Proteinimport in isolierte Mitochondrien	40
2.3.5	Präparation von Mitoplasten	40
2.3.6	Carbonatextraktion	40
<b>2.4</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>41</b>
2.4.1	Antikörpernachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	41
2.4.2	Immunpräzipitation	41
<b>2.5</b>	<b>Geräte</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung von Erv1 als Substrat des Mia40/Erv1-Systems</b>	<b>43</b>

3.1.1	Erv1-Vorstufenprotein wird in den IMR von isolierten Mitochondrien transportiert	43
3.1.2	Erv1 wird über den TOM-Komplex importiert	45
3.1.3	Der Import von Erv1 ist nicht abhängig vom TIM23-Komplex	46
3.1.4	Der Import von Erv1 ist abhängig von Mia40	47
3.1.5	Freie Thiolgruppen im Erv1-Vorstufenprotein sind notwendig für den Import	49
3.1.6	Importiertes Erv1 interagiert mit Mia40 über Disulfidbrücken	50
3.1.7	Die Anordnung der Cysteinreste in einem doppelten CX <sub>2</sub> C-Motiv ist für den Import von Erv1 nicht erforderlich	52
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Redoxzustandes von Mia40</b>	<b>54</b>
3.2.1	Die hochkonservierte C-terminale Domäne von Mia40 ist funktionell	54
3.2.2	Reinigung von Mia40C	55
3.2.3	Biochemische Charakterisierung von Mia40C	57
3.2.4	Mia40 enthält drei Disulfidbrücken mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber DTT	59
3.2.5	Die Cysteinreste des CPC-Segments bilden eine redoxsensitive Disulfidbrücke	62
3.2.6	Die Disulfidbrücken im <i>twin</i> CX <sub>9</sub> C-Motiv stabilisieren Mia40	64
<b>3.3</b>	<b>Rekonstitution des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems</b>	<b>66</b>
3.3.1	Oxidation von Mia40 durch Erv1	66
3.3.1.1	Mia40 wird durch die Thioloxidase Erv1 oxidiert	66
3.3.1.2	Zink inhibiert die Oxidation von Mia40 durch Erv1	68
3.3.1.3	Hot13 hebt den inhibierenden Effekt von Zink auf die Oxidation von Mia40 auf	69
3.3.1.4	Die ersten beiden Cysteinreste in Mia40 sind essentiell für den Disulfidbrückentransfer von Erv1 auf Mia40	70
3.3.1.5	Mia40 interagiert über den zweiten Cysteinrest des CPC-Segments mit Erv1	72
3.3.2	Oxidation von Substratproteinen durch das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem	74
3.3.2.1	Mia40C-C1,2S wird von Mia40 oxidiert	74
3.3.2.2	Das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert Tim10, ein Substrat mit <i>twin</i> CX <sub>3</sub> C-Motiv	77
3.3.2.3	Die redoxsensitive Disulfidbrücke in Mia40 ist essentiell für die Oxidation von Tim10	79
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Erv1, ein untypisches Substrat des Mia40/Erv1-Systems</b>	<b>81</b>
<b>4.2</b>	<b>Redoxzustände von Mia40</b>	<b>83</b>
4.2.1	Mia40 enthält eine katalytische redoxsensitive Disulfidbrücke	84
4.2.2	Mia40 wird durch Disulfidbrücken des <i>twin</i> CX <sub>9</sub> C-Motivs stabilisiert	85

<b>4.3</b>	<b>Rekonstitution des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems</b>	<b>87</b>
4.3.1	Mia40 ist ein Substrat von Erv1	87
4.3.2	Mia40 oxidiert Substratproteine mit <i>twin</i> CX <sub>9</sub> C- und CX <sub>3</sub> C-Motiven	88
<b>4.4</b>	<b>Biogenese von Mia40</b>	<b>90</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von Metallionen auf das Mia40/Erv1-System</b>	<b>91</b>
<b>4.6</b>	<b>Hot13 erleichtert die Reoxidation von Mia40</b>	<b>92</b>
<b>4.7</b>	<b>Modell des Mia40/Erv1-Systems</b>	<b>93</b>
<b>4.8</b>	<b>Vergleich zu anderen Systemen der oxidativen Proteinfaltung</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>117</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>118</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktureller Aufbau von Mia40	8
1.2	Struktureller Aufbau von Erv1 und Erv2 aus <i>S.cerevisiae</i>	10
1.3	Systeme der oxidativen Proteinfaltung	18
1.4	Modell der Disulfidbrückenbildung im Intermembranraum	20
3.1	Import von radioaktiv markiertem Erv1 in isolierte Mitochondrien	44
3.2	Erv1 wird über den TOM-Komplex importiert	45
3.3	Erv1 wird nicht über den TIM23-Komplex importiert	47
3.4	Erv1 wird abhängig von Mia40 importiert	48
3.5	Modifikation freier Thiolgruppen blockiert den Import von Erv1	49
3.6	Die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken mit Mia40 ist wichtig für den Import von Erv1	51
3.7	Der Import von Erv1 erfordert kein doppeltes CX <sub>2</sub> C-Motiv	53
3.8	Strukturmodell von Mia40	55
3.9	Reinigung von Mia40C	56
3.10	Rekombinantes Mia40C ist gefaltet	58
3.11	Mia40C enthält unterschiedlich stabile Disulfidbrücken	61
3.12	Darstellung der Disulfidbrückenordnung in Mia40C	62
3.13	Mia40C-C1,2S enthält keine redoxsensitive Disulfidbrücke	63
3.14	Einfluß der Disulfidbrücken auf die Stabilität von Mia40C	65
3.15	Reduziertes Mia40C wird durch Erv1 oxidiert	67
3.16	Zink übt einen inhibierenden Effekt auf die Oxidation von Mia40 durch Erv1 aus	68
3.17	Hot 13 vereinfacht die Oxidation von Mia40 durch Erv1 in Anwesenheit von Zinkionen	70
3.18	Beide Cysteinreste des CPC-Segments in Mia40 sind für die Oxidation durch Erv1 erforderlich	71
3.19	Der zweite Cysteinrest in Mia40C ist essentiell für die Interaktion mit Erv1	73
3.20	Das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert Mia40C-C1,2S	76
3.21	Tim10 wird durch das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert	78
3.22	Die ersten beiden Cysteinreste in Mia40 sind notwendig für die Oxidation von Tim10	79
4.1	Schematische Darstellung der oxidierten und partiell reduzierten Form von Mia40	85
4.2	Schematische Darstellung der oxidierten und vollständig reduzierten Form von Mia40	86
4.3	Modell des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems	96

## **Tabellenverzeichnis**

1.1	Bekannte Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems	13
2.1	Verwendete Plasmide	26
2.2	Verwendete Hefestämme	29



# 1 Einleitung

## 1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene Organellen eukaryotischer Zellen. Die beiden Membranen trennen zwei wässrige Kompartimente: zwischen äußerer und innerer Membran befindet sich der Intermembranraum (IMR); die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix. Mitochondrien übernehmen eine Vielzahl wichtiger Aufgaben, die essentiell für die eukaryotische Zelle sind. Eine zentrale Rolle spielen sie bei der Energieversorgung des Organismus: über die Atmungskette in der inneren Membran wird durch oxidative Phosphorylierung ATP gebildet. Auch andere überlebenswichtige zelluläre Prozesse, wie die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Muhlenhoff und Lill, 2000), Fettsäureoxidation oder Regulation der Kalziumhomöostase finden in den verschiedenen Kompartimenten der Mitochondrien statt. Andererseits sind Mitochondrien ebenso an der Induktion des kontrollierten Zelltods, der Apoptose, beteiligt. Durch die Freisetzung von Proteinen wie Cytochrom *c*, dem Apoptose induzierenden Faktor (AIF) oder Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum in das Zytosol werden weitere Schritte der Apoptose ausgelöst (Du et al., 2000; Liu et al., 1996; Susin et al., 1999; Verhagen et al., 2000).

Evolutionär gehen Mitochondrien vermutlich auf die Endosymbiose aerober  $\alpha$ -Proteobakterien mit anaeroben Vorläuferzellen zurück (Margulis, 1970). Verschiedene Aspekte des mitochondrialen Aufbaus sprechen für die Endosymbiontentheorie. So sind Mitochondrien von zwei Membranen umschlossen, wobei die innere Membran in ihrer Zusammensetzung, mit einem hohen Anteil an Cardiolipin der Membran von Bakterien ähnelt. Die mitochondriale Matrix enthält ein zirkuläres Genom und einen eigenen Proteinsyntheseapparat, welche beide ebenfalls Gemeinsamkeiten zu den entsprechenden bakteriellen Strukturen aufweisen. Das mitochondriale Genom kodiert allerdings nur noch etwa 1% der mitochondrialen Proteine (Borst und Grivell, 1978). Der Großteil der genetischen Information wurde im Laufe der Evolution in die nukleäre DNS der Wirtszelle integriert, wodurch Mitochondrien von ihrer Wirtszelle abhängig wurden.

## 1.2 Proteinimport in Mitochondrien

Mitochondriale Proteine, die im Zellkern kodiert und an zytosolischen Ribosomen synthetisiert werden, müssen anschließend in die verschiedenen Subkompartimente der Mitochondrien transportiert werden, um dort ihre Funktion erfüllen zu können. Die Proteine enthalten dazu unterschiedliche spezifische Signalsequenzen, die kennzeichnen, zu welchem Zielkompartiment das jeweilige Protein gebracht werden soll. Der Großteil mitochondrialer Proteine besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die charakterisiert ist durch einen hohen Anteil positiv geladener Aminosäurereste, welche eine amphipathische Helix ausbilden (Roise et al., 1988; Von Heijne, 1986). Nach Erreichen der Matrix wird diese meistens durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten (Gakh et al., 2002). Eine Fusion der N-terminalen Signalsequenz an Proteine, die nicht mitochondrial lokalisiert sind, führt zum spezifischen Import des Fusionsproteins in Mitochondrien (Horwich et al., 1985; Hurt et al., 1984). Neben diesen N-terminalen Signalsequenzen gibt es weitere Sortierungssignale innerhalb eines Proteins, die jedoch nicht prozessiert werden und weniger gut charakterisiert sind.

Mitochondrien verfügen über spezifische Importmaschinerien, welche die Sortierungssignale erkennen und die Proteine zu ihrem Bestimmungsort transportieren. Die komplexe Zusammensetzung dieser Maschinerien, sowie die dem mitochondrialen Proteintransport zugrunde liegenden Mechanismen wurden vor allem in *N. crassa* und *S. cerevisiae* studiert (Neupert, 1997; Pfanner et al., 1997).

In Mitochondrien sind bisher sechs Translokationskomplexe bekannt, die den Import und die Sortierung von Proteinen vermitteln: in der äußeren Membran der TOM- und TOB-Komplex, in der inneren Membran der TIM23-, TIM22- und OXA1-Komplex sowie im Intermembranraum das Mia40/Erv1-System (zur Übersicht Mokranjac und Neupert, 2009).

Fast alle Proteine werden zunächst durch den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) über die Außenmembran transportiert, um zu einem der vier möglichen Zielkompartimente – der äußeren oder inneren Membran, der Matrix sowie dem Intermembranraum – zu gelangen. Der TOM-Komplex besteht aus dem essentiellen  $\beta$ -Barrel Protein Tom40, den Rezeptoren Tom20, Tom70 und Tom22, sowie den kleinen Untereinheiten Tom5, Tom6 und Tom7. Mehrere Moleküle von Tom40 bilden zwei bis drei Poren in der Außenmembran mit einem Porendurchmesser von etwa 22 Å (Hill et al., 1998; Kunkele et al., 1998). Diese Größe reicht aus, um bis zu zwei  $\alpha$ -helikale Segmente hindurch zu lassen, während gefaltete Domänen nicht durch die Pore gelangen können. Neusynthetisierte Proteine werden im

Zytosol durch molekulare Chaperone in einer importfähigen Konformation gehalten, bevor sie von Rezeptoren des TOM-Komplexes gebunden werden. Tom20 erkennt vor allem N-terminale-, Tom70 interne Sortierungssignale (Brix et al., 1997). Von diesen sogenannten *cis*-Bindungsstellen wird das Protein an *trans*-Bindungsstellen auf der dem Intermembranraum zugewandten Seite des TOM-Komplexes weitergeleitet. Die Affinität für das importierte Protein ist an der *trans*-Bindungsstelle höher als an der *cis*-Bindungsstelle (Mayer et al., 1995; Rapaport et al., 1998b; Stan et al., 2000), wobei ionische und hydrophobe Wechselwirkungen wichtig sind. Diese zunehmenden Bindungsaffinitäten verschiedener Untereinheiten des TOM-Komplexes scheinen die nötige Triebkraft für die vektorielle Translokation der Proteine vom Zytosol in den Intermembranraum zu vermitteln (Komiya et al., 1998; Rapaport et al., 1998a). Die Translokation in den IMR erfolgt unabhängig von ATP-Verbrauch und dem Membranpotential an der Innenmembran.

Der TOM-Komplex vermittelt nicht nur den Transport von Proteinen über die äußere Membran in den Intermembranraum, sondern auch die Insertion von Membranproteinen in die äußere Membran. Für die Insertion von sogenannten  $\beta$ -Barrel-Proteinen wird zusätzlich der TOB-Komplex (*topogenesis of outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*) benötigt, der sich ebenfalls in der äußeren Membran befindet. Hauptkomponente des TOB-Komplexes ist das essentielle  $\beta$ -Barrel-Protein Tob55, welches mit den peripheren Membranproteinen Tob38 und Mas37 interagiert (Ishikawa et al., 2004; Waizenegger et al., 2004; Wiedemann et al., 2003). Als vierte Untereinheit wurde Mdm10 identifiziert, welches auch an der Aufrechterhaltung der Morphologie von Mitochondrien beteiligt ist (Meisinger et al., 2004). Mitochondriale  $\beta$ -Barrel-Proteine werden zunächst von den Rezeptoren Tom20 und Tom70 erkannt und über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transferiert (Krimmer et al., 2001; Model et al., 2001; Rapaport, 2002; Rapaport und Neupert, 1999). Dort interagieren sie mit den kleinen Tim-Proteinkomplexen (Hoppins und Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004) und gelangen zum TOB-Komplex. Import und Assemblierung der  $\beta$ -Barrel-Proteine scheinen unabhängig von ATP-Verbrauch zu verlaufen, allerdings ist noch wenig über die einzelnen Schritte dieses Importweges bekannt.

In der Innenmembran befinden sich zwei Translokasekomplexe, die für den Import über und in die Innenmembran zuständig sind. Der TIM23-Komplex (*translocase of the inner membrane*) ermöglicht den Transport von Proteinen mit N-terminalen Sortierungssignalen entweder in die Matrix oder direkt in die Innenmembran, wenn dem Sortierungssignal ein hydrophobes Segment

folgt (Glick et al., 1992a). Der rezeptor- und kanalbildende Teil des TIM23-Komplexes besteht aus dem Membranprotein Tim23 (Truscott et al., 2001) und dem phylogenetisch verwandten Tim17, sowie dem Rezeptorprotein Tim50. Proteine mit N-terminalem Sortierungssignal assoziieren nach dem Eintritt in den Intermembranraum mit Tim50, welches sie dann an Tim23 weiterleitet (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Als Triebkraft für den Transport des positiv geladenen Sortierungssignals durch die Pore des Komplexes dient das Membranpotential (Krayl et al., 2007; Martin et al., 1991). Für die vollständige Translokation in die Matrix ist zusätzlich die treibende Kraft des ATP-abhängigen Importmotors notwendig. Zentrale Komponente des Importmotors ist das mitochondriale Hsp70-Chaperon, welches unter Hydrolyse von ATP, an der Matrixseite der Pore ankommende Proteine bindet (Manning-Krieg et al., 1991; Neupert und Brunner, 2002).

Polytope Innenmembranproteine mit mehreren hydrophoben Segmenten werden über den TIM22-Komplex in die Membran integriert. Proteine, die diesen Importweg benutzen, wie Carrier-Proteine, Tim17, Tim23 oder Tim22, besitzen interne Signalsequenzen, die jedoch nur wenig charakterisiert sind. Im Intermembranraum binden hexamere Komplexe aus Tim9 und Tim10 oder aus Tim8 und Tim13 an die aus dem TOM-Komplex austretenden Proteine. Ähnlich wie Chaperone verhindern sie dadurch die Aggregation der sehr hydrophoben Proteine und leiten sie weiter zum TIM22-Komplex (Curran et al., 2002b; Vial et al., 2002). Über Tim22, welches den Insertionskanal in der inneren Membran bildet, werden die Proteine in Abhängigkeit vom Membranpotential in die Innenmembran inseriert (Rehling et al., 2003; Sirrenberg et al., 1996).

Eine Gruppe von Innenmembranproteinen wird von der Matrixseite aus über den homooligomeren OXA1-Komplex (*oxidase assembly*) in die Innenmembran inseriert (Hell et al., 2001). Zu den Substratproteinen dieses Importweges gehören sowohl kernkodierte, als auch mitochondrial kodierte Proteine wie z. B Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Hell et al., 1997). Kernkodierte Proteine werden nach ihrem TIM23-abhängigen Import in die Matrix durch Oxa1 in einem membranpotentialabhängigen Exportschritt in die Innenmembran integriert. Oxa1 durchspannt die Innenmembran fünfmal und besitzt eine C-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne, die in die Matrix ragt (Herrmann et al., 1997). Diese Domäne bindet mitochondriale Ribosomen, wodurch eine kotranslationale Integration von mitochondrial kodierten Membranproteinen ermöglicht wird (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003).

### 1.3 Proteinimport in den Intermembranraum von Mitochondrien

Alle Proteine des Intermembranraums werden im Zytosol synthetisiert und passieren die äußere Membran durch den TOM-Komplex. Basierend auf Unterschieden hinsichtlich ihrer Sortierungssignale, strukturellen Merkmale und Energieanforderungen während des Imports können IMR-Proteine verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Herrmann und Hell, 2005).

Proteine der ersten Gruppe tragen typische N-terminale Sortierungssignale, gefolgt von einem hydrophoben Segment. Der Import dieser Proteine verbraucht ATP und ist abhängig vom Membranpotential über der Innenmembran. Das N-terminale Sortierungssignal leitet die Proteine zum TIM23-Komplex, während das hydrophobe Segment nach dem „*Stop-transfer*“-Modell die laterale Insertion der Proteine in die Innenmembran veranlasst (Neupert, 1997). Die laterale Bewegung dieses Abschnitts in die Innenmembran führt dann vermutlich zur vollständigen Translokation der Proteine durch den TOM-Komplex (Esaki et al., 1999). Das N-terminale Sortierungssignal wird in einem ersten Prozessierungsschritt durch MPP entfernt. Entweder verbleiben die Proteine durch das hydrophobe Segment in der Innenmembran verankert oder es kann durch eine zweite proteolytische Spaltung zur Freisetzung der Proteine in den IMR kommen. Der Import von IMR-Proteinen mit solchen zweigeteilten Sortierungssignalen wurde vor allem am Beispiel des Cytochrom  $b_2$  studiert (Glick et al., 1992b; Hartl et al., 1987). Weitere Proteine, die dieser Gruppe zugeordnet werden können, sind die Cytochrom  $c$  Peroxidase (Michaelis et al., 2005), das Morphologieprotein Mgm1 (Herlan et al., 2004) und einige proapoptotische Proteine wie Smac/DIABLO (Burri et al., 2005) und AIF (Susin et al., 1999).

Eine zweite Gruppe von Proteinen besitzt keine klassischen Sortierungssignale und wird unabhängig vom TIM23-Komplex in den IMR transportiert. Der Importprozess dieser Proteine erfordert weder mitochondriales ATP noch das Membranpotential. Bei einigen der Proteine wird die notwendige Energie für ihre vektorielle Translokation durch die permanente Assoziation an Bindungsstellen der Innen- oder Außenmembran im IMR zur Verfügung gestellt. Gut studierte Beispiele hierfür sind die Hämlyasen (Diekert et al., 1999; Steiner et al., 1995).

Andere Proteine dieser Gruppe kommen dagegen löslich im IMR vor und besitzen ein relativ geringes Molekulargewicht. In diesem Fall führt wahrscheinlich die Faltung der Proteine zum ständigen Verbleib im IMR („*folding trap*“-Mechanismus; Lutz et al., 2003). Ungefaltete Polypeptide passieren die Außenmembran durch die Pore des TOM-Komplexes, können allerdings in diesem Zustand vom IMR zurück ins Zytosol diffundieren. Erst die transiente Bindung an substratspezifische Rezeptorproteine im IMR und die Überführung in eine gefaltete

Konformation führt zur Nettotranslokation der Proteine in den IMR. Einige dieser Proteine wie z.B. Cytochrom *c* benötigen zur Faltung Kofaktoren. Apocytochrom *c* interagiert im IMR mit der Cytochrom *c* Hämlyase (CCHL), welche mit der inneren Membran assoziiert ist. CCHL transferiert eine Hämgruppe auf Cytochrom *c*, wodurch dessen Faltung und Freisetzung als Holocytochrom *c* induziert wird (Dumont et al., 1991; Dumont et al., 1988; Nargang et al., 1988). Weitere Proteine dieser Gruppe sind gekennzeichnet durch konservierte Cysteinreste, angeordnet in *tw*in CX<sub>3</sub>C- oder *tw*in CX<sub>9</sub>C-Motiven. Die Faltung dieser Proteine wird durch die Ausbildung von Disulfidbrücken induziert. Diese Proteine benutzen für ihren Import das kürzlich identifizierte Mia40/Erv1-System, das neben dem redoxregulierten Importrezeptor Mia40 die Sulfhydryloxidase Erv1 erfordert (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005; Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005). In den folgenden Kapiteln werden diese beiden essentiellen Komponenten näher beschrieben.

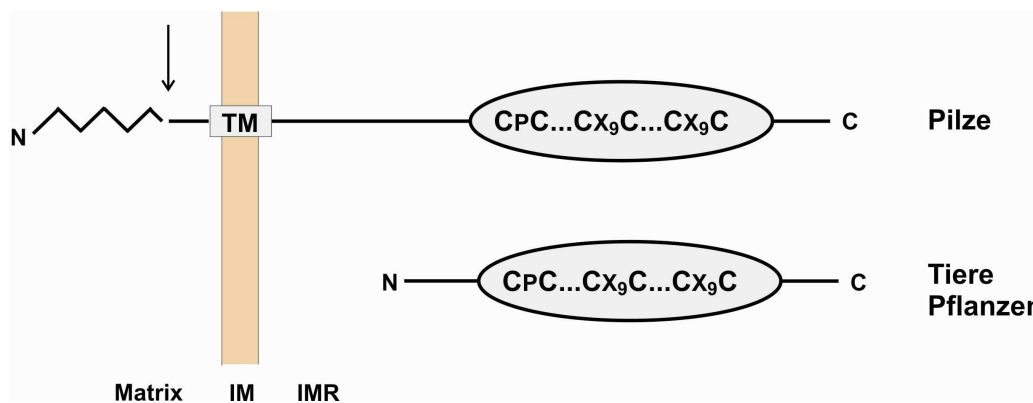
### **1.3.1 Mia40, Importrezeptor für cysteinreiche Proteine im Intermembranraum**

Die essentielle Bedeutung von Mia40 (*mitochondrial intermembrane space import and assembly*) für das Überleben der Zelle zeigt sich durch die Anwesenheit von Homologen in fast allen Eukaryoten von Pilzen über Pflanzen bis hin zum Menschen. Die Depletion von Mia40 in Hefezellen hemmt selektiv den Import von IMR-Proteinen mit konservierten Cysteinresten, wie den der kleinen Tim-Proteine, Cox17 und Cox19, und führt folglich zu verminderten endogenen Mengen dieser Proteine in Mitochondrien (Chacinska et al., 2004; Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005). Die Überexpression von Mia40 resultiert dagegen in gesteigerten Importraten der Proteine in Mitochondrien (Terziyska et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass Mia40 während des Importprozesses mit Substratproteinen über Disulfidbrücken interagiert (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005). In Gegenwart starker Reduktionsmittel wird die Ausbildung dieser Disulfidintermediate zwischen Mia40 und Substratproteinen verhindert, wodurch der Import der Proteine inhibiert wird (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005). Das bedeutet, dass die Bildung der Disulfidintermediate ein notwendiger Schritt in der Biogenese dieser IMR-Proteine ist. Mia40 scheint eine Rezeptorfunktion für seine Substratproteine auszuüben, nachdem sie über den TOM-Komplex transportiert worden sind.

In Pilzen werden die Mia40 Homologe mit mitochondrialem Sortierungssignal, gefolgt von einem hydrophoben Transmembransegment synthetisiert. Sie werden ATP- und membranpotentialabhängig über den TOM- und TIM23-Komplex importiert und mit dem hydrophoben Segment in der Innenmembran verankert, während sich der größte Teil der Proteine im IMR befindet (Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005). Die Membranbindung ist allerdings nicht essentiell für die Funktion von Mia40. Es konnte gezeigt werden, dass die IMR-Domäne die Deletion von Mia40 in Hefezellen komplementiert, wenn sie in den IMR importiert wird (Naoe et al., 2004). Im Laufe der Evolution scheint die funktionelle Relevanz der Membranbindung verloren gegangen zu sein. Homologen von Mia40 in höheren Eukaryoten fehlt sowohl das mitochondriale Sortierungssignal als auch das Transmembransegment (Hofmann et al., 2005). Sie werden als lösliche Proteine des IMR exprimiert. Trotz des fehlenden Proteinabschnittes kann humanes Mia40 das homologe Protein in Hefezellen funktionell ersetzen (Chacinska et al., 2008). Allen Homologen gemeinsam ist eine hochkonservierte C-terminale Domäne von etwa sechzig Aminosäureresten, welche sechs invariante Cysteinreste enthält. Diese Cysteinreste sind in einem CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C-Muster angeordnet (Abbildung 1.1). Die Funktion der einzelnen Cysteinreste war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, allerdings wurde der Austausch des ersten, zweiten oder dritten Paares gegen Serinreste als letal für Hefezellen beschrieben (Naoe et al., 2004). Es wurde beobachtet, dass Mia40 in Mitochondrien verschiedene Redoxzustände annehmen kann, was vermuten läßt, dass die Cysteinreste in Mia40 an Redoxreaktionen beteiligt sind (Hofmann et al., 2005; Mesecke et al., 2005). Mia40 liegt vor allem in einer oxidierten Form vor, welche durch Reduktionsmittel in eine reduzierte Form überführt werden kann (Mesecke et al., 2005). Der Redoxzustand von Mia40 scheint eine wichtige Rolle für den Import der Substratproteine zu spielen.





**Abbildung 1.1 Struktureller Aufbau von Mia40**

In Pilzen ist Mia40 über ein hydrophobes Transmembransegment (TM) in der Innenmembran (IM) von Mitochondrien verankert und enthält ein N-terminales Sortierungssignal, das von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase abgespalten wird (durch Pfeil angezeigt). In höheren Eukaryoten werden Mia40 Homologe als kürzere, lösliche Proteine des Intermembranraums (IMR) exprimiert. Allen Homologen gemeinsam ist eine hochkonservierte C-terminale Domäne, welche sechs invariante Cysteinreste enthält (graues Oval).

### 1.3.2 Erv1, eine Sulphydryloxidase im Intermembranraum

Vor kurzem wurde die Sulphydryloxidase Erv1 (*essential for respiration and vegetative growth*) als zweite essentielle Komponente des Mia40/Erv1-Systems identifiziert. Wurde Erv1 in Hefezellen herunter reguliert, führte dies zu verminderten Mengen solcher Proteine im IMR von Mitochondrien, die abhängig von Mia40 importiert werden, wie die kleinen Tim-Proteine und Cox17 (Allen et al., 2005; Mesecke et al., 2005; Rissler et al., 2005). Die reduzierten endogenen Mengen dieser Proteine sind Folge eines verminderten Imports der Proteine in Mitochondrien. Darüber hinaus ist in einer temperatursensitiven Mutante von Erv1 die Assemblierung der kleinen Tim-Proteine betroffen (Rissler et al., 2005).

Neben diesen Defekten zeigen Zellen ohne funktionelles Erv1 ein vermindertes Wachstum und Atmungsdefizienz sowie Veränderungen in der Morphologie und Verteilung von Mitochondrien (Becher et al., 1999; Lisowsky, 1994). Desweiteren wurde gezeigt, dass Erv1 eine Rolle im Export von Eisen-Schwefel-Clustern von Mitochondrien ins Zytosol spielt (Lange et al., 2001). Bei dem menschlichen Erv1 Homolog ALR (*augmenter of liver regeneration*) handelt es sich um



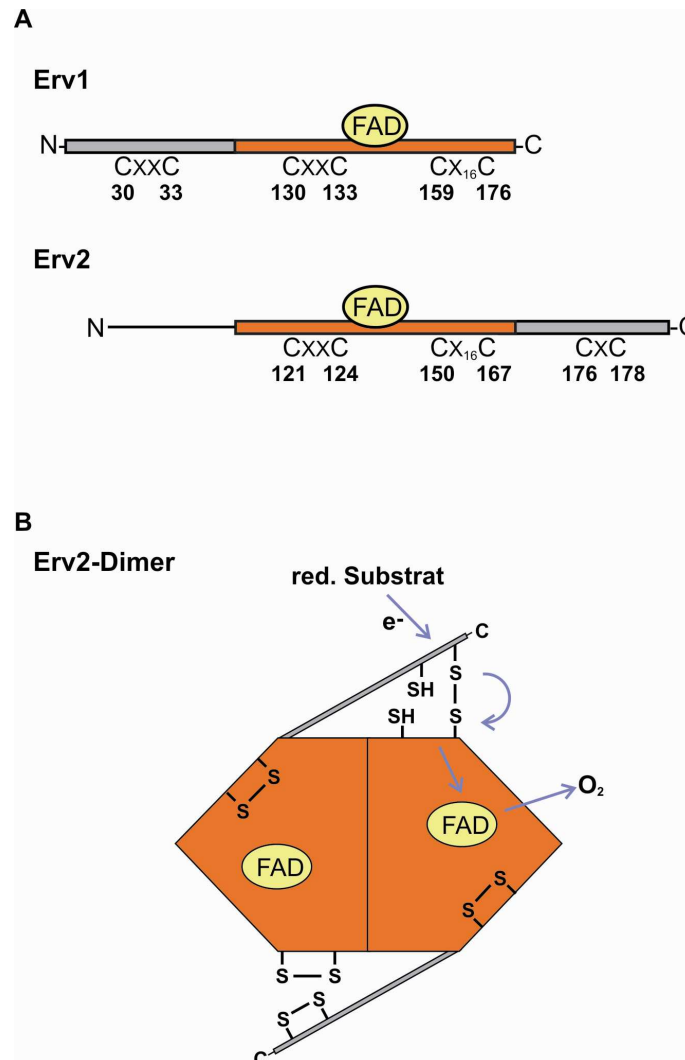
einen hepatotropen Wachstumsfaktor, dessen Wirkungsmechanismus jedoch nicht bekannt ist (Hagiya et al., 1994; Pawlowski und Jura, 2006).

Homologe von Erv1 sind in allen Eukaryoten zu finden. Zusammen mit Erv2, einer Thioloxygenase im Endoplasmatischen Retikulum von Pilzen und einigen Erv1-ähnlichen Sulfhydryloxygenasen in Viren bildet Erv1 die Klasse der Erv/ALR-Thioloxygenasen (Coppock und Thorpe, 2006; Fass, 2008; Gerber et al., 2001). Alle Proteine dieser Familie weisen eine konservierte FAD-Bindedomäne auf, die ein katalytisches Cysteinpaar in einem CXXC-Motiv enthält.

Erv1 in Hefe besteht aus zwei strukturellen Domänen. Das N-terminale Segment ist besonders flexibel durch die Anwesenheit vieler Glyzin- und Prolinreste. Dieser Bereich des Proteins ist nicht konserviert, enthält jedoch ein CXXC-Motiv, welches essentiell für die Funktion von Erv1 ist (Hofhaus et al., 1999). Die C-terminale Region ist konserviert und bildet die FAD-Bindedomäne (Abbildung 1.2A). Sie weist 30 % Sequenzidentität zur entsprechenden Domäne in Erv2 auf. Nahe dem Isoalloxazinring des nichtkovalent gebundenen FAD befinden sich die beiden katalytischen Cysteinreste des aktiven Zentrums. Erv1 und Erv2 enthalten zusätzlich zwei Cysteinreste in der konservierten Domäne, welche eine strukturelle Disulfidbrücke ausbilden. Erv2 trägt im Unterschied zu Erv1 einen flexiblen Arm mit einem CXC-Motiv am C-terminalen Ende des Proteins statt am N-Terminus. Röntgenstrukturanalysen von Erv1 aus *A.thaliana* und Erv2 aus *S.cerevisiae* haben gezeigt, dass diese Proteine Homodimere bilden, deren Untereinheiten intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden können (Gross et al., 2002; Lee et al., 2000; Vala et al., 2005). Basierend auf diesen Strukturen und auf Mutationsanalysen der Proteine wurde ein Mechanismus für die Oxidation von Substratproteinen durch Erv/ALR-Sulfhydryloxygenasen vorgeschlagen (Abbildung 1.2B). Dabei überträgt das oxidierte Cysteinpaar des flexiblen Arms Disulfidbrücken auf reduzierte Substratproteine. Die Regeneration dieses „shuttle“-Cysteinpaars erfolgt durch den Transfer von Elektronen auf das Cysteinpaar des aktiven Zentrums der gegenüberliegenden Untereinheit unter Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke. Die Rückbildung der Disulfidbrücke im aktiven Zentrum erfolgt durch Weiterleitung der Elektronen auf den Kofaktor FAD.

Die Reoxidation von Erv1 erfolgt *in vivo* über bislang zwei bekannte Elektronenakzeptorwege. Zum einen werden die Elektronen von FAD über Cytochrom *c* auf die Cytochrom *c* Oxidase transferiert. Zum anderen kann Erv1 Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen, wobei Wasserstoffperoxid entsteht (Allen et al., 2005; Bihlmaier et al., 2007; Dabir et al., 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Cytochrom *c* Peroxidase das entstandene Wasserstoffperoxid zu

Wasser reduzieren kann. Die Regeneration erfolgt durch die Elektronenaufnahme von reduziertem Cytochrom *c*, wodurch dieses ebenfalls regeneriert wird (Dabir et al., 2007).



**Abbildung 1.2** Struktureller Aufbau von Erv1 und Erv2 aus *S.cerevisiae*

A) Die konservierte FAD-Bindedomäne ist in orange, der flexible N- bzw. C-Terminus ist in grau dargestellt. Die Aminosäurepositionen der konservierten Cysteinreste sind angegeben.

B) Modell für die Übertragung der Elektronen im Erv2-Dimer. Die konservierte FAD-Bindedomäne ist in orange und der flexible C-Terminus in grau dargestellt. Die Übertragung von Elektronen ( $e^-$ ) ist durch blaue Pfeile gekennzeichnet. Elektronen werden von reduzierten Substratproteinen (red. Substrat) auf das „shuttle“-Cysteinpaar im flexiblen C-Terminus übertragen. Die Regeneration dieser Disulfidbrücke erfolgt durch Interaktion mit der katalytischen Disulfidbrücke in der FAD-Bindedomäne der gegenüberliegenden Erv2-

Untereinheit. Von diesen daraufhin reduzierten Cysteinresten werden die Elektronen über den gebundenen Flavin-Kofaktor (FAD) auf molekularen Sauerstoff übertragen.

### 1.3.3 Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems

Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems enthalten konservierte Cysteinreste. Es wurde gezeigt, dass diese Cysteinreste in den gefalteten Proteinen intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. Dieser Fund kam überraschend, da bisher angenommen wurde, dass der IMR ein dem Zytosol ähnliches und somit reduzierendes Milieu aufweist (Ostergaard et al., 2004). Allerdings decken sich diese Beobachtungen mit früheren Studien, die Proteine mit Disulfidbrücken im IMR identifizieren konnten (Hunte et al., 2000; Iwata et al., 1998; Iwata et al., 1996; Tsukihara et al., 1995). Übereinstimmend mit den Funden von Proteinen mit oxidierten Cysteinresten, liefert eine neue Studie Experimente, die nahelegen, dass der IMR ein oxidierenderes (-255 mV) Milieu aufweist als das Zytosol, welches ein Redoxpotential von -286 mV hat (Hu et al., 2008). Die Messungen deuten darauf hin, dass die Redoxhomöostase in Zytosol und IMR im Gegensatz zu bisherigen Annahmen unabhängig voneinander reguliert wird.

Typische Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems lassen sich anhand der spezifischen Anordnung der Cysteinreste zwei Gruppen zuordnen: Proteinen mit *twin* CX<sub>3</sub>C- oder mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven.

Die konservierte Familie der kleinen Tim-Proteine enthält zwei CX<sub>3</sub>C-Motive, welche durch 11-16 Aminosäurereste von einander getrennt sind (Koehler, 2004). In Hefe gibt es fünf Tim-Proteine: Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13. Sie assemblieren in hexamere Komplexe, welche entweder aus drei Tim9 und drei Tim10 Untereinheiten oder aus drei Tim8 und drei Tim13 Untereinheiten zusammengesetzt sind. Diese Komplexe fungieren als Chaperone für den Transport von hydrophoben Membranproteinen zur äußeren oder inneren Membran (Curran et al., 2002b). Die Röntgenstrukturanalyse des Tim9-Tim10-Komplexes zeigte, dass jede Untereinheit zwei interne Disulfidbrücken enthält, welche die beiden CX<sub>3</sub>C-Segmente verknüpfen, so dass eine Haarnadelstruktur gebildet wird (Webb et al., 2006). Die Ausbildung dieser intramolekularen Disulfidbrücken ist unerlässlich für die Assemblierung der kleinen Tim-Proteine in funktionelle Komplexe (Curran et al., 2002a; Lu et al., 2004a; Muller et al., 2008).

Der Import der kleinen Tim-Proteine ist jedoch nur in reduziertem Zustand möglich. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass die reduzierten Cysteinreste des *twin* CX<sub>3</sub>C-Motivs ein

Zinkfingermotiv bilden und Zinkionen koordinieren können (Hofmann et al., 2002; Paschen et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Möglicherweise binden kleine Tim-Proteine bereits im Zytosol direkt nach ihrer Synthese Zinkionen, welche in chaperonähnlicher Weise die für den Import nötige reduzierte Konformation stabilisieren (Lu und Woodburn, 2005; Morgan und Lu, 2008). Nach dem Import könnten die Zinkionen abgegeben werden, so dass der Einbau von Disulfidbrücken ermöglicht wird.

Proteine mit *twinn* CX<sub>9</sub>C-Motiven enthalten oft eine Domäne, in der zwei antiparallele Helices, welche jeweils ein CX<sub>9</sub>C-Motiv enthalten, über zwei Disulfidbrücken verknüpft sind. Ein gut charakterisiertes Beispiel dieser Gruppe ist Cox17, welches an der Assemblierung der Cytochrom *c* Oxidase beteiligt ist, indem es Kupfer (I) auf Sco1 und Cox11 überträgt (Hornig et al., 2004). Cox17 enthält sechs konservierte Cysteinreste und kann in drei verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen (Voronova et al., 2007). Strukturelle Studien haben gezeigt, dass die Fähigkeit Kupfer (I) zu binden vom Oxidationszustand der Cysteinreste abhängt (Palumaa et al., 2004). Die partiell oxidierte Konformation von Cox17 enthält zwei strukturelle Disulfidbrücken im *twinn* CX<sub>9</sub>C-Motiv, während zwei weitere Cysteinreste in einem KXCC-Motiv ein Kupfer (I)-Ion binden. Metalltransferexperimente haben gezeigt, dass diese Konformation einen spezifischen metallionenüberbrückten Komplex mit Sco1 ausbildet, was vermuten läßt, dass es sich dabei um die biologisch aktive Form von Cox17 handelt. In vollständig oxidiertem Cox17 bilden die nebeneinander liegenden Cysteinreste eine leicht zu reduzierende Disulfidbrücke aus, so dass kein Kupfer gebunden werden kann (Arnesano et al., 2005). Vollständig reduziertes Cox17 bildet oligomere Komplexe und bindet bis zu vier Kupferionen im Monomer (Srinivasan et al., 1998). Diese Form existiert vermutlich überwiegend im Zytosol, wo sie an der Speicherung von Kupfer beteiligt sein könnte (Arnesano et al., 2005; Voronova et al., 2007). Auch für den Import in Mitochondrien muß neu synthetisiertes Cox17 in vollständig reduziertem Zustand gehalten werden. Eine neue Studie konnte zeigen, dass reduziertes Cox17 zwei Zinkionen binden kann, wodurch das Protein vor Oxidation im Zytoplasma geschützt werden könnte (Palumaa und Zovo, 2008).

**Tabelle 1.1 Bekannte Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems**

<b>Substratproteine mit</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
<b>a) <i>twin</i> CX<sub>3</sub>C-Motiv</b>		
Tim8	Untereinheit des TIM8-TIM13-Komplexes	Chacinska et al., 2004
Tim9	Untereinheit des TIM9-TIM10-Komplexes	Chacinska et al., 2004; Naoe et al., 2004
Tim10	Untereinheit des TIM9-TIM10-Komplexes	Chacinska et al., 2004; Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005
Tim12	Untereinheit des TIM22-Komplexes	Naoe et al., 2004
Tim13	Untereinheit des TIM8-TIM13-Komplexes	Chacinska et al., 2004; Terziyska et al., 2005
<b>b) <i>twin</i> CX<sub>9</sub>C-Motiv</b>		
Cox17	Kupferchaperon der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	Chacinska et al., 2004; Terziyska et al., 2005; Mesecke et al., 2005
Cox19	Assemblierungsfaktor der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	Chacinska et al., 2004
Mic14	nicht bekannt	Gabriel et al., 2006
Mic17	nicht bekannt	Gabriel et al., 2006
Mdm35	mitochondriale Morphologie und Verteilung	Gabriel et al., 2006

## 1.4 Disulfidbrückenbildende Systeme

Disulfidbrücken spielen für die Biogenese, Struktur und Funktion von Proteinen eine wesentliche Rolle. Proteine werden an Ribosomen als lineare Polypeptidketten synthetisiert, welche sehr schnell in ihre, in der Primärsequenz kodierten, dreidimensionale Struktur falten. Eine fehlerlose

Faltung ist notwendig für die biologische Funktion aller Proteine. Dabei sind häufig die Thiolgruppen von Cysteinresten wichtig: durch die kovalente Interaktion zweier Thiolgruppen können während der Proteinfaltung Disulfidbrücken ausgebildet werden. Diese dienen meistens der Stabilisierung des Proteins, indem sie die Entropie der ungefalteten Konformation vermindern und so die gefaltete Form gegenüber der ungefalteten begünstigen (Thornton, 1981). Je größer die Anzahl der Aminosäurereste zwischen den brückenbildenden Cysteinresten ist, desto größer ist die der nativen Proteinstruktur vermittelte Stabilität (Pace et al., 1988). Fehler in der Disulfidbrückenbildung können durch Disulfidisomerasen korrigiert werden oder führen zu Aggregation und nachfolgendem Abbau des Proteins. Eine vergleichsweise kleine Gruppe an Disulfidbrücken dient der Funktion des Proteins. Sie können in katalytische und allosterische Disulfidbrücken unterteilt werden. Katalytische Disulfidbrücken befinden sich typischerweise im aktiven Zentrum von sogenannten Oxidoreduktasen. Diese Enzyme können Dithiole oder Disulfidbrücken übertragen und so zu Reduktion, Oxidation oder Isomerisierung von Substratproteinen führen. Allosterische Disulfidbrücken regulieren die Funktion von Proteinen durch Änderungen in der Proteinstruktur, wenn diese Brücken geöffnet oder gebildet werden (Hogg, 2003; Schmidt et al., 2006).

Die Bildung von Disulfidbrücken wird durch verschiedene kinetische und thermodynamische Faktoren beeinflusst. Zum einen hängt sie sehr stark vom lokalen pH-Wert ab, da das Thiolat-Anion ( $S^-$ ) wesentlich reaktiver als die protonierte Form (SH) ist. Zum anderen wird sie zusätzlich von der Zugänglichkeit, Aminosäureumgebung und Reaktivität der Thiolgruppen und Disulfidbrücken beeinflusst.

Disulfidbrücken können spontan durch molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel gebildet werden. Allerdings ist diese Reaktion sehr langsam und kann nicht die effiziente Disulfidbrückenbildung in der Zelle erklären. Die Suche nach einer Ursache für diese Diskrepanz führte zu Anfinnsens Entdeckung des ersten Katalysatoren für die Bildung von Disulfidbrücken: der Proteindisulfidisomerase (PDI).

### **1.4.1 Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum**

Die Bildung von Disulfidbrücken ist ein wichtiger Schritt in der Faltung und Assemblierung vieler sezernierter Proteine. Im Lumen des ER wurden zwei Proteine identifiziert, die primär verantwortlich für die Kontrolle des Prozesses der oxidativen Proteinfaltung sind: das lösliche

thioredoxin-ähnliche Protein PDI und das membranassoziierte Flavoprotein Ero1 (Fränd und Kaiser, 1998; Goldberger et al., 1963; Pollard et al., 1998).

Abhängig von der Redoxumgebung kann PDI Disulfidbrücken in Substratproteine einführen, nichtnative Disulfidbrücken isomerisieren oder Disulfidbrücken reduzieren, um den Abbau von falsch gefalteten Proteinen zu ermöglichen (Wilkinson und Gilbert, 2004). PDI enthält zwei katalytische Thioredoxindomänen mit jeweils einem Cys-Gly-His-Cys-Motiv in den beiden aktiven Zentren (Tian et al., 2006). Der Redoxstatus der Cysteinreste im aktiven Zentrum bestimmt die jeweilige Reaktion, die durch eine Oxidoreduktase katalysiert wird. In Hefe liegen die Cysteinreste der aktiven Zentren von PDI größtenteils oxidiert vor, was darauf schließen läßt, dass PDI vor allem als Oxidase fungiert. Durch die Übertragung von Disulfidbrücken auf Substratproteine werden die Cysteinreste im aktiven Zentrum von PDI reduziert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Reaktion ist die Reoxidation von PDI, um die intramolekulare Disulfidbrücke im aktiven Zentrum zu regenerieren (Lyles und Gilbert, 1991). Zunächst glaubte man, dass oxidiertes Glutathion (GSSG) verantwortlich für die Oxidation von PDI sei, da im ER der Redoxpuffer aus reduziertem Glutathion (GSH) und GSSG mit einem Verhältnis von etwa drei zu eins stärker oxidierend ist als im Zytosol (Hwang et al., 1992). In genetischen Screens in Hefe wurde später allerdings das konservierte Protein Ero1 als essentielle Komponente der oxidativen Proteinfaltung im ER identifiziert, welches PDI direkt oxidieren kann (Fränd und Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Ero1 katalysierte Oxidation von Substraten mittels PDI *in vitro* schneller abläuft als durch PDI in Gegenwart eines optimalen Glutathion-Redoxpuffers (Tu et al., 2000). Außerdem kann die Ero1 vermittelte Oxidation von Substraten *in vivo* und *in vitro* auch in Abwesenheit von GSH stattfinden (Cuozzo und Kaiser, 1999; Tu et al., 2000).

Ero1 enthält zwei Cysteinpaare, die an der Oxidation von PDI beteiligt sind (Bertoli et al., 2004; Fränd und Kaiser, 2000; Gross et al., 2004). Die sogenannten „shuttle“ Cysteinreste nehmen Elektronen von PDI auf und werden vom Cysteinpaar des aktiven Zentrums reoxidiert (Sevier und Kaiser, 2006b). Mit Hilfe des Kofaktors FAD werden die Elektronen schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen (Tu und Weissman, 2002; Abbildung 1.3A). Das würde bedeuten, dass durch die Ero1 Aktivität für jede gebildete Disulfidbrücke ein Molekül Wasserstoffperoxid entsteht (Gross et al., 2006). In welchem Ausmaß Ero1 tatsächlich an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt ist, wird diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Regulation der Ero1 Aktivität über zwei nichtkatalytische



„regulatorische“ Disulfidbrücken Abweichungen der Redoxhomöostase im ER entgegen wirkt (Sevier et al., 2007).

In Pilzen gibt es neben Ero1 die Erv/ALR-Sulfhydryloxidase Erv2, welche als Oxidase von PDI fungieren kann (Gerber et al., 2001; Gross et al., 2002; Sevier et al., 2001). Trotz der fehlenden Sequenzübereinstimmung sind Ero1 und Erv2 nicht nur funktionell, sondern auch strukturell sehr ähnlich (Gross et al., 2004; Gross et al., 2002). Erv2 bindet wie Ero1 FAD als Kofaktor. Die Übertragung von Disulfidbrücken wird ebenfalls von einem „shuttle“ Cysteinpaar und einem Cysteinpaar im aktiven Zentrum nahe des gebundenen FAD vermittelt. Die Deletion von ERO1 kann zwar durch Überexpression von Erv2 komplementiert werden (Sevier et al., 2001), jedoch führt die Deletion von Erv2 nur zu einem milden Phänotyp. Dies spricht für eine wesentliche Rolle von Ero1 in der Proteinoxidation, während die physiologische Funktion von Erv2 als Oxidase auf nichtessentielle Substratproteine oder bestimmte Wachstumsbedingungen limitiert zu sein scheint.

#### **1.4.2 Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma von Bakterien**

In Gram-negativen Zellen findet die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma statt. Im Gegensatz zum Ablauf in Eukaryoten gibt es in Bakterien zwei getrennte Mechanismen zur Oxidation und zur Isomerisierung von Substratproteinen (Abbildung 1.3B). Disulfidbrücken werden sehr schnell, jedoch unspezifisch von dem löslichen thioredoxin-ähnlichen Protein DsbA (*disulfide bond*), dem Homolog zu PDI, eingeführt (Bardwell et al., 1991). Die Reoxidation von reduziertem DsbA wird durch das Membranprotein DsbB katalysiert. Durch die Reduktion von Quinonen, welche die Elektronen auf die Atmungskette übertragen, kann DsbB Disulfidbrücken *de novo* bilden (Bader et al., 1999; Kobayashi und Ito, 1999). DsbB enthält zwei periplasmatische Domänen, welche je ein katalytisches Cysteinpaar besitzen. Die Röntgenstrukturanalyse des *E.coli* DsbB-DsbA Komplexes zeigte, dass DsbA mit einem dieser Cysteinpaare interagiert (Inaba et al., 2006).

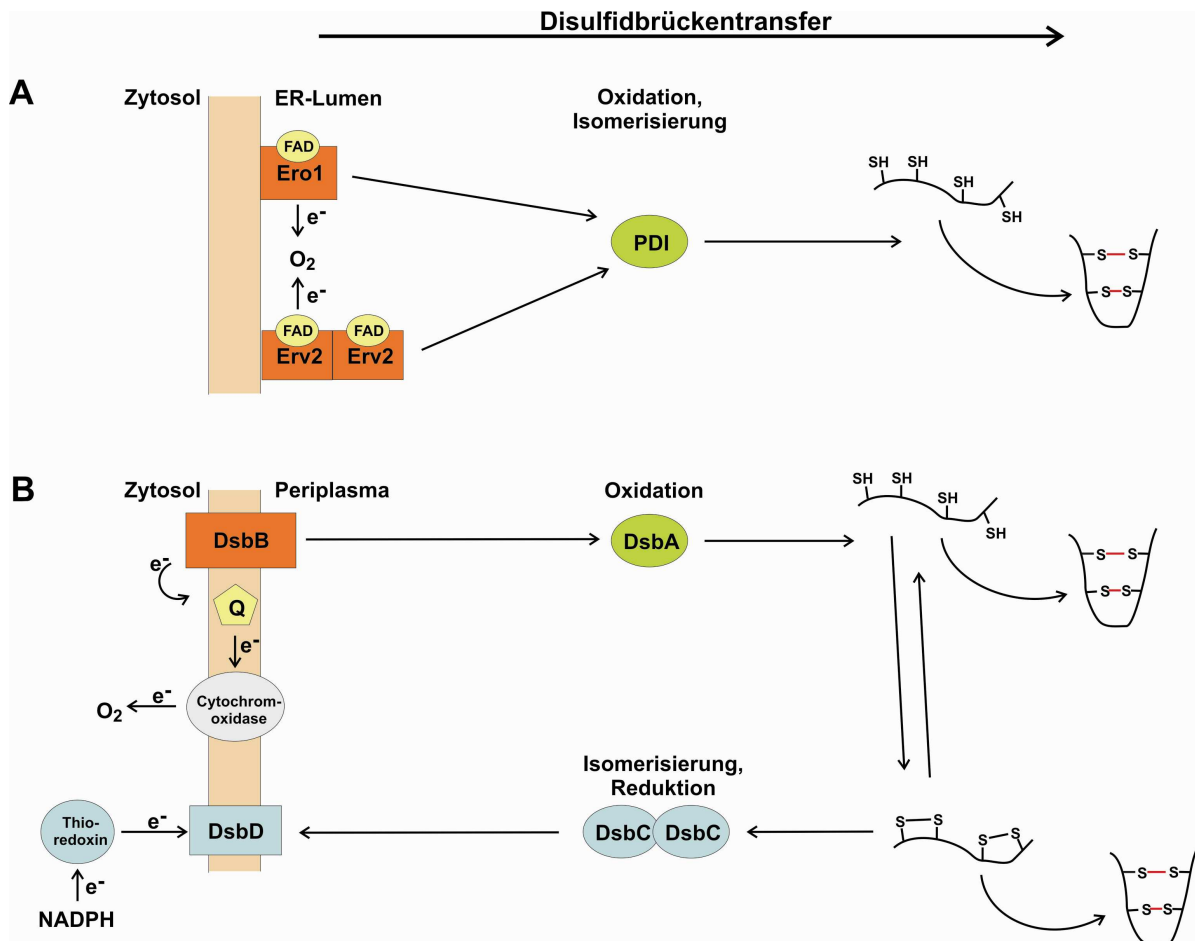
DsbA ist mit einem Redoxpotential von -120 mV eine der stärksten bekannten Oxidoreduktasen (Zapun et al., 1993). Daher verwundert es nicht, dass DsbA auch falsche Disulfidbrücken in Substratproteine einbaut. Ein Modell für die Funktion von DsbA besagt, dass DsbA unspezifisch in der Sequenz aufeinanderfolgende Cysteinreste oxidiert, sobald sie in das Periplasma sezerniert werden (Berkmen et al., 2005). Die Korrektur falscher Disulfidbrücken erfolgt durch die



Isomeraseaktivität des Proteins DsbC und vermutlich einer zweiten Isomerase DsbG, welche mit DsbC 24% Sequenzidentität aufweist (Missiakas et al., 1994). Die Eigenschaft von DsbC spezifisch an der Expression von Proteinen beteiligt zu sein, welche Disulfidbrücken aus nichtaufeinanderfolgenden Cysteinresten enthalten, spricht für die Isomerasefunktion von DsbC (Hiniker und Bardwell, 2004). Es gibt verschiedene Möglichkeiten wie DsbC falsche Disulfidbrücken isomerisieren könnte. DsbC greift die falsch geknüpfte Brücke an und bildet eine gemischte Disulfidbrücke, welche sofort in der richtigen Anordnung zurück auf das Substratprotein übertragen wird. Alternativ kann die gemischte Disulfidbrücke auch durch den Angriff des zweiten Cysteinrestes im aktiven Zentrum von DsbC gelöst werden. Dadurch wird DsbC oxidiert und das Substratprotein reduziert, welches anschließend durch DsbA wieder oxidiert werden kann. Verschiedene Beobachtungen sprechen für letzteren Mechanismus (Rietsch et al., 1997).

Die katalytisch aktive reduzierte Form von DsbC wird durch das Innenmembranprotein DsbD regeneriert, indem DsbD Elektronen vom Zytoplasma über die innere Membran auf DsbC überträgt (Collet et al., 2002; Katzen und Beckwith, 2000; Missiakas et al., 1995). DsbD selbst wird durch zytoplasmatisches Thioredoxin reduziert, welches über die Thioredoxin-Reduktase Elektronen von NADPH erhält (Rietsch et al., 1996).

Da sich die Komponenten für die Oxidation (DsbB-DsbA) und Reduktion (DsbD-DsbC/DsbG) im selben zellulären Kompartiment befinden, muß die Oxidation von DsbC durch DsbB verhindert werden. Dimerisierung von DsbC scheint die Cysteinreste im aktiven Zentrum zu schützen, da verkürzte Versionen von DsbC ohne Dimerisierungsdomäne *in vivo* und *in vitro* von DsbB oxidiert werden können (Bader et al., 2001).



**Abbildung 1.3 Systeme der oxidativen Proteinfaltung**

**A)** Im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) von eukaryotischen Zellen überträgt die Proteindisulfidisomerase (PDI) Disulfidbrücken auf sekretorische Substratproteine. PDI wird durch die membranassoziierte Oxidase Ero1 oder in Pilzen auch von Erv2 reoxidiert. Elektronen werden von beiden Proteinen über den Kofaktor FAD auf molekularen Sauerstoff übertragen.

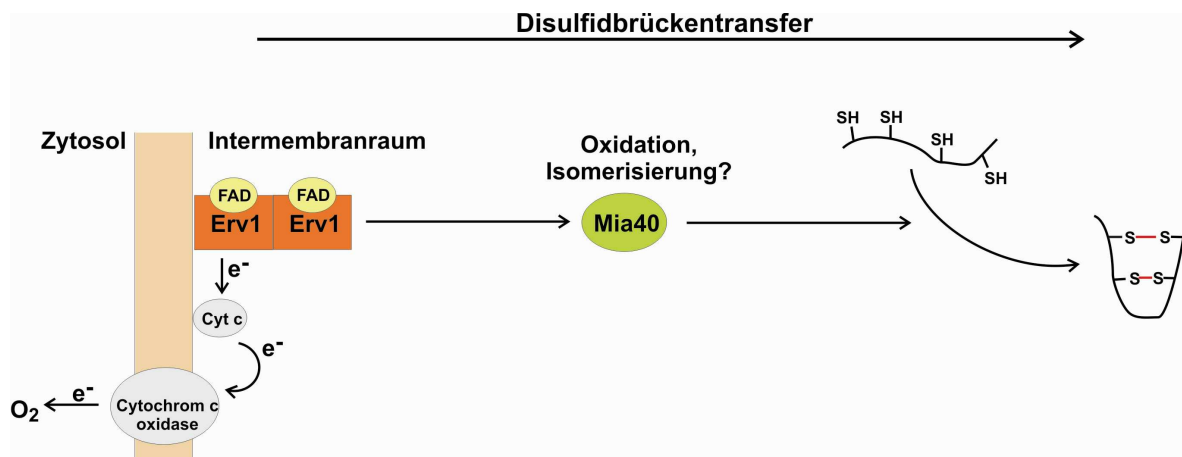
**B)** In prokaryotischen Zellen findet Disulfidbrückenbildung im Periplasma statt. Die lösliche Oxidoreduktase DsbA führt unspezifisch Disulfidbrücken in Substratproteine ein und wird dadurch reduziert. Die Reoxidation von DsbA wird durch das Membranprotein DsbB vermittelt. Elektronen werden von DsbB durch Quinone (Q) auf Cytochromoxidasen und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen. Falsch gebildete Disulfidbrücken können durch DsbC entweder isomerisiert werden oder reduziert und von DsbA wieder oxidiert werden. Durch das Membranprotein DsbD wird DsbC in reduziertem Zustand gehalten. NADPH dient als Elektronendonator, welcher die Elektronen über Thioredoxin auf DsbD überträgt.

### 1.4.3 Bildung von Disulfidbrücken im Intermembranraum von Mitochondrien

Wie bereits beschrieben, gibt es im IMR von Mitochondrien Proteine, die Disulfidbrücken enthalten. Basierend auf Vergleichen von Primärsequenzen wurden jedoch keine Homologe zu DsbA und DsbB gefunden, welche die Oxidation von Proteinen in diesem dem Periplasma entsprechenden Kompartiment vermitteln. Da sowohl Mia40 als auch Erv1 essentiell für die Biogenese von IMR-Proteine mit Disulfidbrücken sind, liegt die Vermutung nahe, dass das Mia40/Erv1-System nicht nur am Import, sondern auch an der oxidativen Faltung dieser Proteine beteiligt ist. Verschiedene Beobachtungen sprechen für ein Modell in dem Disulfidbrücken von Mia40 und Erv1 auf Substratproteine übertragen werden (Abbildung 1.4).

Für den Import der Substratproteine und die Bildung transienter Disulfidintermediate mit ihnen wird Mia40 in oxidierte Form benötigt. Wurde Mia40 reduziert und freie Thiolgruppen mit N-Ethylmaleimid blockiert, war der Import fast vollständig inhibiert (Mesecke et al., 2005). Möglicherweise werden die gebildeten intermolekularen Disulfidbrücken durch eine Isomerisierungsreaktion auf Substratproteine übertragen.

Eine oxidierende Funktion von Erv1 im Importprozess zeigte sich in Erv1-depletierten Mitochondrien durch die erhöhte Sensitivität des Imports von Substratproteinen gegenüber Reduktionsmitteln (Mesecke et al., 2005). Zudem war die Bildung der Disulfidintermediate zwischen Mia40 und Substratproteinen betroffen, woraus sich schließen ließ, dass die Anwesenheit von Erv1 notwendig für die effiziente Bildung der Disulfidintermediate mit importierten Substratproteinen ist. Der Nachweis einer Interaktion von Erv1 mit Mia40 und die Beobachtung, dass Mia40 in Erv1-depletierten Mitochondrien vermehrt in der reduzierten Form akkumuliert, führten zu der Annahme, dass Erv1 die oxidierte Form von Mia40 regeneriert (Mesecke et al., 2005). Bislang fehlen jedoch Experimente, die den direkten Disulfidbrückentransfer von Erv1 auf Mia40 und von Mia40 auf Substratproteine belegen können.



**Abbildung 1.4 Modell der Disulfidbrückenbildung im Intermembranraum**

Dem Modell zufolge ist im Intermembranraum von Mitochondrien der Import reduzierter Substratproteine über Mia40 an die oxidative Proteinfaltung gekoppelt. Die von Substratproteinen auf Mia40 übertragenen Elektronen werden durch das von Erv1 gebundene FAD auf Cytochrom *c* (Cyt *c*) transferiert und dadurch in die Atmungskette eingeschleust.

Für die Ausbildung von Disulfidbrücken in einigen Substratproteinen könnte neben Mia40 und Erv1 mit Hot13 eine weitere Komponente wichtig sein, für die eine Beteiligung an der Redoxregulation im IMR vorgeschlagen wurde. Hot13 wurde ursprünglich als Interaktionspartner der kleinen Tim-Proteine identifiziert und entsprechend *helper of Tim* benannt (Curran et al., 2004). Im Gegensatz zu Mia40 und Erv1 ist Hot13 nicht essentiell für Hefezellen. Mitochondrien eines  $\Delta hot13$ -Hefestammes weisen jedoch geringere Mengen der kleinen Tim-Proteine und Tim22 auf. Insbesondere die Assemblierung der kleinen Tim-Proteine in ihre Komplexe scheint durch das Fehlen funktionellen Hot13 beeinträchtigt zu sein (Curran et al., 2004). Die Deletion von Hot13 führt zudem zu vermindertem Wachstum der Zellen in Gegenwart des Oxidationsmittels t-Butylhydroperoxid, was eine Beteiligung von Hot13 an Redoxprozessen vermuten lässt (Curran et al., 2004).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen das Substratspektrum des Mia40/Erv1-Systems untersucht werden. Neben bekannten Mia40-Substratproteinen mit *twin CX<sub>3</sub>C*- und *twin CX<sub>9</sub>C*-Motiven gibt es weitere cysteinreiche Proteine im IMR, die Disulfidbrücken ausbilden. Es sollte geklärt werden, ob die Funktion von Mia40 nur auf Substratproteine mit den genannten Cysteinmotiven beschränkt ist oder ob es zusätzliche Substrate gibt.

Zum anderen sollte der molekulare Mechanismus des Mia40/Erv1-Systems und seine Rolle bei der oxidativen Faltung von IMR-Proteinen charakterisiert werden. In Mitochondrien kommt Mia40 in verschiedenen Redoxzuständen vor, die vermutlich an Redoxreaktionen während der Biogenese von Substratproteinen beteiligt sind. Sowohl für die oxidierte als auch für die reduzierte Form von Mia40 ist bislang nicht bekannt, wieviele Disulfidbrücken vorliegen und zwischen welchen Cysteinresten sie gebildet werden. Um den Mechanismus von Mia40 zu verstehen, ist es wichtig, diese Redoxzustände auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

Mia40 bildet sowohl mit Erv1 als auch mit Substratproteinen Disulfidintermediate aus. Es könnte daher die zentrale Komponente eines Disulfidtransfersystems darstellen, welches Disulfidbrücken in Substratproteine einbaut. Bisher konnte allerdings ein solcher Disulfidbrückentransfer nicht gezeigt werden. Anhand gereinigter Komponenten sollte getestet werden, ob Mia40 durch Erv1 oxidiert werden kann und es möglich ist, ein Disulfidtransfersystem aus Mia40 und Erv1 zu rekonstituieren, welches Disulfidbrücken auf Substratproteine überträgt. Die Etablierung eines rekonstituierten Systems ermöglicht die Beantwortung weiterer Fragen zum Mechanismus des Disulfidtransfers. Es sollte zum einen adressiert werden, ob zusätzliche Faktoren wie Metallionen und Hot13 das System beeinflussen. Zum anderen sollte untersucht werden, welche Rolle die einzelnen Cysteinreste bzw. die in Mia40 gebildeten Disulfidbrücken für die Funktion von Mia40 spielen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Kleine Mengen DNS wurden durch enzymatische und alkalische Lyse von *E. coli* Zellen gewonnen. Dazu wurden 2 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1,5 ml der Kultur wurden für 20 s bei 7500 g präzipitiert und in 250 µl Lösung 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose, 100 mg/ml RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und vorsichtiges Mischen wurden die Zellen für 5 min bei RT alkalisch lysiert. Die Probe wurde dann mit 250 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) neutralisiert. Ausgefällte Proteine und chromosomale DNS wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 35000 g abgetrennt. Zur Präzipitation der Plasmid-DNS wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol (96%) versetzt und für 30 min (35000 g, RT) zentrifugiert. Die Probe wurde anschließend mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes bei RT getrocknet. Die DNS wurde in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst.

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNS wurde das *Pure-Yield*<sup>®</sup> *Plasmid Midiprep* System der Firma Promega verwendet. Ausgehend von 50 ml einer Übernachtskultur in LB<sub>Amp</sub>-Medium, wurde die DNS nach Anleitung des Herstellers präpariert.

#### 2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden Gene oder Genabschnitte aus *S. cerevisiae* als DNS-Fragmente amplifiziert. Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt 100 µM der Desoxynukleosid-5'-triphosphate, 1 µl der entsprechenden Primer (100 pmol/µl), 1 U *Taq* DNS-Polymerase und 0,5 U *Pfu* DNS-Polymerase in dem vom Hersteller mitgelieferten PCR-Puffer (1% Triton X-100, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.8). Abhängig vom Experiment wurden entweder 10 ng Plasmid-DNS oder 100 ng genomische DNS als Matrize verwendet. Zum Überprüfen von Klonierungen mittels PCR wurden einzelne *E. coli*-Kolonien in 15 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und 1 µl dieser Suspension als Matrize verwendet.

Zunächst wurde der DNS-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert. Dann wurden 30-35 Zyklen durchlaufen, die aus Denaturierung der DNS (30 s bei 95°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 5°C unter der Anlagerungstemperatur  $T_m$  der Primer) sowie DNS-Synthese (1 min pro Kilobase bei 72°C) bestanden. Die DNS-Synthese wurde durch eine 10 minütige Inkubation bei 72°C vervollständigt. Die  $T_m$  der Primer wurde nach der „4+2“-Regel abgeschätzt ( $T_m = 2^\circ\text{C pro A/T} + 4^\circ\text{C pro G/C}$ ). Amplifizierte DNS-Fragmente wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.5) gereinigt.

### 2.1.3 Restriktionsverdau von DNS

Ein Restriktionsverdau diente zum einen der Überprüfung isolierter Plasmide mit Hilfe einer Restriktionslängen-Analyse. Andererseits wurden DNS-Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden, geschnitten, um sie anschließend in Vektoren zu ligieren (siehe 2.1.4). Dazu wurde DNS durch Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Reaktionspuffern geschnitten. Für 1 µg DNS wurden 2-5 U Enzym eingesetzt und der Ansatz für 3 h bei der für die Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Die geschnittene DNS wurde dann entweder über ein präparatives Agarosegel oder direkt über DNS-bindende Silica-Säulen (Qiagen oder Peqlab) gereinigt.

### 2.1.4 Ligation

Zur Ligation eines mit einem Restriktionsenzym geschnittenen DNS-Fragments mit einem linearisierten Vektor wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 benutzt. In 10 µl Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% (w/v) PEG 8000) wurden 100-200 ng Vektor mit einem 3-10 fachen molaren Überschuss des DNS-Fragments gemischt. Zwei U T4-Ligase wurden zugegeben und der Reaktionsansatz 1 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. 1 µl der ligierten DNS wurde verwendet, um elektrokompetente *E. coli* Zellen zu transformieren.

## **2.1.5 Reinigung und Analyse von DNS**

### **2.1.5.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNS**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNS-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Gele eines Agarosegehalts von 0,8-2% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-acetat pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, um die aufgetrennten DNS-Fragmente in UV-Licht sichtbar zu machen. Die DNS-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Auftragspuffer (30% (w/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 mM EDTA) gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei einer von der Gelgröße abhängigen Spannung von 60-140 V durchgeführt.

### **2.1.5.2 Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

Das gewünschte DNS-Fragment wurde mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des *E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kits* (Pqqlab) isoliert. Die Extraktion der DNS aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNS wurde in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O eluiert und 1 µl auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen, um die Effizienz der Reinigung zu überprüfen.

### **2.1.5.3 Bestimmung der DNS-Konzentration**

Die Konzentration von DNS-Proben wurde durch Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS und 33 µg/ml einzelsträngiger DNS. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## **2.1.6 Transformation elektrokompenter *E.coli* Zellen**

### **2.1.6.1 Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen**

Um elektrokompente *E. coli* Zellen (MH1 oder XL1blue) zu gewinnen, wurden 500 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli* Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 5 min bei 2000 g (4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen



hintereinander mit 400 ml, 200 ml und 4 ml kaltem 10% Glycerol gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 500  $\mu$ l 10% Glycerol resuspendiert, in Aliquots von 45  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

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

Zur Transformation von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation wurde 1  $\mu$ l Ligationsansatz oder Plasmid-DNS mit 45  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt. Die Zellen wurden in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann in einem Elektroporationsapparat (Gene Pulser, Biorad) einem Stromstoß (2,5 kV, 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml LB-Medium verdünnt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30-60 min unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor sie dann auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen wurden. Die Platten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.

### 2.1.6.3 Verwendete *E.coli* Stämme

Für Klonierungen wurde der *E.coli* Stamm MH1 verwendet. Für die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* wurde der *E.coli* Stamm BL21(DE3) oder XL1blue verwendet.

Genotyp des *E.coli* Stammes:

**MH1:** MC1061 Derivat; *araD139, lacX74, galU, galK, hsr, hsm+*, *strA*

**XL1blue:** *E. coli* K12, *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*,  
{F', *proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*}

**BL21(DE3):** *E. coli* B, F-, *ompT, hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), galλ dcm* (DE3)

### 2.1.6.4 Verwendete Medien für die Anzucht von *E.coli*

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

LB<sub>Amp</sub>-Medium: LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin

LB<sub>Kan</sub>-Medium: LB-Medium mit 30  $\mu$ g/ml Kanamycin

LB<sub>Amp</sub>-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin

### 2.1.7 Verwendete Plasmide

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Transkription und Translation radioaktiv markierter Proteine, sowie für die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* mit Referenz angegeben.

**Tabelle 2.1 Verwendete Plasmide**

Plasmid	Referenz
<b>Transkription/Translation</b>	
pGEM4-Tim13	Lutz et al., 2003
pGEM4-Su9(1-69)DHFR	Pfanner et al., 1987
pGEM3-Erv1	Terziyska et al., 2007
pGEM4-Erv1 C30S	Terziyska et al., 2007
pGEM4-Erv1 C30,33S	Terziyska et al., 2007
pGEM4-Erv1 C133S	Terziyska et al., 2007
<b>Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i></b>	
pGEX-6P-1-Mia40(284-403)	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C1,2S	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C1S	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C2S	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C3S	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C6S	Terziyska et al., 2009
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C4,5S	Nadia Terziyska, unveröffentlicht
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C3,6S	Terziyska et al., 2009
pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C5,6S	Nadia Terziyska, unveröffentlicht
pGEX-6P-1-Tim10	Diese Arbeit
pET24a+-Erv1	Lee et al., 2000
pMAL-cR-I-Hot13	Mesecke et al., 2008
pQE-40-Su9(1-69)DHFR	Stan et al., 2000

### 2.1.8 Klonierungsstrategien

#### Klonierung von pGEX-6P-1-Mia40(284-403)

Die Aminosäuren 284 bis 403 von Mia40 wurden mittels PCR von pGEM4-Mia40 (erhalten von Nadia Terziyska) mit den Primern Mia40For850BamHI und Mia40Sc\_StBglXho amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 (GE-Healthcare) kloniert.

**Mia40For850BamHI** 5'-CTC GGA TCC GCT TAT AAC CCA GAC ACT GG-3'

**Mia40Sc\_StBglXho** 5'-CTC CTC GAG AGA TCT TTA AGG TTT GGA TTC CTC  
ATT C-3'

#### Klonierung von pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C1,2S

Die Aminosäuren 284 bis 403 von Mia40 wurden mit den Primern Mia40For850BamHI und Mia40Sc\_StBglXho von dem Plasmid pGEM4-Mia40-His-C1,2S (erhalten von Nadia Terziyska) amplifiziert und mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 eingefügt.

#### Klonierung von pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C1S

Die Aminosäuren 284 bis 403 von Mia40 wurden mittels PCR von dem Plasmid pGEM4-Mia40 C1S (erhalten von Christian Kozany) mit den Primern Mia40For850BamHI und Mia40Sc\_StBglXho amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert.

#### Klonierung von pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C2S

Die Aminosäuren 284 bis 403 von Mia40 wurden mittels PCR von dem Plasmid pGEM4-Mia40 C2S (erhalten von Christian Kozany) mit den Primern Mia40For850BamHI und Mia40Sc\_StBglXho amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert.

#### Klonierung von pGEX-6P-1-Mia40(284-403) C3S

Die Aminosäuren 284 bis 403 von Mia40 wurden mittels PCR von dem Plasmid pGEM4-Mia40 C3S (erhalten von Christian Kozany) mit den Primern Mia40For850BamHI und

Mia40Sc\_StBglXho amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert.

#### **Klonierung von pGEX-6P-1-Tim10**

Tim10 wurde mittels PCR von dem Plasmid pGEM4-Tim10 (erhalten von Nadia Terziyska) mit den Primern *Bam*HI\_Tim10for und Tim10St\_EcoRI amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert.

**BamHI\_Tim10for** 5'-CTC GGA TCC TCT TTC TTA GGT TTC GGT GG-3'

**Tim10St\_EcoRI** 5'-GAG GAA TTC CTA AAA CTT ACC GGC TGC-3'

#### **Klonierung von pGEM4-Erv1 C30S**

Erv1 wurde mit den Primern Erv1-N und Erv1-C mittels PCR von dem Plasmid pYX142-Erv1 C30S (erhalten von Melanie Bien) amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in den Vektor pGEM4 kloniert.

**Erv1-N** 5'-CTC GGA TCC ACC ATG AAA GCA ATA GAT AAA ATG-3'

**Erv1-C** 5'-CTC CTG CAG TTA TTC GTC CCA GCC GTC C-3'

#### **Klonierung von pGEM4-Erv1 C30,33S**

Erv1 wurde mit den Primern Erv1-N und Erv1-C mittels PCR von dem Plasmid pYX142-Erv1 C30,33S (erhalten von Melanie Bien) amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in den Vektor pGEM4 kloniert.

#### **Klonierung von pGEM4-Erv1 C133S**

Erv1 wurde mit den Oligonukleotiden Erv1-N und Erv1-C mittels PCR von dem Plasmid pYX142-Erv1 C133S (erhalten von Melanie Bien) amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in den Vektor pGEM4 kloniert.

### 2.1.9 Hefetransformation

Der zu transformierende Hefestamm wurde über Nacht bei 30°C unter Schütteln in YPD- oder YPGal-Medium angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,2 in 50 ml Medium verdünnt. Nachdem eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 erreicht wurde, wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 g, 3 min, RT) sedimentiert, mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (7500 g, 15 s, RT) und das Zellsediment in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Je Transformationsansatz wurden 50 µl dieser Suspension sedimentiert (3000 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Danach wurden zu den Zellen 240 µl 50% (w/v) PEG 3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNS (10 mg/ml) sowie 5-50 µl der zu transformierenden DNS gegeben und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 360 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 min sehr gut gemischt, für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend weitere 20 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 s, 6000 g, RT), in 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Selektiv-Platten ohne den entsprechenden Auxotrophiemarkern ausgestrichen.

YPD-Medium: 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, pH 5,5, 0,1% (v/v) Glukose

YPGal-Medium: 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, pH 5,5, 0,5% (v/v) Galaktose

Selektiv-Platten: 0,17% (w/v) Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5% (w/v) Ammoniumsulfat, 2% (w/v) Glukose oder 2% (w/v) Galaktose, 2% (w/v) Agar, supplementiert mit entsprechenden Auxotrophiemarkern

### 2.1.10 Verwendete Hefestämme

**Tabelle 2.2 Verwendete Hefestämme**

Stamm	Referenz
D273-10b	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
W303	Rothstein RJ, 1983
YPH499	Sikorski und Hieter, 1989
GAL-Mia40	Terziyska et al., 2005
GAL-Tim23	Terziyska et al., 2007

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

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

Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Es wurden zwei Elektrophoresesysteme unterschiedlicher Größe benutzt. Große Gele bestanden aus Bodengel (1 x 15 x 0,1 cm), Trenngel (9 x 15 x 0,1 cm) und Sammelgel (2 x 15 x 0,1 cm). Das zweite Elektrophoresesystem für kleinere Gele von der Firma BioRad bestand aus Sammelgel (1,5 x 7,2 x 0,1 cm) und Trenngel (5,5 x 7,2 x 0,1 cm). Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel variierte zwischen 8 und 16% (w/v), je nach Größe der zu trennenden Proteine. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, mit oder ohne 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, um reduzierende oder nicht-reduzierende Bedingungen für die Elektrophorese zu schaffen. Die Elektrophorese großer Gelen erfolgte bei 35 mA für etwa 2 h, kleine Gele liefen bei 25 mA für etwa 45 min. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder für die Immundekoration auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen oder durch Färben des Gels mit Coomassie oder Silber nachgewiesen.

Trenngellösung: 8-16% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,25% (w/v) TEMED

Sammelgellösung: 5% (w/v) Acrylamid, 0,03% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,25% (w/v) TEMED

Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,38 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Laemmli-Puffer: 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau pH 6,8

### 2.2.2 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um eine bessere Auftrennung der mit AMS modifizierten Formen von Tim10 im Bereich von 10-20 kDa zu erhalten, wurde eine Tricin-SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden große Gele verwendet (siehe 2.2.1), die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und die Elektrophorese fand über Nacht (etwa 18 h) bei 15-20 mA statt.

Für ein 16%iges Trenngel wurden 5 ml Trenngellösung, 5 ml Gelpuffer, 1,55 ml Glycerol und 3,45 ml H<sub>2</sub>O gemischt und mit 0,05% (w/v) APS und 0,25% (w/v) TEMED versetzt. Für ein

Sammelgel wurden 0,4 ml Sammelgellösung, 1,25 ml Gelpuffer und 3,35 ml H<sub>2</sub>O gemischt und mit 0,05% (w/v) APS und 0,25% (w/v) TEMED versetzt.

Trenngellösung: 93 g Acrylamid, 6 g Bisacrylamid auf 200 ml H<sub>2</sub>O

Sammelgellösung: 96 g Acrylamid, 3 g Bisacrylamid auf 200 ml H<sub>2</sub>O

Gelpuffer: 181,65 g Tris pH 8,45, 1,5 g SDS auf 500 ml H<sub>2</sub>O

Kathodenlaufpuffer: 0,1 M Tris pH 8,25, 0,1 M Tricin, 3,4 mM SDS

Anodenlaufpuffer: 0,2 M Tris-HCl pH 8,9

### 2.2.3 Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteasebehandlung von Mia40 mit Trypsin wurde eine Harnstoff-SDS-PAGE durchgeführt. Die Elektrophorese fand bei 25 mA für 4-5 h statt.

Trenngellösung: 20% (w/v) Acrylamid, 0,25% (w/v) Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,1% (w/v) SDS, 0,75 M Tris-HCl pH 8,8, 0,05% (w/v) APS, 0,25% (w/v) TEMED

Sammelgellösung: 5% (w/v) Acrylamid, 0,07% (w/v) Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,25% (w/v) TEMED

Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

### 2.2.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit Coomassie-Blau anzufärben, wurde das Trenngel mindestens 30 min in Färbelösung (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Coomassie-Blau R) geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) entfärbt, bis die blau gefärbten Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

### 2.2.5 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Das Trenngel wurde 30-60 min in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 50 µl 37%iges Formaldehyd je 100 ml) geschwenkt. Es folgten zwei Waschschrte in 50% (v/v) Ethanol für jeweils 10 min bevor das Gel eine Minute in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung

inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde das Gel für 15 min in 0,2% (w/v) Silbernitratlösung, versetzt mit 75 µl 37%iges Formaldehyd je 100 ml, geschwenkt. Zwei weitere kurze Waschschritte in H<sub>2</sub>O folgten, bevor das Gel für 5-10 min in Entwicklerlösung (6% (w/v) Natriumcarbonat, 2 ml 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung je 100 ml, 50 µl 37%iges Formaldehyd je 100 ml) inkubiert wurde. Um die Entwicklung zu stoppen, wurde das Gel anschließend in 50 mM EDTA pH 8,0 geschwenkt.

### **2.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)**

Die in der PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des sogenannten *semi dry*-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Khyse-Anderson, 1984). Dazu wurden zuerst das Gel, die Membran und vier Lagen Whatman-Filterpapier in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,08% (w/v) SDS) getränkt. Zwei Lagen Filterpapier wurden auf einer Graphitanode plziert, worauf die Membran, das Gel und zwei weitere Lagen Filterpapier folgten. Dieser Stapel wurde mit der Kathode bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h. Dies entsprach bei den hier benutzten Gelen der Größe von etwa 15 x 9 cm einer Stromstärke von 200 mA. Die auf die Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine wurden reversibel mit Ponceau-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)) angefärbt.

### **2.2.7 Autoradiographie und Densitometrie**

Das Signal radioaktiv markierter Proteine, die auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen worden waren, wurde auf einem Röntgenfilm exponiert. Dazu wurde der Film auf die getrocknete Nitrozellulose-Membran aufgelegt und nach entsprechender Expositionsdauer entwickelt. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham Biosciences) eingelesen und ihre Intensität mit dem Programm ImageMaster (Amersham Biosciences) quantifiziert.



## 2.2.8 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro*

Die zu synthetisierenden Vorstufenproteine wurden in pGEM-Vektoren unter die Kontrolle des Sp6 oder T7 Promotors kloniert. Die Translation wurde in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin oder  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein durchgeführt.

### 2.2.8.1 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde in modifizierter Form nach Melton durchgeführt (Melton DA, 1984). Der Transkriptionsansatz von 100  $\mu\text{l}$  enthielt 20  $\mu\text{l}$  5x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 30 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Spermidin), 10  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, 4  $\mu\text{l}$  RNAsin (40 U/ $\mu\text{l}$ ), 20  $\mu\text{l}$  NTPs (je 10 mM), 5,2  $\mu\text{l}$  m7G(5')ppp(5')G, 3  $\mu\text{l}$  Sp6- oder T7-RNS-Polymerase, 27  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  sowie 10  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNS. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Lithiumchlorid und 300  $\mu\text{l}$  Ethanol wurde der Mix weitere 30 min bei 20°C inkubiert und anschließend die RNS durch Zentrifugation (25000 g, 20 min, 4°C) präzipitiert. Das RNS-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  mit 1  $\mu\text{l}$  RNAsin (40 U/ $\mu\text{l}$ ) aufgenommen. Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.8.2 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde nach Pelham durchgeführt (Pelham und Jackson, 1976). Für den Translationsansatz wurden 50  $\mu\text{l}$  Kaninchenretikulozytenlysat (Promega), 20 U RNAsin, 1,75  $\mu\text{l}$  Aminosäuremix (je 1 mM, alle proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin und Cystein), 6  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein sowie 3,5  $\mu\text{l}$  15 mM Magnesiumacetat und 12,5  $\mu\text{l}$  RNS gemischt. Nach Inkubation von 1 h bei 30°C und der anschließenden Zugabe von 58 mM Methionin und Cystein sowie 12  $\mu\text{l}$  Saccharose (1,5 M) wurden Ribosomen und aggregierte Proteine abzentrifugiert (30 min, 90000 g, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.8.3 Transkription-Translation gekoppeltes System (TNT)

Ein TNT-Reaktionsansatz von 50  $\mu\text{l}$  enthielt 25  $\mu\text{l}$  TNT-Kaninchenretikulozytenlysat (Promega), 2  $\mu\text{l}$  TNT-Reaktionspuffer, 1  $\mu\text{l}$  TNT Sp6 oder T7 RNS-Polymerase, 1  $\mu\text{l}$  Aminosäuremix (alle

proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin und Cystein, je 1 mM), 4  $\mu$ l  $^{35}$ S-Methionin und  $^{35}$ S-Cystein, 1  $\mu$ l RNAsin (40 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Plasmid-DNS. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert und der Einbau des radioaktiven Methionins und Cysteins wurde durch Zugabe von 12  $\mu$ l 58 mM nicht radioaktiv markierten Methionins und Cysteins gestoppt. Nach Zugabe von 8  $\mu$ l Saccharose (1,5 M) wurden Ribosomen und aggregierte Proteine abzentrifugiert (30 min, 90000 g, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem BioRad-Proteinassay. Dazu wurden Proteinlösungen in einem Volumen von 1-10  $\mu$ l mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und mit Hilfe einer Eichkurve die Konzentration bestimmt. Für die Eichkurve wurden die Extinktionen der IgG-Konzentrationen von 3, 6, 12 und 24  $\mu$ g/ml gemessen.

### **2.2.10 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Um Proteine aus einer Lösung zu fällen und Redoxreaktionen sehr schnell stoppen zu können, wurde TCA zu einer finalen Konzentration von 12% zugegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden bei 20000 g für 20 min abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (20000 g, 15 min) 5 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde das gefällte Protein in gewünschtem Puffer wieder gelöst und weiterbehandelt.

### **2.2.11 Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat**

Zur Fällung einer wässrigen Proteinlösung wurde diese dreimal mit 2/3 des Volumens gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine bei 20000 g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in gewünschtem Puffer und Volumen aufgenommen.

### 2.2.12 Expression und Reinigung von Mia40 und Cysteinvarianten von Mia40

Der Aminosäureabschnitt 284-403 von Mia40 wurde als GST-Fusionsprotein von dem Vektor pGEX-6P-1 in *E.coli* XL1blue Zellen exprimiert. Eine Übernachtskultur von *E.coli* wurde in 3 l LB<sub>Amp</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,1 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 bei 37°C wachsen gelassen. Durch die Zugabe von IPTG (1 mM) wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach etwa 4-5 h Schütteln bei 37°C wurde die Kultur abzentrifugiert (10 min, 2000 g, RT), gewaschen und das Sediment in 60 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF) und 0,2 mg/ml Lysozym aufgenommen. Nach 15 minütigem Überkopfschütteln bei 4°C wurden die Zellen durch Sonifizierung (Branson sonifier, 10 x 12 s, setting 4, 80% *duty cycle*) aufgebrochen. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C) sedimentiert. 8 ml Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences) wurden in einer Säule (BioRad) mit Lysepuffer voräquilibriert und der Überstand geladen. Anschließend wurde die Säule mit 20 Volumen Lysepuffer gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Die Glutathion-Sepharose wurde nun in 30 ml Lysepuffer ohne PMSF aufgenommen, in ein Reaktionsröhrchen überführt und Precision Protease (0,05 mg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 30°C wurde geschnittenes Mia40(284-403) eluiert.

Die eluierte Fraktion enthielt neben monomerem Mia40 auch Spezies von Mia40, die über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden waren. Um eine homogene Fraktion von monomerem Mia40 zu erhalten, wurde das Gemisch über eine Superdex75 Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Dazu wurde die Proteinlösung zunächst durch Ultrazentrifugation (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) auf ein Volumen von etwa 1,5 ml eingeeengt. 5 mg Protein wurden in einem Volumen von 500 µl auf eine mit Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 40 mM NaCl) voräquilibrierte Superdex75 Gelfiltrationssäule appliziert. Mia40 wurde mit 1,5 Säulenvolumen Puffer und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 500 µl Fraktionen eluiert. Die entsprechenden 0,5 ml Fraktionen wurden aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.13 Expression und Reinigung von Tim10

*E.coli* BL21(DE3) Zellen, welche das Plasmid pGEX-6P-1-Tim10 zur Expression von GST-Tim10 enthielten, wurden in 250 ml LB<sub>Amp</sub> bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Überexpression von rekombinantem Tim10 für etwa 3 h induziert. Die Zellen wurden geerntet (10 min, 2000 g, RT), in 20 ml Lysepuffer (50 mM Tris-

HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF) und 0,2 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 10 min bei 4°C überkopfgeschüttelt. Durch Sonifizierung (Branson sonifier, 10 x 12 s, setting 4, 80% *duty cycle*) wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 20000 g befand sich GST-Tim10 überwiegend im Sediment (*inclusion bodies*), welches in 20 ml Lysepuffer und 8 M Harnstoff solubilisiert und für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Renaturierung des Proteins erfolgte in einer 10-fachen Verdünnung in Lysepuffer ohne DTT bei 4°C über Nacht. Um aggregiertes Material zu entfernen, wurde die Lösung für 20 min (20000 g, 4°C) zentrifugiert. 1,5 ml Glutathion-Sepharose wurden in einer Säule (BioRad) mit Lysepuffer ohne DTT voräquilibriert und der Überstand geladen. Die Säule wurde mit 40 Volumen Lysepuffer ohne DTT gewaschen. Die in 5 ml Lysepuffer ohne DTT aufgeschlemmte Glutathion-Sepharose wurde in ein Reaktionsröhrchen überführt und 0,05 mg/ml Precision Protease zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C wurde das geschnittene Tim10 eluiert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.14 Expression und Reinigung von Erv1

Erv1 wurde mit N-terminalem Hexahistidinanhang (HisErv1) von dem Vektor pET24a+ in *E.coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert. 100 ml einer Übernachtskultur wurden in 1 l LB<sub>Kan</sub> verdünnt und die Expression mit 1 mM IPTG für 16 h bei 28°C induziert. Die Zellen wurden geerntet (10 min, 2000 g, RT) und in 20 ml Lysepuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF) und 0,2 mg/ml Lysozym aufgenommen. Nach 15 minütigem Überkopfschütteln bei 4°C wurden die Zellen durch Sonifizierung (Branson sonifier, 10 x 12 s, setting 4, 80% *duty cycle*) aufgebrochen. Um Zellbruchstücke zu entfernen, wurde die Lösung für 20 min bei 20000 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. 1 ml NiNTA-Agarose (Qiagen) wurde in einer Säule mit Lysepuffer voräquilibriert und der Überstand geladen. Die Säule wurde dreimal mit 5 ml Lysepuffer gewaschen, bevor HisErv1 mit Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 50 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM PMSF) in 1 ml Fraktionen eluiert wurde. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration waren durch das von Erv1 gebundene FAD gelb gefärbt und wurden aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.15 Expression und Reinigung von Hot13

*E.coli* BL21(DE3) Zellen, welche das Plasmid pMAL-cRI-Hot13 zur Expression von MBP-Hot13 enthielten, wurden in 0,5 l LB<sub>Amp</sub> bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Überexpression von rekombinantem Hot13 für etwa 3 h induziert. Die Zellen wurden geerntet, in 20 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF) und 0,2 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 15 min bei 4°C überkopfgeschüttelt. Durch Sonifizierung (Branson sonifier, 10 x 12 s, setting 4, 80 % *duty cycle*) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Lösung für 20 min bei 20000 g (4°C) zentrifugiert. 2 ml Amylose (New England BioLabs) wurden in einer Säule (BioRad) mit Lysepuffer voräquilibriert und der Überstand geladen. Die Säule wurde mit 25 Volumen Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde MBP-Hot13 mit 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 200 mM NaCl und 10 mM Maltose in zehn 0,5 ml Fraktionen eluiert. Diese wurden aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.16 Proteinmodifikation mit 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure (AMS)

Um den Redoxstatus von gereinigtem Mia40 zu untersuchen, wurde das Protein in 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 40 mM NaCl je nach Experiment zuerst mit 5 mM DTT bei 25°C oder 95°C behandelt oder ohne DTT bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend mit oder ohne 15-30 mM AMS (Invitrogen) für 30-60 min bei 25°C weiterinkubiert. Diese Substanz führt zu einer Modifikation von Cysteinresten durch die Alkylierung freier Thiolgruppen. Dadurch wird der Redoxzustand des Proteins „eingefroren“, da die modifizierten Thiolgruppen nicht weiter reagieren können. AMS hat ein Molekulargewicht von 500 Da und führt dadurch außerdem zu einem sichtbaren Mobilitätsunterschied der modifizierten Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen.

### 2.2.17 Erzeugung verschiedener Redoxzustände gereinigter Proteine

In den Experimenten zur Rekonstitution des Disulfidtransfersystems wurden verschiedene Redoxformen von Mia40 eingesetzt. Um Mia40 partiell zu reduzieren, wurde das Protein mit 5 mM DTT für 10 min bei 25°C inkubiert. Die Entfernung des DTT erfolgte durch Gelfiltration

mittels einer NAP5-Säule (GE Healthcare). Mia40 wurde, wenn nicht anders angegeben, in 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA reisoliert. Vollständig reduziertes Mia40 wurde durch Hitzedenaturierung bei 95°C für 10 min in Gegenwart von 5 mM DTT erzeugt. DTT wurde wie für partiell reduziertes Mia40 beschrieben, entfernt.

Als Substrate wurden reduziertes Mia40C-C1,2S und Tim10 verwendet. Mia40C-C1,2S wurde wie für Mia40 beschrieben, vollständig reduziert und reisoliert. Tim10 wurde für 10 min bei 95°C mit 10 mM DTT reduziert und DTT wie zuvor beschrieben entfernt.

## 2.3 Methoden der Zellbiologie

### 2.3.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefe wurde üblicherweise auf Laktatmedium, ergänzt mit 0,1% (v/v) Glukose oder 0,5% (v/v) Galaktose oder YPD- bzw. YPGal-Medium gezogen. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben bei 140 Upm in Schüttlern bei 30°C inkubiert. Zum Animpfen der Flüssigkulturen wurden Zellen aus einem Glycerolstock (15% (v/v)) oder von einer Agarplatte verwendet.

Für die Präparation von Mitochondrien wurden die jeweiligen Hefestämme etwa drei Tage in steigenden Volumina kultiviert, wobei darauf geachtet wurde, eine OD<sub>600</sub> von 1,2 nicht zu überschreiten. Zur Depletion von Mia40 wurde der Hefestamm, der das *MIA40*-Gen unter der Kontrolle des GAL10-Promotors enthält, zunächst etwa zwei Tage in 0,5% (v/v) galaktosehaltigem Laktatmedium angezogen. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert und die Zellen in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Sediment wurde in 0,1% (v/v) glukosehaltigem Laktatmedium aufgenommen und die Zellen für 16 h weiterkultiviert. Zur Depletion von Erv1 wurde der GAL-Erv1-Hefestamm für drei Tage in 0,1% (v/v) glukosehaltigem Laktatmedium angezogen. Um Mia40 oder Erv1 überzuexprimieren, wurden der GAL-Mia40- oder der GAL-Erv1-Stamm in Laktatmedium mit 0,5% (v/v) Galaktose kultiviert.

Laktatmedium: 3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Galaktose, 1 g/l Kaliumphosphat, 1 g/l Ammoniumchlorid, 0,5 g/l Kalziumchlorid, 0,5 g/l NaCl, 0,6 g/l Magnesiumsulfat, 0,3 ml/l Eisen(III)chlorid (1%), 2% (w/v) Laktat pH 5,5

YPD-Platten: 2% (w/v) Hefeextrakt, 4% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Agar pH 5,5

YPGal-Platten: 2% (w/v) Hefeextrakt, 4% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Galaktose, 2% (w/v) Agar pH 5,5

### **2.3.2 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus *S. cerevisiae***

Hefezellen wurden zur Gewinnung von Gesamtzellprotein alkalisch aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen (etwa 2,5 OD<sub>600</sub>) geerntet und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH und einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Ansatz sedimentiert (1 min, 35000 g, RT) und in 50 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, für 3 min auf 95°C erhitzt und erneut sedimentiert (5 min, 35000 g, RT). Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

### **2.3.3 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae***

Hefezellen, die bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-1,5 gewachsen waren, wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 g, RT) geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und nach der Bestimmung des Feuchtgewichts in 100 mM Tris-HCl pH 9,4, 10 mM DTT bei einer Konzentration von 0,5 g/ml resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 30°C unter Schütteln und erneuter Zentrifugation (5 min, 3000 g, RT) wurden die Zellen in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro Gramm Feuchtgewicht in 6,7 ml 1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase und 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4 resuspendiert. Diese Suspension wurde 30-60 min bei 30°C geschüttelt, um die Zellwand zu lysieren. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die entstandenen Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 2000 g, 4°C) geerntet und in Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2% (w/v) BSA, 1 mM PMSF) bei einer Konzentration von 0,15 g/ml resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen wurden durch zehn Stöße aufgebrochen. Noch verbliebene intakte Zellen, Membranen und Zellkerne wurden durch Zentrifugation (2 x 5 min, 2000 g) abgetrennt.

Mitochondrien wurden durch Zentrifugation bei 12000 g für 12 min sedimentiert, in 25 ml SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES-KOH pH 7,3) resuspendiert und erneut bei 2000 g für 5 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 17000 g für 12 min isoliert und in 0,5-1,5 ml SH-Puffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt und auf 10 mg/ml eingestellt, bevor Aliquots der gereinigten Mitochondrien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.



### **2.3.4 Proteinimport in isolierte Mitochondrien**

Für den Import von Proteinen in Mitochondrien wurde SI-Puffer verwendet (3% BSA, 0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM Manganchlorid, 2,5 mM EDTA, 50 mM HEPES-KOH pH 7,4). Alle Importreaktionen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Anwesenheit von 2 mM ATP und 4 mM NADH durchgeführt. Substratproteine von Mia40 wurden in Anwesenheit von 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol importiert. Für eine Importreaktion wurden 50  $\mu$ g Mitochondrien mit 1-3 % (v/v) Retikulozytenlysat, welches das zu importierende Protein enthielt, bei 25°C oder 30°C für 1-30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnfache Verdünnung in kaltem SH-Puffer gestoppt. Zugängliche Proteine wurden durch Zugabe von Proteinase K (50  $\mu$ g/ml) oder Trypsin (50  $\mu$ g/ml) verdaut. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM PMSF oder dem 20-fachen Überschuß an Sojabohnen-Trypsininhibitor gestoppt. Die Mitochondrien wurden abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C), mit SH-Puffer, 80 mM KCl gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert.

### **2.3.5 Präparation von Mitoplasten**

Als Mitoplasten werden Mitochondrien bezeichnet, deren äußere Membran durch hypotones Schwellen geöffnet wurde, während die Innenmembran intakt bleibt. Dazu wurden Mitochondrien zehnfach in 20 mM HEPES-KOH pH 7,3 verdünnt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten wurden durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) reisoliert und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

### **2.3.6 Carbonatextraktion**

Durch Carbonatextraktion ist es möglich, lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen zu trennen. 50  $\mu$ g sedimentierter Mitochondrien wurden in 100  $\mu$ l 0,1 M Natriumcarbonat pH 11,5 aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (125000 g, 30 min, 4°C) und das Sediment, welches



Membranproteine enthält, in Laemmli-Puffer resuspendiert. Der Überstand mit löslichen Proteinen wurde mit TCA gefällt und in Laemmli-Puffer gelöst.

## **2.4 Immunologische Methoden**

### **2.4.1 Antikörpernachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen**

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen, wurden unspezifische Bindungsstellen für Proteine auf der Membran durch eine Inkubation in TBS (154 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) mit 5% (w/v) Milchpulver oder 3% (w/v) BSA für 30 min abgesättigt. Der immunologische Nachweis erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antisera oder gereinigten Antikörpern in 5% (w/v) Milchpulver oder 3% (w/v) BSA in TBS für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS gewaschen. Um gebundenen primären Antikörper nachzuweisen, wurde die Membran für 45 min in sekundärem Antikörper, einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:10000 in 5% (w/v) Milchpulver oder 3% (w/v) BSA in TBS). Die Membran wurde erneut gewaschen (3 x 5 min in TBS), bevor sie für 1-2 min mit Luminol-Reagenz (1:1 Mischung aus ECL1- und ECL2-Reagenz) vollständig bedeckt und anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert wurde.

ECL1: 300 µl Luminol (440 mg/10 ml DMSO) und 133 µl Cumarinsäure (150 mg/10 ml DMSO) in 30 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5

ECL2: 18 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) in 30 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5

### **2.4.2 Immunpräzipitation**

Um Proteininteraktionen zwischen Mia40 und Substratproteinen nachzuweisen, wurden gereinigte Antikörper gegen Mia40 an Protein-A-Sepharose gebunden. Dazu wurden 30-50 µl der Antikörperfraktion mit 25 µl in TBS gewaschenem Säulenmaterial für 1,5 h bei 4°C inkubiert.

100 µg Mitochondrien wurden in Lysepuffer (1% (v/v) SDS, 50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF) für 10 min bei RT inkubiert und in TBS mit 0,2% (v/v) Triton X-100 20-fach verdünnt. Nichtgelöstes Material wurde durch Ultrazentrifugation (20 min, 45000 rpm, 4°C) entfernt, bevor der mitochondriale Extrakt mit der antikörperbeladenen Protein-A-Sepharose gemischt und 2 h bei 4°C überkopfgeschüttelt wurde. Anschließend wurde das

Säulenmaterial zweimal in TBS mit 0,2% (v/v) Triton X-100 und ein weiteres Mal in TBS gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Lämmli-Puffer unter reduzierenden oder nichtreduzierenden Bedingungen (5 min, 95°C) vom Säulenmaterial gelöst.

## 2.5 Geräte

Agfa-Gevaert, München:	Entwicklermaschine Cumix 60
Amersham Biosciences, München:	Spannungsversorgung, Flachbettscanner ImageScanner, Quantifizierungsprogramm ImageMaster, Chromatographiesysteme und Säulen
Appligene, Heidelberg:	Agarosegel Imaging-System
Beckman Coulter, Krefeld:	Kühlzentrifugen (Avanti), Ultrazentrifugen (Optima)
BioRad, Hercules, USA:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbad
Elma, Singen:	Ultraschallbad Transsonic 310
Eppendorf, Hamburg:	Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen, Reaktionsgefäße Gradienten-PCR-Maschine, Photometer
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Institutswerkstatt, München:	<i>Semidry</i> -Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler
Jasco, Groß-Umstadt:	Photometer
Memmert, Hannover:	Inkubatoren, Wärmeschränke
MWG Biotech, Ebersberg:	PCR-Maschine Primus
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen
Sigma, München:	Tisch-Kühlzentrifugen

### 3 Ergebnisse

Die Biogenese aller Proteine des Intermembranraums (IMR) erfordert nach der Synthese an zytosolischen Ribosomen den Import in Mitochondrien. Kürzlich wurde mit dem Mia40/Erv1-Systems ein neuer Importweg im IMR beschrieben, dessen bekanntes Substratspektrum jedoch bisher sehr klein ist. Hauptcharakteristikum der Substratproteine sind konservierte Cysteinreste, angeordnet in bestimmten Sequenzmotiven und ein geringes Molekulargewicht zwischen 8 und 17 kDa. Die bislang bekannten Substratproteine können zwei Kategorien zugeordnet werden: Substraten mit *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiv, wie die kleinen Tim-Proteine und Substraten mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv, zu denen das Kupferchaperon Cox17 gehört.

#### 3.1 Identifizierung von Erv1 als Substrat des Mia40/Erv1-Systems

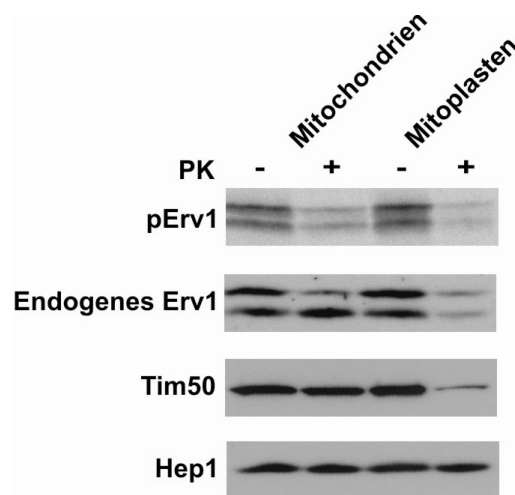
Es stellte sich die Frage, ob es weitere Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems gibt, die zu keiner dieser Kategorien gehören. Ein möglicher Kandidat war die Sulfhydryloxidase Erv1, ein 22 kDa schweres Protein im IMR ohne mitochondriales Sortierungssignal. In Hefe enthält es sechs Cysteinreste, angeordnet in zwei CX<sub>2</sub>C-Motiven und einem strukturellen CX<sub>16</sub>C-Segment. Bisher war nicht bekannt, wie Erv1 in den IMR von Mitochondrien importiert wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Importweg Erv1 benutzt, um in sein Zielkompartiment zu gelangen.

##### 3.1.1 Erv1-Vorstufenprotein wird in den IMR von isolierten Mitochondrien transportiert

Um den Importmechanismus von Erv1 zu studieren, wurde radioaktiv markiertes Erv1 in Retikulozytenlysat von Kaninchen synthetisiert und mit isolierten WT-Mitochondrien inkubiert. Erv1 war nach der Inkubation mit Mitochondrien assoziiert und ein Teil davon war gegen zugegebene Proteinase K geschützt (Abbildung 3.1) Dieser Teil wurde also in Mitochondrien importiert und war deshalb nicht für die Protease zugänglich. Um die submitochondriale Lokalisation von Erv1 zu bestimmen, wurden aus Mitochondrien Mitoplasten erzeugt, indem die Außenmembran der Mitochondrien durch Inkubation in hypotonischem Puffer geöffnet wurde. Erv1 blieb mit Mitoplasten assoziiert, wurde aber durch zugegebene Proteinase K abgebaut.

Demnach befindet sich das importierte Erv1 im Intermembranraum und ist mit mitochondrialen Membranen assoziiert. Dies entspricht der Lokalisation des endogenen Erv1, welche durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Erv1 nachgewiesen wurde und frühere Ergebnisse bestätigte (Lange et al., 2001).

Das Erv1-Vorstufenprotein wurde also in isolierte Mitochondrien transportiert und in den IMR sortiert, so dass der *in vitro* Ansatz benutzt werden kann, um den Importmechanismus von Erv1 im Detail zu studieren.



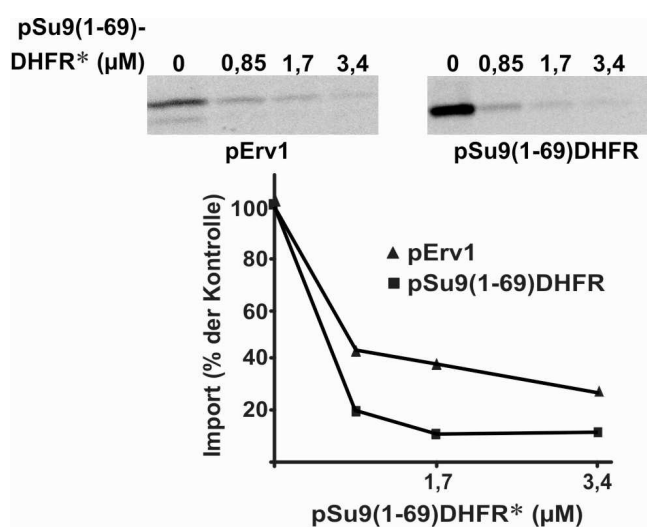
### Abbildung 3.1 Import von radioaktiv markiertem Erv1 in isolierte Mitochondrien

Radioaktiv markiertes Erv1-Vorstufenprotein wurde für 15 min bei 25°C mit isolierten WT-Mitochondrien inkubiert. Mitoplasten wurden durch hypoosmotisches Schwellen in Hespuffer erzeugt. Mitochondrien und Mitoplasten wurden mit oder ohne Proteinase K (PK) behandelt und die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Endogenes Erv1 und Markerproteine für die Matrix (Hep1) und die innere Membran (Tim50) wurden über Immundekoration mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen, um die Subfraktionierung der Mitochondrien zu kontrollieren. Sowohl für endogenes als auch für importiertes Erv1 wurden zwei Spezies detektiert, die sich durch unterschiedliche Mobilität im SDS-Gel auszeichnen. Vermutlich entstehen diese Produkte als Folge von zwei Startmethioninresten.

### 3.1.2 Erv1 wird über den TOM-Komplex importiert

Bisher untersuchte mitochondriale Proteine benutzen den TOM-Komplex, um über die äußere Membran transportiert zu werden. Dies gilt auch für Proteine, die kein mitochondriales Sortierungssignal besitzen, wie z. B. die kleinen Tim-Proteine des IMR.

Deshalb wurde untersucht, ob Erv1 ebenfalls über den TOM-Komplex importiert wird. Dazu wurde der Import von Erv1 in Gegenwart von chemischen Mengen eines nichtmarkierten Vorstufenproteins analysiert, welches für die Matrix bestimmt ist. Das verwendete Vorstufenprotein pSu9(1-69)DHFR\* besteht aus den ersten 69 Aminosäureresten der Untereinheit 9 der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, welche mit der Maus-Dihydrofolatreduktase verbunden sind, und wird über den TOM- und TIM23-Komplex in die Matrix transportiert.



**Abbildung 3.2 Erv1 wird über den TOM-Komplex importiert**

Radioaktiv markiertes Erv1- oder pSu9(1-69)DHFR-Vorstufenprotein wurde in Anwesenheit von steigenden Mengen rekombinanten pSu9(1-69)DHFR\* für 10 min mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Mengen an importiertem radioaktiv markiertem Protein wurden jeweils als Prozent des importierten Materials in Abwesenheit von rekombinanten pSu9(1-69)DHFR\* dargestellt. Die Summe beider Formen von Erv1 wurde quantifiziert.

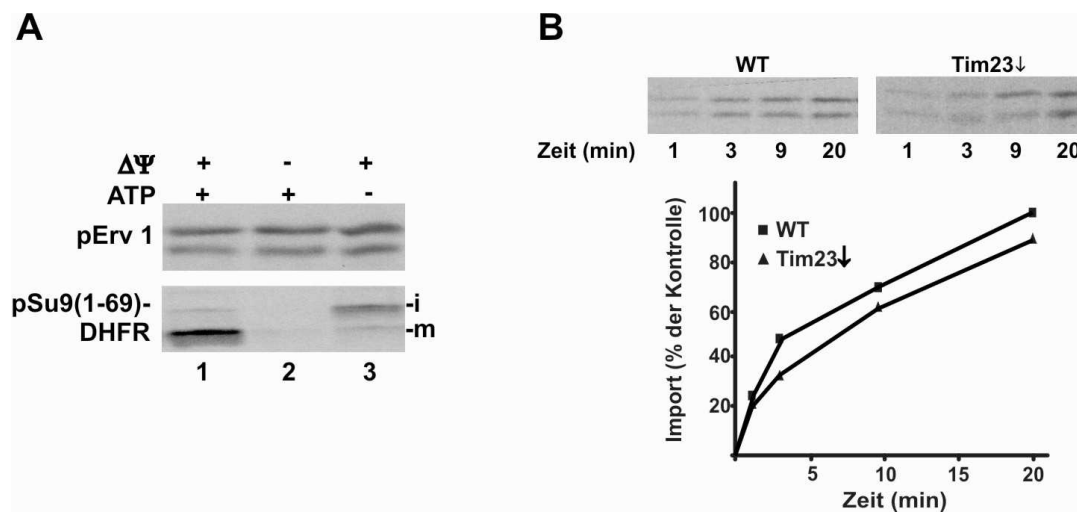
Die Translokation von Erv1 in Mitochondrien war in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an rekombinanten pSu9(1-69)DHFR\* stark vermindert (Abbildung 3.2). Der Effekt war vergleichbar mit der Konkurrenz des Imports des matrixadressierten Vorstufenproteins pSu9(1-

69)DHFR. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Importprozess von Erv1 Schritte mit dem generellen Importweg von mitochondrialen Matrixproteinen über den TOM- und TIM23-Komplex gemeinsam hat. Nachfolgende Ergebnisse (siehe Kapitel 3.1.3) konnten allerdings die Translokation von Erv1 über den TIM23-Komplex ausschließen. Demnach findet die Competition zwischen Erv1 und Matrixprotein auf Ebene des TOM-Komplexes statt. Daraus kann gefolgert werden, dass Erv1 die äußere Membran der Mitochondrien durch den TOM-Komplex passiert.

### **3.1.3 Der Import von Erv1 ist nicht abhängig vom TIM23-Komplex**

Für den Transport von Proteinen über den TIM23-Komplex werden als Triebkraft die Hydrolyse von ATP sowie das Membranpotential an der Innenmembran benötigt. Um herauszufinden, ob der TIM23-Komplex in den Importprozess von Erv1 involviert ist, wurde untersucht, welchen Einfluss die Depletion des Membranpotentials oder des ATP auf den Import von Erv1 hat. Dazu wurden isolierte WT-Mitochondrien entweder mit Apyrase und Oligomycin vorbehandelt, um mitochondriales ATP zu depletieren oder mit dem Kaliumionen-Ionophor Valinomycin inkubiert, um das Membranpotential abzubauen. Anschließend wurden diese Mitochondrien mit radioaktiv markiertem Erv1- oder pSu9(1-69)DHFR-Vorstufenprotein inkubiert. Wie aus Abbildung 3.3A hervorgeht, wurde der Import von Erv1 weder durch die Depletion des ATP noch des Membranpotentials beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu war die Importeffizienz des Kontrollproteins pSu9(1-69)DHFR unter beiden Bedingungen stark reduziert.

Das bedeutet, dass die Energiequellen, die vom TIM23-Komplex benutzt werden, für den Import von Erv1 nicht notwendig sind. Tatsächlich war der Import von Erv1 in Mitochondrien, die aus Tim23-depletierten Zellen isoliert wurden, vergleichbar mit dem Import in die korrespondierenden WT-Mitochondrien (Abbildung 3.3B). Erv1 wird demnach nicht unter Mitwirkung des TIM23-Komplexes in den IMR transportiert.



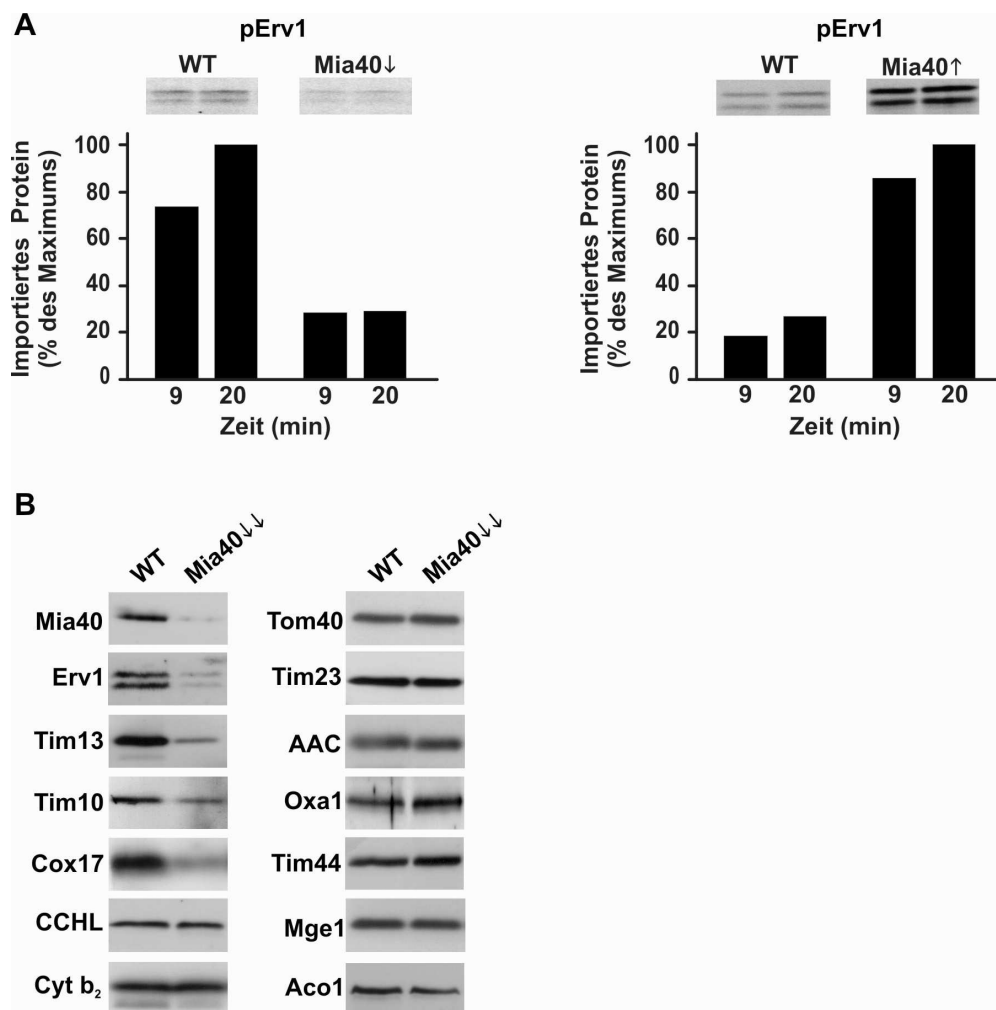
**Abbildung 3.3 Erv1 wird nicht über den TIM23-Komplex importiert**

**A)** Die Depletion des Membranpotentials und des mitochondrialen ATP hat keinen Einfluß auf den Import von Erv1. Mitochondrien wurden für 10 min vorinkubiert mit ATP (2 mM) und NADH (2 mM) in Spur 1, mit Apyrase (10 mU/ $\mu$ l) und Oligomycin (10  $\mu$ M) in Spur 2, um mitochondriales ATP zu depletieren, oder mit Valinomycin (1  $\mu$ M) in Spur 3, um das Membranpotential aufzuheben. Anschließend wurden die Mitochondrien mit radioaktiv markiertem Erv1- oder pSu9(1-69)DHFR-Vorstufenprotein für 20 min inkubiert. Das pSu9(1-69)DHFR-Vorstufenprotein wird zweimal prozessiert, so dass eine intermediäre (i) und reife (m) Form entsteht.

**B)** Der Import von Erv1 ist unabhängig vom TIM23-Komplex. Mitochondrien wurden aus Tim23-depletierten Zellen und aus Wildtypzellen isoliert und mit radioaktiv markiertem Erv1-Vorstufenprotein für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Menge an Erv1, die nach 20 min in WT-Mitochondrien importiert worden war, wurde 100% gesetzt.

### 3.1.4 Der Import von Erv1 ist abhängig von Mia40

Da Erv1 nicht über den TIM23-Komplex importiert wird und konservierte Cysteinreste enthält, wurde in Zusammenarbeit mit Nadia Terziyska untersucht, ob Mia40 eine Rolle im Translokationsprozess von Erv1 spielt. Es wurde beobachtet, dass der Import von radioaktiv markiertem Erv1-Vorstufenprotein in Mia40-depletierten Mitochondrien stark reduziert war, verglichen mit dem Import in korrespondierende WT-Mitochondrien (Abbildung 3.4A linke Seite). Die Importeffizienz von Erv1 in Mitochondrien aus Zellen mit überexprimiertem Mia40 war dagegen drastisch erhöht (Abbildung 3.4A rechte Seite).



### Abbildung 3.4 Erv1 wird abhängig von Mia40 importiert

A) Mia40 wird für den Import von Erv1 benötigt. Mitochondrien wurden aus Mia40-depletierten Zellen (Mia40↓) oder aus Zellen mit überexprimiertem Mia40 (Mia40↑) und den jeweiligen WT-Zellen isoliert und mit radioaktiv markiertem Erv1-Vorstufenprotein für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die maximale Menge an importiertem Erv1 wurde für jedes Experiment 100% gesetzt.

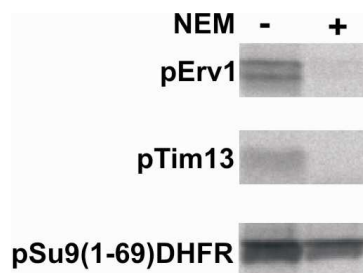
B) Die endogenen Mengen an Erv1 sind in Mia40-depletierten Mitochondrien reduziert. Mitochondrien wurden aus Zellen isoliert, in denen Mia40 für 16 h depletiert worden war (Mia40↓↓). Die Mengen an mitochondrialen Proteinen in diesen Mitochondrien und den korrespondierenden WT-Mitochondrien wurden über SDS-PAGE und Immundekoration mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden die Mengen von Proteine der Matrix (Aco1; Mge1; Tim44), der Innenmembran (Oxa1; ADP/ATP carrier, AAC; Tim23), der Außenmembran (Tom40) sowie von Intermembranraum-Proteinen, die nicht Substrate von Mia40 sind (Cytochrom *c* Hämlyase, CCHL; Cytochrom *b*<sub>2</sub>, Cyt *b*<sub>2</sub>) überprüft.



Auch *in vivo* konnte die Abhängigkeit von Mia40 bestätigt werden. Die Mengen an endogenem Erv1 waren in Mia40-depletierten Mitochondrien ebenso reduziert, wie die bisher bekannter Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems (Abbildung 3.4B). Diese Resultate zeigen, dass der Import von Erv1 in den IMR von Mia40 abhängig ist.

### 3.1.5 Freie Thiolgruppen im Erv1-Vorstufenprotein sind notwendig für den Import

Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems benötigen freie Thiolgruppen, sowohl für den Importprozess als auch für ihre oxidative Faltung im IMR der Mitochondrien. Da das Erv1-Vorstufenprotein ebenfalls freie Thiolgruppen enthält, wurde ihre Rolle für den Import von Erv1 getestet. Dazu wurde radioaktiv markiertes Erv1-Vorstufenprotein vor dem Import in isolierte WT-Mitochondrien mit N-ethylmaleimid (NEM) inkubiert. NEM alkyliert freie Thiolgruppen und blockiert so deren Reaktionsfähigkeit. Als Kontrolle wurden Tim13, ein cysteinhaltiges Substratprotein des Mia40/Erv1-Systems und Su9(1-69)DHFR ebenfalls mit NEM behandelt. Abbildung 3.5 zeigt, dass der Transport von Erv1 in Mitochondrien durch die Modifikation der Thiolgruppen inhibiert wurde. So wie bei bekannten Mia40-Substratproteinen, hängt der Import von Erv1 somit von Cysteinresten ab, die in ihrer Thiolform vorliegen.



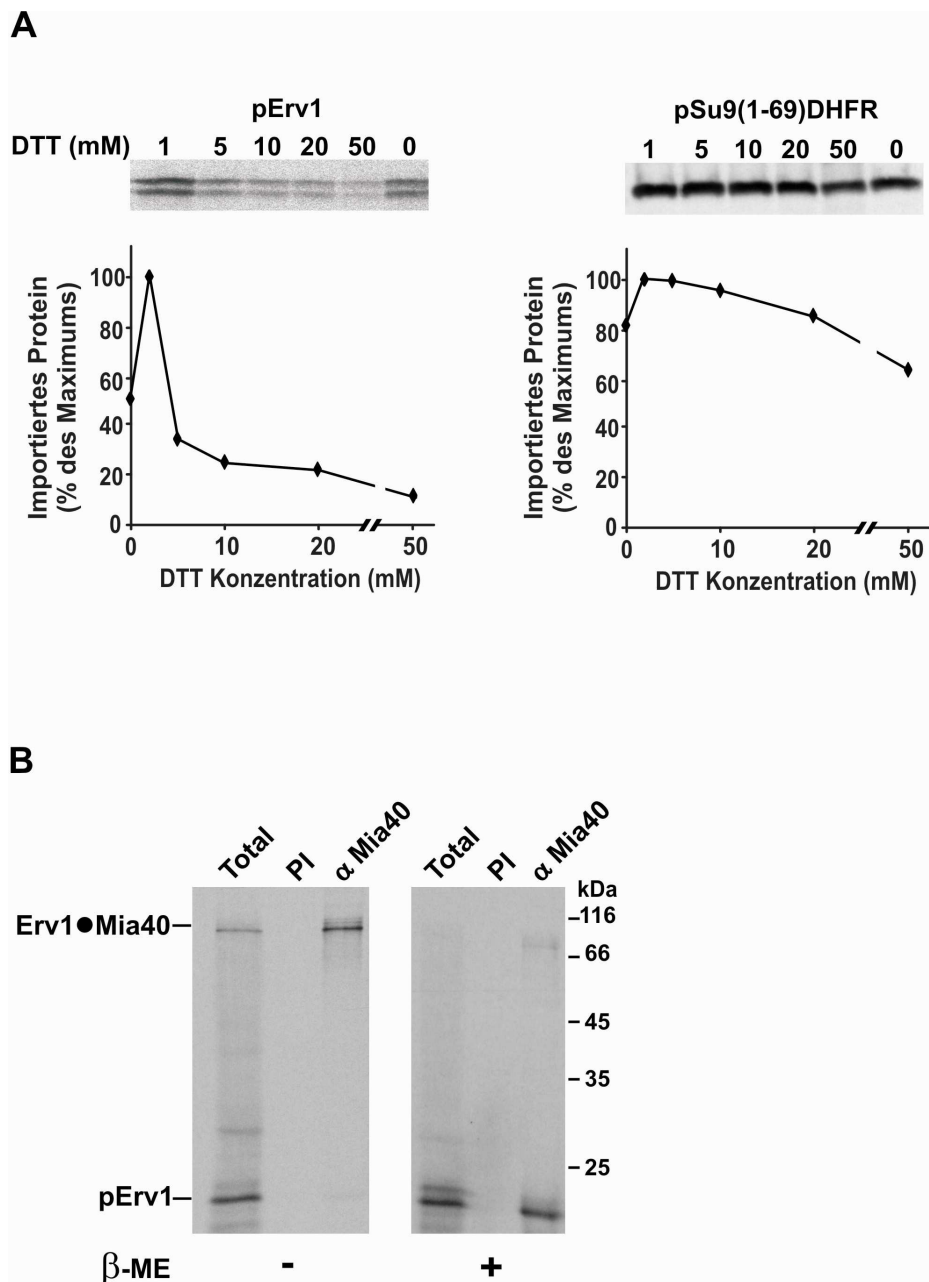
#### Abbildung 3.5 Modifikation freier Thiolgruppen blockiert den Import von Erv1

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine von Erv1, Tim13 und Su9(1-69)DHFR wurden mit 50 mM N-ethylmaleimid (NEM) modifiziert und als Kontrolle ohne NEM behandelt, bevor sie mit isolierten WT-Mitochondrien inkubiert wurden. Importierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie detektiert.

### 3.1.6 Importiertes Erv1 interagiert mit Mia40 über Disulfidbrücken

Für die bekannten Mia40-Substratproteine Tim13 und Cox17 wurde gezeigt, dass das Reduktionsmittel DTT inhibierend auf den Import wirkt (Mesecke et al., 2005). Um den Effekt von DTT auf den Import von Erv1 zu testen, wurde radioaktiv markiertes Erv1-Vorstufenprotein in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an DTT mit isolierten WT-Mitochondrien inkubiert. Im Gegensatz zum Kontrollprotein pSu9(1-69)DHFR war der Import von Erv1 sensitiv gegenüber reduzierendem Agenz (Abbildung 3.6A). Niedrige DTT-Konzentrationen stimulierten die Importeffizienz von Erv1, wohingegen höhere Konzentrationen den Import von Erv1 stark verminderten. Der Einfluß von Reduktionsmitteln auf den Import von Erv1 und die nötige Anwesenheit freier Thiolgruppen im Erv1-Vorstufenprotein deuten darauf hin, dass für die Translokation von Erv1 die Bildung von Disulfidintermediaten wichtig ist. Da Mia40 im IMR als Rezeptor für cysteinhaltige Substratproteine agiert und gezeigt wurde, dass der Import von Erv1 Mia40-abhängig ist, könnte es als Interaktionspartner von Erv1 in Frage kommen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde radioaktiv markiertes Erv1-Vorstufenprotein in isolierte WT-Mitochondrien importiert. Anschließend wurden Mitochondrien unter denaturierenden Bedingungen lysiert und das Lysat mit Antikörpern gegen Mia40 bzw. Präimmunserum inkubiert. Mit Hilfe des Mia40-Antikörpers konnte spezifisch ein Komplex aus Mia40 mit importiertem Erv1 aus Mitochondrien isoliert werden (Abbildung 3.6B). Wurden die Proben mit  $\beta$ -mercaptoethanol aufgetragen, zerfiel der Komplex und monomeres Erv1 wurde freigesetzt. Die Sensitivität des Komplexes gegenüber dem Reduktionsmittel weist auf die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen Mia40 und neu importiertem Erv1 hin. Da die Menge des Mia40-Erv1-Komplexes durch die weitere Inkubation mit chemischen Mengen an nichtmarkiertem Erv1 abnahm, handelt es sich um ein Intermediat, welches während der Importreaktion gebildet wird (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Erv1 während des Imports transient mit Mia40 über intermolekulare Disulfidbrücken interagiert. Der Import von Erv1 ist inhibiert, wenn die Ausbildung dieser Disulfidintermediate in Gegenwart von Reduktionsmitteln nicht mehr möglich ist.



**Abbildung 3.6 Die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken mit Mia40 ist wichtig für den Import von Erv1**

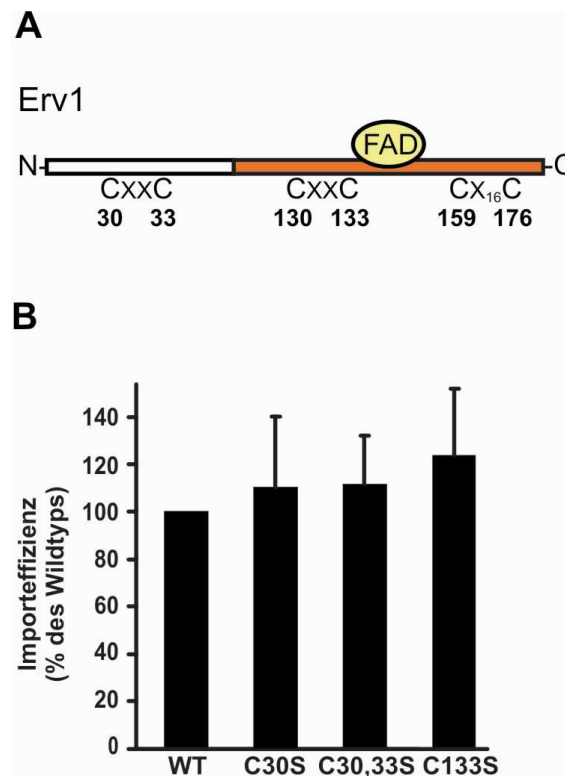
A) Der Import von Erv1 ist sensitiv gegenüber reduzierendem Agenz. Erv1- oder Su9(1-69)DHFR-Vorstufenprotein wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an DTT mit isolierten WT-Mitochondrien inkubiert. Die Menge an importiertem Vorstufenprotein wurde über Autoradiographie und Densitometrie analysiert. Die maximale Menge an importiertem Protein wurde 100% gesetzt.

B) Importiertes Erv1 bildet Disulfidbrücken mit Mia40. Isolierte WT-Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Erv1-Vorstufenprotein für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit 1% SDS lysiert und in Triton X-100-haltigem Puffer verdünnt. Die Überstände wurden mit Antikörpern gegen Mia40 ( $\alpha$ -Mia40) oder mit Präimmunsereum (PI) inkubiert. Die Proben wurden mittels nichtreduzierender ( $-\beta$ -ME) und reduzierender ( $+\beta$ -ME) SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Als „Total“ wurden 5% des eingesetzten Materials aufgetragen.

### 3.1.7 Die Anordnung der Cysteinreste in einem doppelten CX<sub>2</sub>C-Motiv ist für den Import von Erv1 nicht erforderlich

Bisher bekannte Substrate des Mia40/Erv1-Systems sind gekennzeichnet durch konservierte Cysteinreste, die typischerweise in *tw*in CX<sub>3</sub>C- oder *tw*in CX<sub>9</sub>C-Motiven angeordnet sind. Diese Cysteinreste bilden intramolekulare Disulfidbrücken aus, welche eine einfach gefaltete Domäne stabilisieren. Erv1 enthält ebenfalls konservierte Cysteinreste, welche sich allerdings in ihrer Anordnung und Funktion von bisherigen Substratproteinen unterscheiden: ein CX<sub>2</sub>C-Motiv liegt in der N-terminalen flexiblen Region, während sich das zweite CX<sub>2</sub>C-Motiv im aktiven Zentrum nahe des gebundenen FAD befindet (Abbildung 3.7A). Beide CX<sub>2</sub>C-Motive sind am Elektronentransfer auf FAD beteiligt und dienen vermutlich nicht der Stabilisierung des Proteins. Ist die Anordnung dieser Cysteinreste in einem doppelten CX<sub>2</sub>C-Motiv notwendig für den Import von Erv1?

Cysteinvarianten der beiden CX<sub>2</sub>C-Motive von Erv1 wurden generiert und in Retikulozytenlysat radioaktiv markiert synthetisiert. Diese Varianten wurden in Mitochondrien, die aus Mia40-überexprimierenden Zellen isoliert worden waren, importiert. Aus Abbildung 3.7B ist ersichtlich, dass sich die Importeffizienzen der Varianten C30S und C30,33S des ersten CX<sub>2</sub>C-Motivs ebenso wie die der Variante C133S des zweiten CX<sub>2</sub>C-Motivs nicht wesentlich von der Importeffizienz des WT-Erv1 unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass die Cysteinreste für den Import von Erv1 nicht in einem doppelten CX<sub>2</sub>C-Motiv angeordnet sein müssen. Um den Import zu ermöglichen, sind offensichtlich noch vorhandene Cysteinreste in diesen Varianten von Erv1 ausreichend.



**Abbildung 3.7 Der Import von Erv1 erfordert kein doppeltes CX<sub>2</sub>C-Motiv**

**A)** Schematische Darstellung von Erv1 aus Hefe. Erv1 besteht aus einem flexiblen N-Terminus und der katalytisch aktiven FAD-Bindedomäne (orange). Ein CX<sub>2</sub>C-Motiv befindet sich in der flexiblen Region, das zweite in der Nähe des gebundenen Kofaktors FAD. Ein weiteres Cysteinpaar bildet C-terminal eine stabilisierende Disulfidbrücke. Die Aminosäureposition der Cysteinreste im Protein ist angegeben.

**B)** Import von Cysteinvarianten von Erv1. Die im Diagramm angegebenen radioaktiv markierten Cysteinvarianten von Erv1 wurden für 20 min mit Mitochondrien inkubiert, die aus Mia40 überexprimierenden Zellen isoliert worden waren. Nichtimportiertes Material wurde durch PK-Behandlung entfernt. Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proben wurden mittels Autoradiographie und Densitometrie analysiert. Die Importeffizienz des WT-Erv1 wurde 100% gesetzt und die Effizienzen der Cysteinvarianten als Prozent des WT dargestellt. Der Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten ist im Diagramm gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Erv1 abhängig von Mia40 in den IMR von Mitochondrien importiert wird, wobei die Bildung von Disulfidintermediaten mit Mia40 notwendig ist. Die spezifische Anordnung der konservierten Cysteinreste in zwei CX<sub>2</sub>C-Motiven ist für den Import von Erv1 nicht erforderlich. Durch die Identifizierung von Erv1 als Substrat

des Mia40/Erv1-Systems wurde gezeigt, dass das Spektrum der Proteine, die diesen Importweg benutzen, größer als bisher angenommen ist.

### 3.2 Charakterisierung des Redoxzustandes von Mia40

Für die Funktion von Mia40 sind die konservierten Cysteinreste von entscheidender Bedeutung. Es wurde beobachtet, dass der Austausch benachbarter Cysteinpaare gegen Serinreste für Hefezellen letal ist (Naoe et al., 2004).

Mia40 ist in Mitochondrien größtenteils in einer oxidierten Form vorhanden, welche durch Behandlung mit DTT in eine reduzierte Form überführt wird (Mesecke et al., 2005). Das bedeutet, dass Cysteinreste in Mia40 intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, die reduziert werden können. Allerdings ist bislang nicht bekannt, in welchem Redoxzustand die einzelnen Cysteinreste vorliegen und welche Cysteinreste miteinander verknüpft sind. Für die Interaktion von neu importierten Proteinen scheint Mia40 in der oxidierten Form erforderlich zu sein, die dem Modell zufolge, nach einem absolvierten Importzyklus regeneriert werden muß.

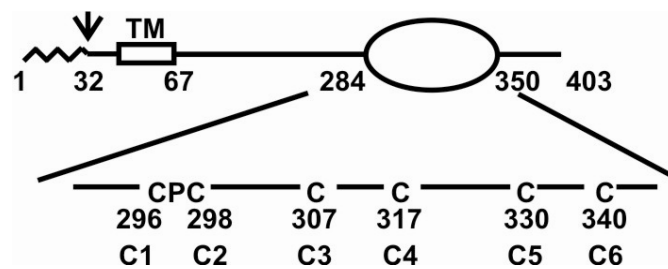
Um die Funktionsweise von Mia40 im Importprozess von IMR-Proteinen zu verstehen, ist es wichtig, die Redoxzustände von Mia40 auf molekularer Ebene, insbesondere auch die Identität und Funktion der Disulfidbrücken, zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde Mia40 rekombinant gereinigt und charakterisiert.

#### 3.2.1 Die hochkonservierte C-terminale Domäne von Mia40 ist funktionell

Mia40 ist in Hefe mit einem N-terminalen Transmembransegment in der Innenmembran verankert, während der größte Teil des Proteins in den IMR exponiert wird. Da sich die Reinigung von Membranproteinen oft als schwierig erweist, wäre es vorteilhaft, Mia40 ohne das Transmembransegment reinigen zu können. Mia40-Homologe weisen eine hochkonservierte C-terminale Domäne auf, die in Hefe alle in Mia40 vorkommenden Cysteinreste beinhaltet (Abbildung 3.8). Zunächst wurde getestet, ob die konservierte C-terminale Domäne ausreicht, um Vollängen-Mia40 *in vivo* funktionell ersetzen zu können. Dazu wurde der Aminosäureabschnitt 284-403 direkt an das N-terminale Sortierungssignal und das Transmembransegment von Mia40 kloniert und im  $\Delta mia40$ -Hintergrund exprimiert (Terziyska et al., 2009). Es zeigte sich, dass die Hefezellen durch Expression des verkürzten Mia40-Konstruktes lebensfähig waren. Wurde der

C-terminale Abschnitt von Mia40 als lösliches Protein in den IMR sortiert, konnte die Deletion des Vollängen-Mia40 ebenfalls komplementiert werden (Terziyska et al., 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Segment der Aminosäurereste 284-403, welches die konservierte Domäne von Mia40 umfasst, funktionell aktiv ist und ausreicht, um das Vollängen-Protein zu ersetzen. Somit kann dieses Segment verwendet werden, um die Redoxzustände von Mia40 zu charakterisieren. Dazu war es notwendig, diesen Proteinabschnitt von Mia40 rekombinant in *E.coli* Zellen zu exprimieren und zu reinigen.



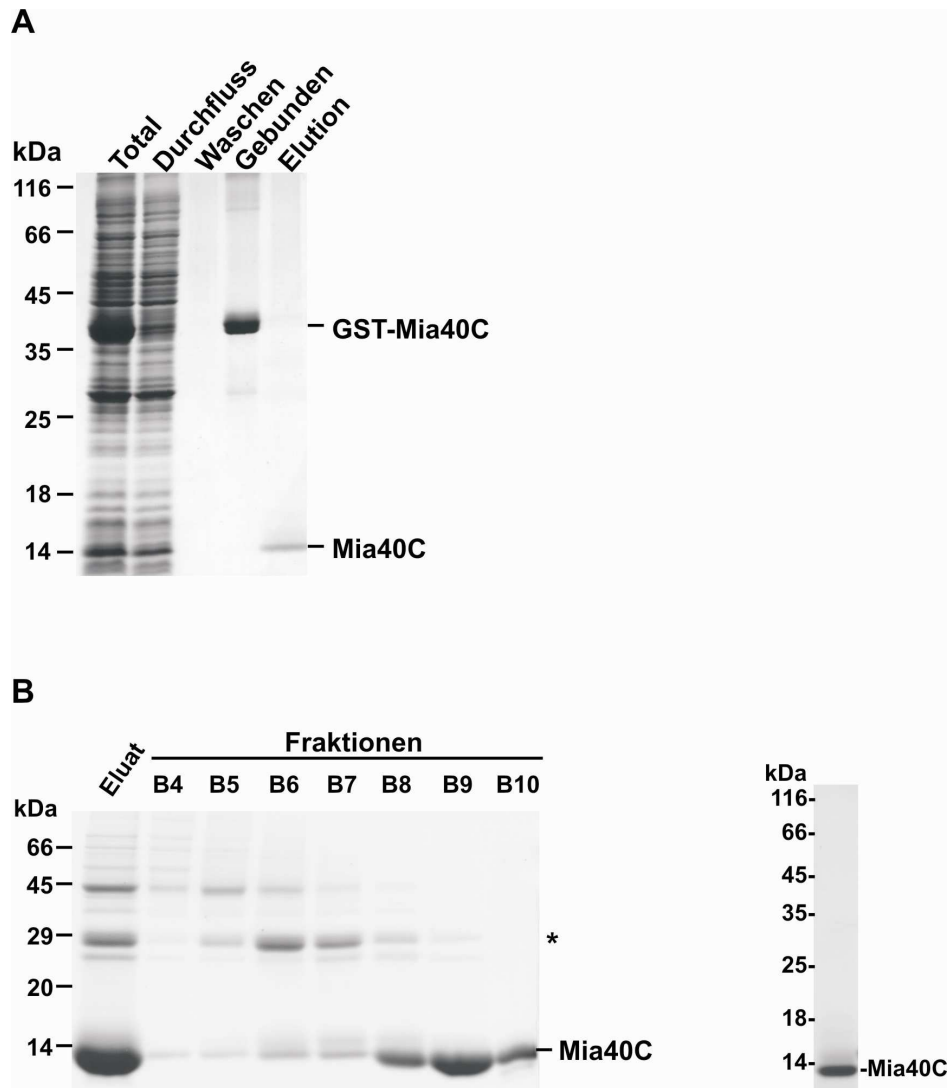
**Abbildung 3.8 Strukturmodell von Mia40**

Das C-terminale Fragment von Mia40, bestehend aus den Aminosäureresten 284-403, Mia40C, umfasst eine hochkonservierte Domäne (oval, 284-350). Diese Domäne enthält sechs invariante Cysteinreste, die in einem CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C-Motiv angeordnet sind. Die Cysteinreste und ihre jeweilige Aminosäureposition sind angegeben. Zur Vereinfachung wurden die sechs Cysteinreste im weiteren Verlauf als C1 bis C6 bezeichnet. Das mitochondriale Sortierungssignal von Mia40 wird durch MPP (*matrix processing peptidase*) abgespalten, angezeigt durch einen Pfeil. Mia40 ist mit einem Transmembransegment (TM) in der inneren Mitochondrienmembran verankert.

### 3.2.2 Reinigung von Mia40C

Die verkürzte Form von Mia40, welche die Aminosäurereste 284-403 umfasst, nachfolgend Mia40C genannt, wurde als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E.coli* XL1blue Zellen exprimiert. Nach Zellaufschluß und Sedimentation der Zellbruchstücke verblieb GST-Mia40C als lösliches Protein im Überstand und konnte daraus an eine Glutathion-Sepharose Säule gekoppelt werden. Das Entfernen des GST-Anhangs erfolgte an der Säule durch Zugabe von Pre-scission Protease, welche eine Sequenz zwischen GST und Mia40C erkennt und schneidet. Da die Protease ebenfalls einen GST-Anhang besitzt, blieb sie an der Säule gebunden,

während geschnittenes Mia40C mit einer Ausbeute von etwa 60 mg aus drei Litern *E.coli* Kultur eluiert werden konnte (Abbildung 3.9A).



**Abbildung 3.9 Reinigung von Mia40C**

A) Isolierung von Mia40C aus *E.coli* Zellen über eine Glutathion Sepharose Säule. GST-Mia40C wurde in *E. coli* Zellen (3 l Kultur) exprimiert. Nach Induktion der Expression für 5 h wurden die Zellen in Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,0; 200 mM NaCl, 1 mM PMSF) und 0,2 mg/ml Lysozym durch Sonifizierung aufgeschlossen und Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst über eine Glutathion Sepharose Säule gegeben, die anschließend mit Puffer gewaschen wurde. Um den GST-Anhang zu entfernen, wurde Precision Protease (0,05 mg/ml) zugegeben und für 3 h bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurde das von der Säule geschnittene Mia40C eluiert. Proben aus dem Überstand (Total, 0,03% des aufgeschlossenen Materials), dem Durchfluß



(0,03%), dem Waschschritt (Waschen, 0,16%), dem an der Säule gebundenen Material (Gebunden, 0,03%) und der Elution (0,06%) wurden mittels nichtreduzierender SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung analysiert.

**B)** Gelfiltrationschromatographie von Mia40C. Das eluierte Protein wurde zunächst durch Ultrazentrifugation (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) auf ein Volumen von etwa 1,5 ml eingengt. 5 mg Protein wurden in einem Volumen von 500  $\mu$ l auf eine voräquilibrierte Superdex75 Gelfiltrationssäule appliziert. Mia40C wurde mit 1,5 Säulenvolumen Puffer (20 mM Tris pH 7,0, 40 mM NaCl) und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 500  $\mu$ l Fraktionen eluiert. Eine Probe des auf die Säule aufgetragenen Materials (Eluat, 20  $\mu$ l) wurde zusammen mit Proben (20  $\mu$ l) der gesammelten Fraktionen durch nichtreduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt. Die Probe einer Fraktion, die für weitere Experimente verwendet wurde, ist rechts in der Abbildung gezeigt. \*, Mia40-Dimer

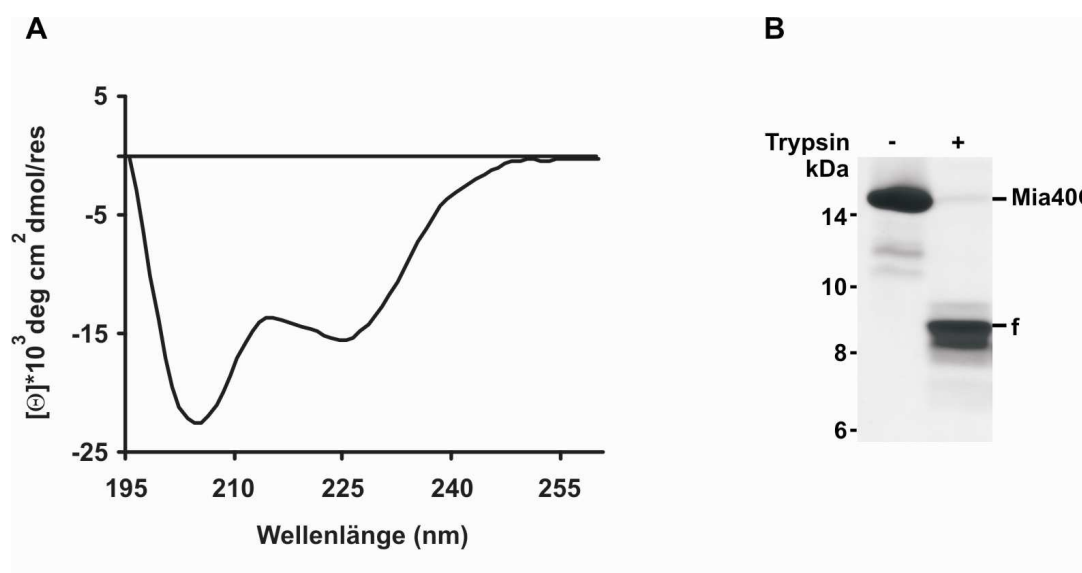
Neben monomerem Mia40C enthielt die eluierte Fraktion auch Mia40C-Spezies, die über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden waren. Um eine homogene Fraktion von monomerem Mia40C zu erhalten, wurde das Gemisch durch Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex75-Säule aufgetrennt. Mia40C eluierte in zwei eng aufeinanderfolgenden Peaks. Durch Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung stellte sich heraus, dass im ersten Peak vor allem dimere Spezies von Mia40C und andere Proteinkontaminationen eluierten (Abbildung 3.9B, Fraktionen B5-B7), während im zweiten Peak überwiegend monomeres Mia40C eluierte (Abbildung 3.9B, Fraktionen B8-B10). Diese homogenen Fraktionen von Mia40C wurden für weitere Experimente verwendet. Die erfolgreiche Etablierung der Reinigung von Mia40C stellte den notwendigen Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung von Mia40C dar.

### 3.2.3 Biochemische Charakterisierung von Mia40C

Für die Funktion eines Proteins ist die richtige Faltung von entscheidender Bedeutung. Das verkürzte Konstrukt von Mia40 ist in Hefezellen funktionell und somit in eine native Konformation gefaltet. Ob auch das entsprechende in *E.coli* Zellen exprimierte und rekombinant gereinigte Konstrukt Mia40C Sekundärstrukturen aufweist, wurde zunächst mittels Circular dichroismus (CD)-Spektrometrie analysiert (Abbildung 3.10A). Die Messungen ergaben einen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur von 30% und nur geringe Werte für unstrukturierte Anteile

(*random coil*). Diese Ergebnisse ließen die Aussage zu, dass gereinigtes Mia40C in einer gefalteten Konformation vorliegt.

Die Behandlung von Mitoplasten mit Trypsin führt zu einem proteaseresistenten Fragment des endogenen Mia40 (Terziyska et al., 2005). Deswegen sollte die Faltung von Mia40C zusätzlich durch partielle Resistenz des gereinigten Proteins gegenüber Proteaseverdau bestätigt werden. Die Behandlung von Mia40C mit Trypsin führte zur Bildung eines stabilen Fragments von etwa 9,8 kDa (Abbildung 3.10B). Nach massenspektrometrischer Analyse besteht dieses Fragment aus den Aminosäureresten 284-367. Somit konnte gezeigt werden, dass Mia40C eine proteaseresistent gefaltete Domäne besitzt, die alle sechs konservierten Cysteinreste enthält.



**Abbildung 3.10 Rekombinantes Mia40C ist gefaltet**

A) CD-Spektrum von Mia40C. CD-Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektrometer durchgeführt. Die Proteinkonzentration der Proben betrug 0,1 mg/ml in 20 mM Tris, pH 7,0, 40 mM NaCl. Das Spektrum repräsentiert den Durchschnitt von vier aufeinanderfolgenden Durchläufen von 190-260 nm in 0,2 nm Intervallen, wovon das Spektrum des Puffers abgezogen wurde. Die Berechnung der Zusammensetzung der Sekundärstruktur ergab einen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur von 30%.

B) Trypsinbehandlung von Mia40C erzeugt ein stabiles Fragment. Mia40C wurde für 20 min bei 25°C mit Trypsin (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung analysiert. f, trypsin-resistentes Fragment von Mia40C, das die Aminosäurereste 284-367 umfasst.

### 3.2.4 Mia40 enthält drei Disulfidbrücken mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber DTT

Das gereinigte Protein Mia40C wurde verwendet, um die Redoxzustände von Mia40 zu analysieren. Es sollte geklärt werden, welche Cysteinreste in der oxidierten Form Disulfidbrücken ausbilden und wie sie sich unter reduzierenden Bedingungen verhalten.

Zunächst wurde untersucht, wie viele Disulfidbrücken in der oxidierten und reduzierten Form von Mia40 vorliegen. Dazu wurde gereinigtes Mia40C unter verschiedenen Redoxbedingungen mit AMS (Invitrogen) behandelt. AMS alkyliert freie Thiolgruppen, während Cysteinreste in oxidiertem Zustand nicht modifiziert werden. Die Modifikation mit einem Molekül AMS führt zu einer Addition von 0,5 kDa zum Molekulargewicht des Proteins. Unterschiede in der Anzahl der Modifikationen lassen sich somit über das Laufverhalten des Proteins im SDS-Gel nachvollziehen.

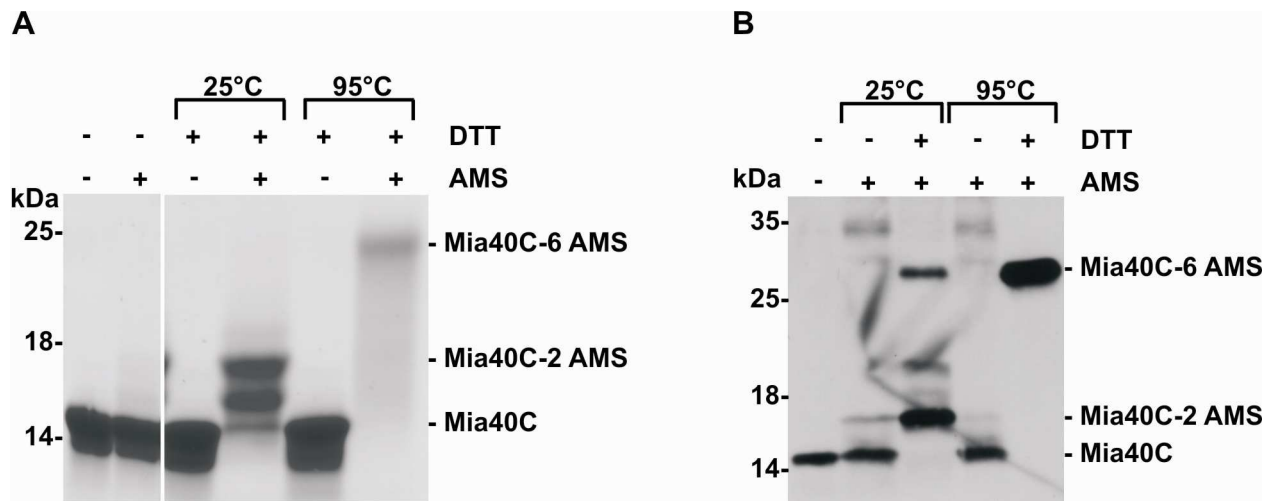
Nach der Behandlung von gereinigtem Mia40C mit AMS wurde keine Veränderung im Laufverhalten des Proteins im Vergleich zur Kontrollprobe beobachtet (Abbildung 3.11A). Das Fehlen freier Thiolgruppen spricht für ein vollständig oxidiertes Protein, in dem alle sechs Cysteinreste an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sind. Wurde Mia40C mit dem Reduktionsmittel DTT bei 25°C inkubiert, lief das Protein im SDS-Gel langsamer als zuvor, was auf die Bildung freier Thiolgruppen hindeutete, welche mit AMS modifiziert wurden. Nach Inkubation des Proteins bei 95°C in Gegenwart von DTT kam es durch die Modifikation mit AMS zu einer noch stärkeren Mobilitätsverlangsamung von Mia40C. Unter nativen Bedingungen konnten offensichtlich nicht alle Disulfidbrücken reduziert werden. Wie aus Abbildung 3.11A hervorgeht, wurde partiell reduziertes Mia40C mit zwei Molekülen AMS modifiziert, was bedeutet, dass im Protein zwei reduzierte Cysteinreste und zwei Disulfidbrücken vorliegen. Durch Hitzedenaturierung unter reduzierenden Bedingungen werden diese ebenfalls geöffnet, so dass vollständig reduziertes Mia40C entsteht. Diese Spezies zeigte ein langsames Laufverhalten als man nach Modifikation mit sechs Molekülen AMS erwarten würde. Wahrscheinlich wird dieses ungewöhnliche Laufverhalten durch Veränderungen in der Struktur des Proteins verursacht, wenn Disulfidbrücken geöffnet werden.

Als nächstes wurde getestet, ob die Redoxzustände des rekombinanten Proteins das Redoxverhalten von Mia40 in Mitochondrien widerspiegeln. Dazu wurde das Konstrukt Mia40C in WT-Hefezellen exprimiert und die Redoxzustände unter den verschiedenen Bedingungen untersucht. In Mitochondrien, die nicht mit DTT behandelt worden waren, konnte Mia40C nicht

mit AMS modifiziert werden (Abbildung 3.11B). Durch die Behandlung mit DTT unter nativen Bedingungen wurde Mia40C partiell reduziert. Hitzedenaturierung in Gegenwart von DTT führte dagegen zu vollständiger Reduktion, indiziert durch die Mobilitätsverlangsamung des Proteins infolge der Inkubation mit AMS. Demnach ist das Redoxverhalten des gereinigten Mia40C vergleichbar mit dem Redoxverhalten, das für Mia40 in Mitochondrien beobachtet wurde.

Die Anzahl der Disulfidbrücken der verschiedenen Redoxformen von Mia40 wurde in Zusammenarbeit mit Vincent Stroobant durch Massenspektrometrie verifiziert. Für unbehandeltes Mia40C wurde eine molekulare Masse von 13.842,2 Da gemessen, die dem oxidierten Protein mit drei Disulfidbrücken entspricht. Inkubation mit dem thiolmodifizierenden Reagenz NEM änderte die molekulare Masse von Mia40C nicht, übereinstimmend mit der Abwesenheit freier Thiolgruppen. Wurde Mia40C bei 95°C mit DTT behandelt, resultierte eine molekulare Masse von 13.848,8 Da, welche dem vollständig reduzierten Protein entspricht. Die Modifikation dieser Probe mit NEM führte zu einer molekularen Masse von 14.598,8 Da, entsprechend der Addition von sechs Molekülen NEM (125 Da/Molekül NEM). Dagegen wurde Mia40C bei Raumtemperatur nur partiell reduziert. Die gemessene molekulare Masse von 13.844,2 Da ließ darauf schließen, dass diese reduzierte Form zwei freie Thiolgruppen enthält. Die Modifikation der Probe mit zwei Molekülen NEM, resultierend in einer molekularen Masse von 14.094,6 Da, bestätigte die Anwesenheit von zwei reduzierten Cysteinresten und zwei Disulfidbrücken.

Die Ergebnisse zeigen, dass die sechs Cysteinreste in Mia40C drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden; Mia40C liegt also unter nativen Bedingungen vollständig oxidiert vor. Eine dieser Brücken wird sehr leicht reduziert, während die beiden anderen Disulfidbrücken unter reduzierenden nativen Bedingungen weitgehend stabil bleiben.



**Abbildung 3.11 Mia40C enthält unterschiedlich stabile Disulfidbrücken**

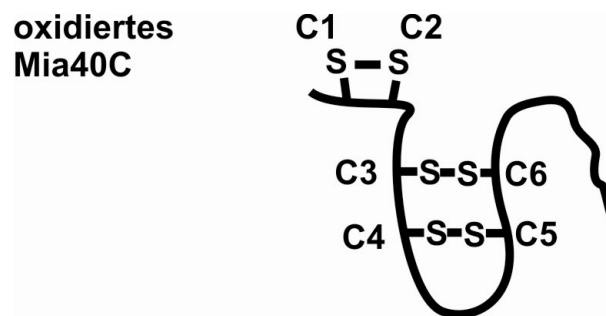
**A)** Redoxzustand von rekombinantem Mia40C. Gereinigtes Mia40C wurde mit 5 mM DTT bei 25°C und 95°C oder ohne DTT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 30 mM AMS für 30 min behandelt, um freie Thiolgruppen zu modifizieren oder ohne AMS inkubiert. Die Proben wurden über eine reduzierende (80 mM DTT im Laemmli-Puffer) SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

**B)** Redoxzustand von Mia40C in Mitochondrien. Mitochondrien wurden aus Mia40C exprimierenden Hefezellen isoliert und in 4% SDS lysiert. Der mitochondriale Extrakt wurde mit 10 mM DTT bei 25°C und 95°C oder ohne DTT inkubiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, in Puffer mit 2% SDS resuspendiert und anschließend mit 15 mM AMS behandelt oder ohne AMS inkubiert. Die Proben wurden mittels nichtreduzierender SDS-PAGE und nachfolgender Immundekoration mit Mia40-spezifischen Antikörpern analysiert.

Welche Cysteinreste sind miteinander über Disulfidbrücken verknüpft? Mittels Massenspektrometrie sollten Peptide von Mia40C detektiert werden, die über Disulfidbrücken zusammenhängen, so dass die Identität der beteiligten Cysteinreste ermittelt werden konnte (Grumbt et al., 2007). Nach dem Verdau von Mia40C mit Trypsin in Gegenwart von 2 M Harnstoff, wurden zwei tryptische Peptide mit den molekularen Massen 2325 und 4731 Da detektiert. Für das erste Peptid ergab die massenspektrometrische Analyse eine Verknüpfung von zwei Fragmenten über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C4 und C5. Die Analyse des zweiten Peptids deutete auf eine Verbindung des Cysteinrestes C6 mit einem der ersten drei Cysteinreste hin. Eine nachfolgende Tandem-Massenspektrometrieanalyse ergab eine

Disulfidverknüpfung zwischen C6 und dem Cysteinrest C3. Die dritte Disulfidbrücke in oxidiertem Mia40 wird zwischen den Cysteinresten C1 und C2 gebildet.

Abbildung 3.12 zeigt schematisch das Anordnungsmuster der Disulfidbrücken in oxidiertem Mia40C. Die CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs werden durch zwei Disulfidbrücken zwischen den proximalen (C3-C6) und distalen (C4-C5) Cysteinresten verbunden. Die ersten beiden Cysteinreste (C1-C2) bilden eine Disulfidbrücke im CPC-Segment.



**Abbildung 3.12 Darstellung der Disulfidbrückenordnung in Mia40C**

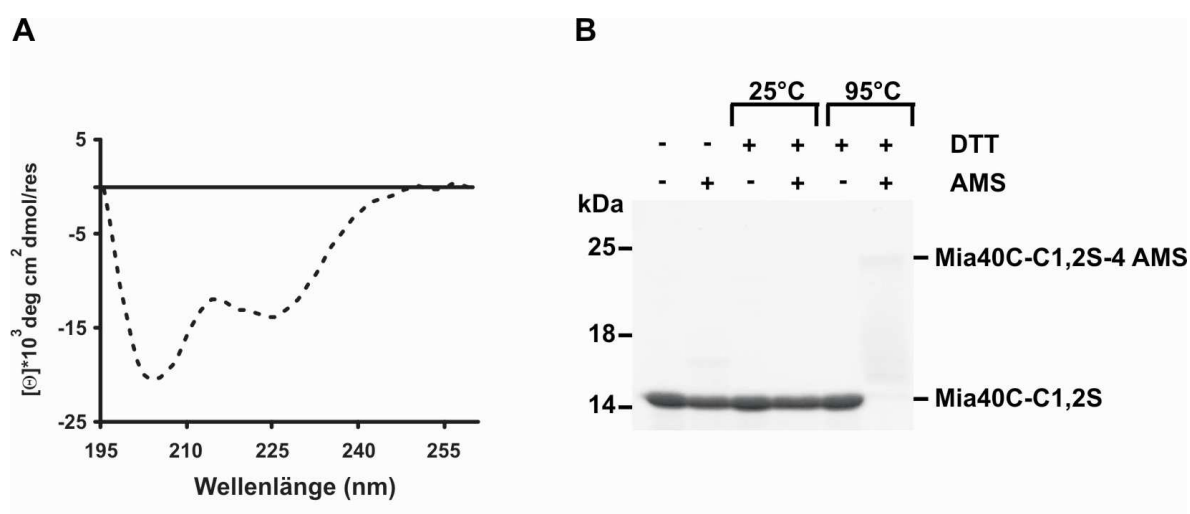
Die ersten beiden Cysteinreste im CPC-Segment bilden eine Disulfidbrücke. Die CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs sind durch zwei weitere Disulfidbrücken zwischen den proximalen und distalen Cysteinresten verbunden.

### 3.2.5 Die Cysteinreste des CPC-Segments bilden eine redoxensitive Disulfidbrücke

Welche der Disulfidbrücken wird schon unter nativen Bedingungen leicht reduziert? Am wahrscheinlichsten erschien dafür die Disulfidbrücke im CPC-Segment von Mia40C, da die nahe Anordnung der Cysteinreste die Ausbildung einer stabilen Brücke behindern könnte. In Studien mit artifiziellen Peptiden wurde gezeigt, dass Disulfidbrücken in einer CXC-Anordnung relativ instabil sind (Zhang und Snyder, 1989).

Deshalb wurde eine Variante von Mia40C kloniert, in der die Cysteinreste des CPC-Segments gegen Serinreste ausgetauscht wurden. Diese Variante Mia40C-C1,2S wurde in *E.coli* Zellen exprimiert und wie Mia40C gereinigt. Um auszuschließen, dass der Austausch der Cysteinreste Änderungen in der Struktur des Proteins verursacht haben könnte, wurden CD-Spektren des Proteins gemessen. Wie aus Abbildung 3.13A hervorgeht, ist Mia40C-C1,2S in ähnlicher Weise gefaltet wie Mia40C. Nun wurden die Redoxzustände der Variante durch Modifikation mit AMS

charakterisiert. Gereinigtes Mia40C-C1,2S wurde nicht mit AMS alkyliert, was auf ein vollständig oxidiertes Protein hinweist (Abbildung 3.13B). Die gemessene molekulare Masse von 13.812,3 Da bestätigte die Anwesenheit von zwei Disulfidbrücken in Mia40C-C1,2S. Auch durch DTT-Behandlung bei Raumtemperatur wurde die Variante im Gegensatz zu Mia40C nicht mit AMS modifiziert. Demnach wurde Mia40C-C1,2S nicht reduziert und enthält folglich keine redox-sensitive Disulfidbrücke. Erst durch Inkubation mit DTT bei 95°C wurde die Variante in eine vollständig reduzierte Form überführt.



**Abbildung 3.13 Mia40C-C1,2S enthält keine redox-sensitive Disulfidbrücke**

**A)** CD-Spektrum von Mia40C-C1,2S. CD-Messungen wurden wie in 3.10A beschrieben durchgeführt.

**B)** Redoxzustand von Mia40C-C1,2S. Gereinigtes Mia40C-C1,2S wurde mit 5 mM DTT bei 25°C und 95°C oder ohne DTT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 30 mM AMS für 30 min behandelt oder ohne AMS inkubiert. Die Proben wurden über eine reduzierende (80 mM DTT im Laemmli-Puffer) SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

Die Ergebnisse der Charakterisierung von Mia40C-C1,2S wurden durch massenspektrometrische Analysen von partiell reduziertem Mia40C unterstützt. Partiiell reduziertem Mia40C wurde mit NEM modifiziert und mit Trypsin verdaut. Es wurden zwei tryptische Peptide mit den molekularen Massen 2325 und 4983 Da detektiert. Der Massenunterschied des zweiten Peptids (4983 Da) zum Peptid, welches durch Trypsinverdau des oxidierten Mia40C entsteht (4731 Da), entspricht der Modifikation von zwei Cysteinresten mit NEM. Anschließend Tandem



Massenspektrometrie des Peptids lieferte die Information, dass die Cysteinreste C1 und C2 mit NEM modifiziert worden waren.

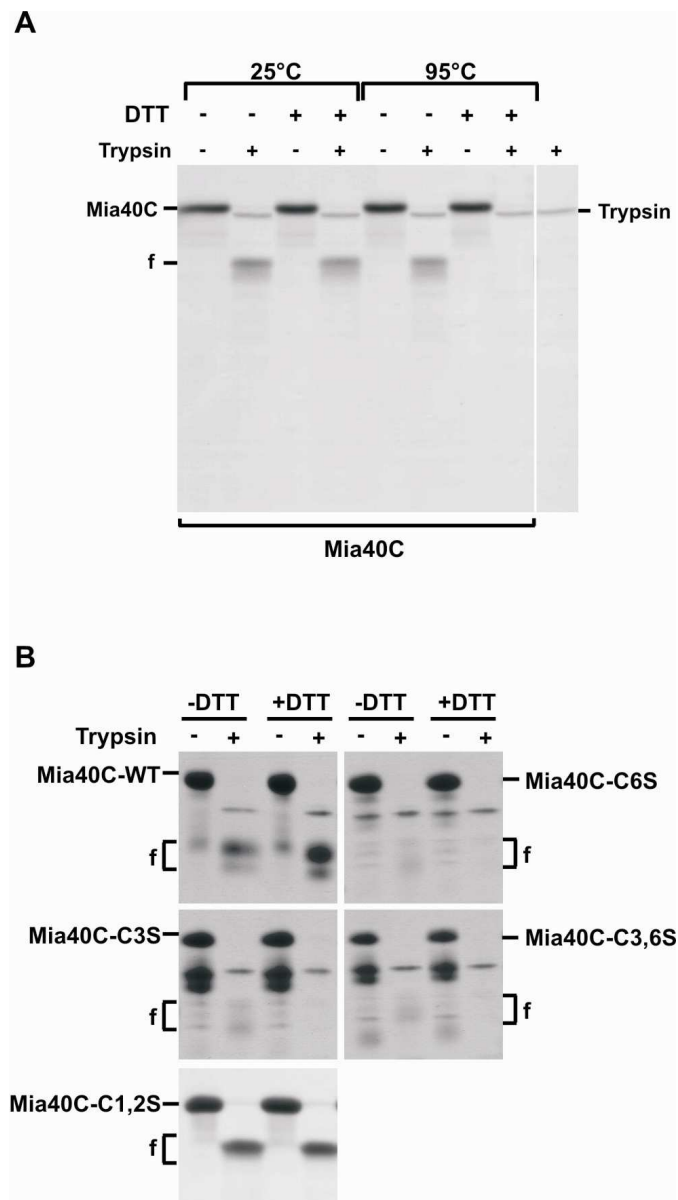
Somit konnte bestätigt werden, dass die leicht reduzierbare Disulfidbrücke in Mia40C von den Cysteinresten C1 und C2 im CPC-Segment gebildet wird. In der Variante Mia40C-C1,2S fehlen diese beiden Cysteinreste, so dass erst durch Hitzedenaturierung die verbleibenden zwei Disulfidbrücken reduziert werden.

### 3.2.6 Die Disulfidbrücken im *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motiv stabilisieren Mia40

Um den Einfluß der Disulfidbrücken auf die Stabilität von Mia40C zu überprüfen, wurde die Proteaseresistenz der verschiedenen Redoxformen von Mia40C gegenüber Trypsin getestet. Oxidiertes und partiell reduziertes Mia40C wurden zu dem bereits unter 3.2.3 beschriebenen trypsinresistenten Fragment abgebaut (Abbildung 3.14A). Die Reduktion der Disulfidbrücke im CPC-Segment scheint demnach die Stabilität des Proteins nicht zu beeinflussen. Wurden dagegen die restlichen Disulfidbrücken in Mia40C bei 95°C geöffnet, konnte kein stabiles Fragment detektiert werden (Abbildung 3.14A). Vollständig reduziertes Mia40C wurde demnach durch Trypsin vollständig degradiert, wohingegen alleinige Hitzedenaturierung des Proteins keinen Einfluß auf die Stabilität von Mia40C hatte.

Cysteinvarianten des CPC-Segments, wie Mia40C-C1,2S, wurden nach Reduktion bei 25°C zu einem stabilen Fragment abgebaut (Abbildung 3.14B). Die Abwesenheit der ersten Disulfidbrücke beeinträchtigt somit nicht die Ausbildung einer stabil gefalteten Domäne. Dagegen führte der Trypsinverdau der Cysteinvarianten Mia40C-C3S, -C6S und -C3,6S nur zu geringen Mengen des detektierbaren Fragments, während der größte Teil des Proteins vollständig degradiert wurde. In Anwesenheit von DTT konnte kein Fragment detektiert werden (Abbildung 3.14B). Dies deutet darauf hin, dass die stabil gefaltete Domäne nicht gebildet wird, wenn die proximale Disulfidbrücke im *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motiv fehlt. Die Cysteinreste C3 und C6 spielen daher eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität des Proteins. Die Verbindung der CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs über Disulfidbrücken scheint die C-terminale Domäne in Mia40 zu stabilisieren, während die Cysteinreste des CPC-Segments dafür nicht nötig sind.





**Abbildung 3.14 Einfluß der Disulfidbrücken auf die Stabilität von Mia40C**

A) Vollständig reduziertes Mia40C ist nicht gefaltet. Mia40C wurde mit oder ohne DTT bei 25°C oder 95°C inkubiert und anschließend mit Trypsin (0,05 mg/ml) für 20 min bei 25°C behandelt. Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von PMSF gestoppt, bevor die Proben über Harnstoff-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt wurden. f, trypsinresistentes Fragment.

B) Die Faltung von Mia40 ist in Cysteinvarianten des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs betroffen. Mia40C und die genannten Cysteinvarianten wurden mit 5 mM DTT oder ohne DTT bei 25°C inkubiert und mit Trypsin behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung analysiert. f, trypsinresistente Fragmente.

### 3.3 Rekonstitution des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems

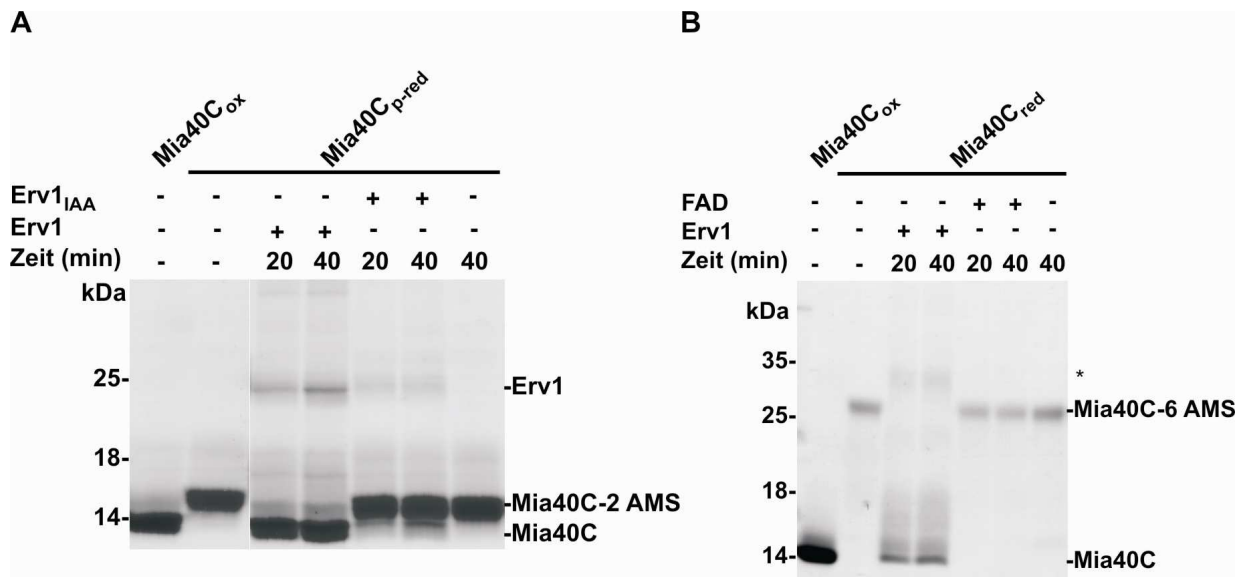
#### 3.3.1 Oxidation von Mia40 durch Erv1

In Mitochondrien interagieren Mia40 und Erv1 über eine Disulfidbrücke (Mesecke et al., 2005). Mia40 könnte somit das erste bekannte physiologische Substratprotein von Erv1 sein, insbesondere, da Mia40 vermehrt in der reduzierten Form vorliegt, wenn Erv1 in Mitochondrien depletiert wurde. Allerdings wurde bislang ein Transfer von Disulfidbrücken von Erv1 auf Mia40 nicht gezeigt. Daher sollte geklärt werden, ob Erv1 ausreichend ist, um Mia40 zu oxidieren oder ob weitere Komponenten an diesem Prozess beteiligt sind.

##### 3.3.1.1 Mia40 wird durch die Thioloxidase Erv1 oxidiert

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob Erv1 Disulfidbrücken auf Mia40 überträgt. Erv1 wurde aus *E.coli* Zellen als Fusionsprotein mit C-terminalem Histidin-Anhang über eine NiNTA-Säule gereinigt. Aus dem Absorptionsspektrum des gereinigten Proteins ging hervor, dass der Kofaktor FAD gebunden war (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass Erv1 gefaltet und oxidiert war. Zudem wurde für dieses Erv1-Konstrukt bereits gezeigt, dass es Thioloxidaseaktivität besitzt (Lee et al., 2000). Um zu testen, ob Mia40 durch Erv1 oxidiert werden kann, wurde partiell reduziertes Mia40C mit rekombinantem Erv1 inkubiert. Durch Modifikation mit AMS konnte die reduzierte von der oxidierten Form von Mia40 im SDS-Gel unterschieden werden. Als Kontrolle wurde partiell reduziertes Mia40 entweder mit Puffer oder mit reduziertem und mit Iodacetamid (IAA, Sigma) modifiziertem Erv1 inkubiert. Wie aus Abbildung 3.15A ersichtlich, verhinderte die Inkubation von Erv1 mit Mia40C bereits nach 20 min die Modifikation von Mia40C mit AMS. Offensichtlich waren freie Thiolgruppen oxidiert worden. Diese Reaktion war abhängig von Erv1, da Mia40 in den Kontrollproben auch nach 40 min weiterhin mit AMS modifiziert wurde. Auch die vollständig reduzierte Form von Mia40C wurde durch Inkubation mit Erv1 oxidiert, wohingegen die Inkubation mit FAD oder Puffer keinen Effekt auf den Redoxzustand von Mia40C hatte (Abbildung 3.15B).

Diese Experimente demonstrieren, dass Erv1 Disulfidbrücken sowohl auf partiell als auch auf vollständig reduziertes Mia40C übertragen kann, ohne dass weitere Proteine benötigt werden. Somit ist Mia40 ein Substrat der Sulphydryloxidase Erv1.



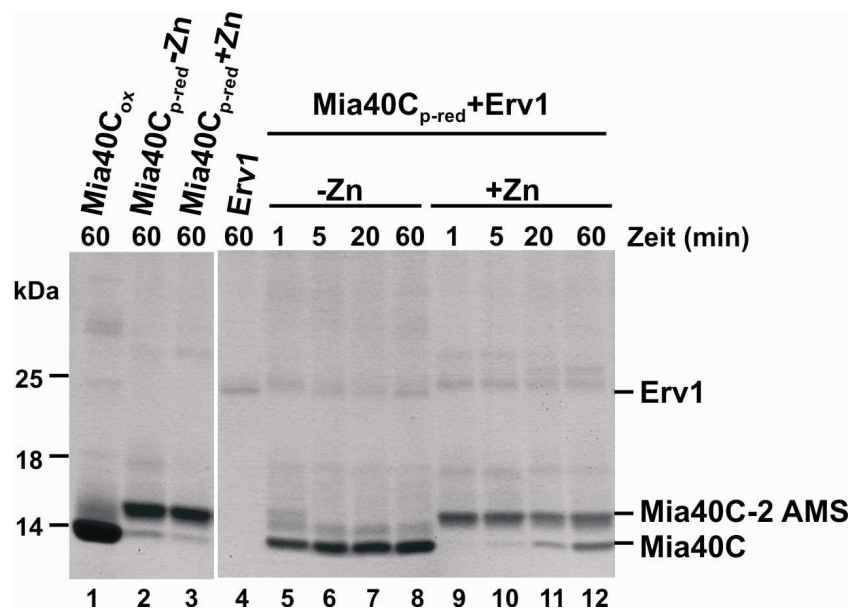
### Abbildung 3.15 Reduziertes Mia40C wird durch Erv1 oxidiert

**A)** Oxidation von partiell reduziertem Mia40C durch Erv1. Mia40C wurde durch Inkubation mit 5 mM DTT bei Raumtemperatur partiell reduziert. Durch Gelfiltration mittels einer NAP5-Säule (GE Healthcare) wurde das DTT wieder entfernt. Partiiell reduziertem Mia40 wurde in 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA eluiert und 7  $\mu$ g Protein (Mia40C<sub>p-red</sub>) wurden mit gereinigtem Erv1 (1  $\mu$ g) bei 25°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Als Kontrolle wurde partiell reduziertem Mia40C mit Puffer oder mit reduziertem Erv1 inkubiert, dessen Thiolgruppen mit IAA modifiziert worden waren. Alle Proben wurden anschließend für 30 min bei 25°C mit 30 mM AMS inkubiert und über nichtreduzierende SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung analysiert.

**B)** Oxidation von vollständig reduziertem Mia40 durch Erv1. Mia40C wurde durch Inkubation mit 5 mM DTT bei 95°C reduziert. Nach Entfernung des DTT wurde das reduzierte Mia40C (Mia40C<sub>red</sub>, 7  $\mu$ g) mit Erv1 (1  $\mu$ g), 4  $\mu$ M FAD oder Puffer bei 25°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Ansätze wurden mit AMS inkubiert und analysiert wie in **A)** beschrieben. Die in **A)** und **B)** beschriebenen Reaktionen wurden unter mikroanaeroben Bedingungen in einer mit Stickstoff gefüllten „glove bag“ (Roth) durchgeführt. \*, vermutlich geringe Mengen Mia40-Dimer, die bei der Reoxidation gebildet werden.

### 3.3.1.2 Zink inhibiert die Oxidation von Mia40 durch Erv1

*In vitro* konnte die Bindung von Zink- und Kupferionen an die IMR-Domäne von Mia40 nachgewiesen werden (Terziyska et al., 2005). Zinkionen könnten möglicherweise durch Cysteinreste, die in reduziertem Zustand vorliegen, koordiniert werden und eine Rolle bei der Stabilisierung der reduzierten Form von Mia40 spielen. Deshalb wurde untersucht, ob Zinkionen einen Einfluß auf die Oxidation von Mia40 haben. Partiiell reduziertes Mia40C, das nicht mit Zinkacetat vorinkubiert worden war, wurde bereits nach 5 min vollständig durch Erv1 oxidiert (Abbildung 3.16, Spuren 5-8). Im Gegensatz dazu war die Reoxidation von Mia40C, welches zuvor mit Zinkacetat inkubiert worden war, stark vermindert, so dass auch nach 60 min der größte Teil von Mia40C reduziert blieb (Abbildung 3.16, Spuren 9-12). Ein Effekt der verwendeten Zinkionen-Konzentrationen auf die Oxidaseaktivität von Erv1 wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.16 Zink übt einen inhibierenden Effekt auf die Oxidation von Mia40 durch Erv1 aus**

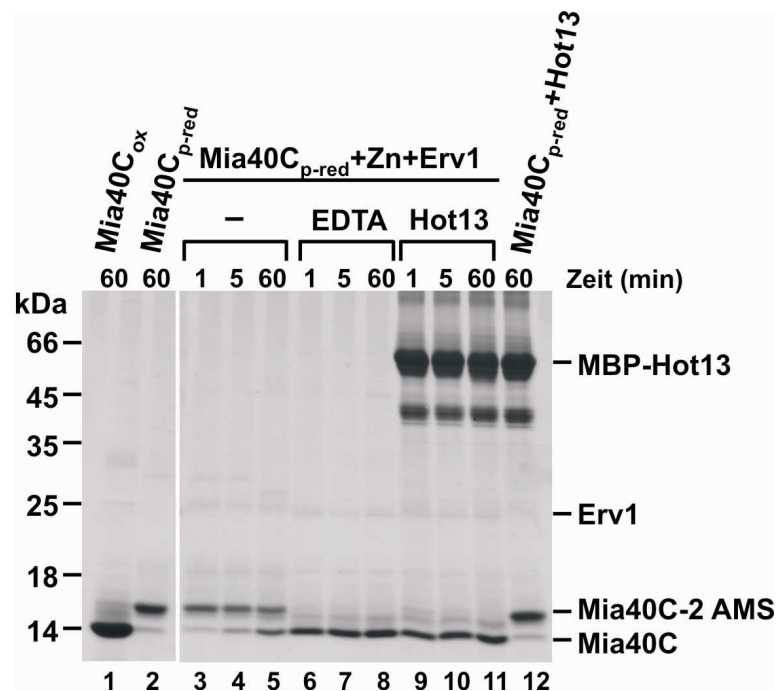
Mia40C wurde mit 10 mM DTT partiell reduziert und daraufhin mit oder ohne 50  $\mu$ M Zinkacetat für 20 min bei 25°C inkubiert. Nach der Entfernung freier Zinkionen und DTT durch Gelfiltration wurden 50  $\mu$ M Mia40 (Spuren 5-12) mit Erv1 (7  $\mu$ M) bei Raumtemperatur für die angegebenen Zeiten inkubiert. Alle Proben wurden mit 30 mM AMS modifiziert, bevor sie mittels nichtreduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt wurden.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die reduzierte Form von Mia40 Zinkionen binden kann und so stabilisiert wird. Dadurch wird die Oxidation von Mia40 durch Erv1 erschwert.

### 3.3.1.3 Hot13 hebt den inhibierenden Effekt von Zink auf die Oxidation von Mia40 auf

Da die Oxidation von Mia40 in Mitochondrien relativ schnell erfolgt, könnten weitere Faktoren an diesem Reaktionsschritt beteiligt sein. Ein möglicher Kandidat hierfür war das IMR-Protein Hot13. Hot13 wurde als Interaktionspartner der kleinen Tim-Proteine identifiziert und ist insbesondere an der Assemblierung dieser Proteine in ihre Komplexe beteiligt (Curran et al., 2004). Bislang war jedoch wenig über die molekulare Funktionsweise von Hot13 bekannt. Hot13 besitzt eine konservierte cysteinreiche Domäne, welche eine hohe Ähnlichkeit zu RING-Finger-Domänen aufweist, die Zinkionen koordinieren können. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Hot13 *in vitro* Zinkionen bindet (Mesecke et al., 2008). Weiterhin wurde beobachtet, dass in  $\Delta hot13$ -Mitochondrien Mia40 vermehrt in der reduzierten Form vorliegt, was vermuten läßt, dass Hot13 den Redoxstatus von Mia40 beeinflusst (Mesecke et al., 2008). Da gezeigt wurde, dass zinkbindendes Mia40 nur schlecht oxidiert werden kann, wurde untersucht, ob Hot13 auf die Zinkbindung von Mia40 wirkt und so dessen Reoxidation durch Erv1 erleichtert.

Zunächst wurde rekombinantes Hot13 in *E.coli* Zellen exprimiert und mittels eines MBP-Anhangs über eine Amylose-Säule gereinigt. Zinkgebundenes reduziertes Mia40C wurde mit Erv1 in Gegenwart von Hot13 oder EDTA inkubiert. Entfernung der Zinkionen von Mia40C durch Komplexierung mit EDTA führte zu einer effizienten Erv1-abhängigen Reoxidation von Mia40C, verglichen mit Proben ohne Zugabe von EDTA (Abbildung 3.17, Spuren 3-8). In gleicher Weise erlaubte die Anwesenheit von Hot13 eine schnelle Oxidation von Mia40C durch Erv1 (Abbildung 3.17, Spuren 9-11). Da der *in vitro* Ansatz nur die drei gereinigten Komponenten enthielt, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass Hot13 direkt mit Mia40C interagiert und es in eine zinkfreie Form überführt. Diese kann dann durch Erv1 oxidiert werden. Die alleinige Inkubation von reduziertem Mia40C mit Hot13 (Abbildung 3.17, Spur 12) führte nicht zur Oxidation von Mia40C, was gegen eine oxidierende Funktion von Hot13 spricht.



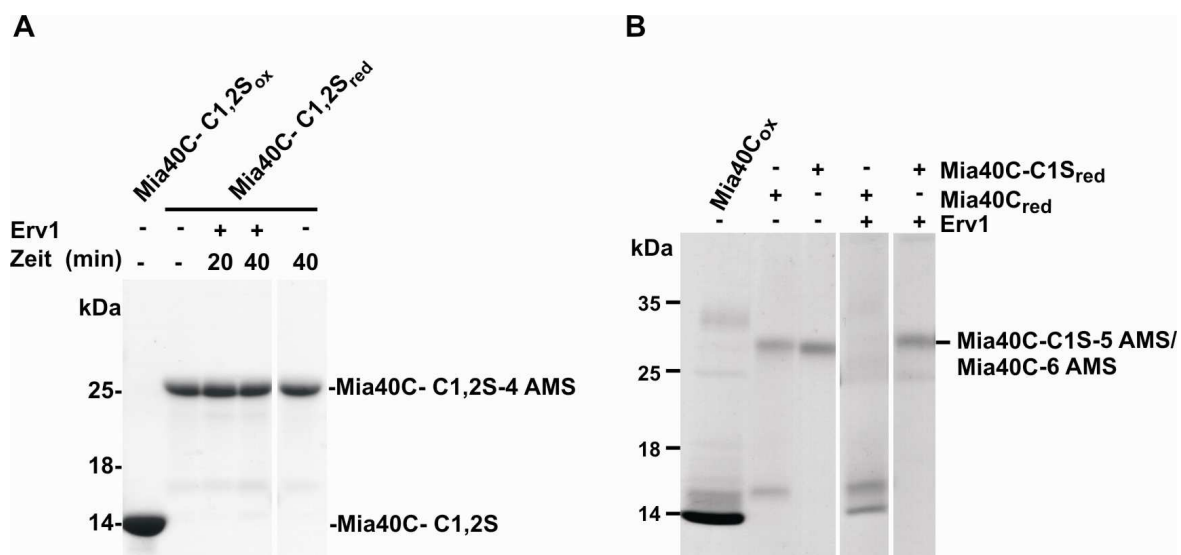
**Abbildung 3.17 Hot 13 vereinfacht die Oxidation von Mia40 durch Erv1 in Anwesenheit von Zinkionen**

Mia40C wurde mit 10 mM DTT partiell reduziert und daraufhin mit oder ohne 50  $\mu$ M Zinkacetat für 20 min bei 25°C inkubiert. Freie Zinkionen und DTT wurden über Gelfiltration entfernt. Anschließend wurden 50  $\mu$ M Mia40C mit 1 mM EDTA (Spuren 6-8), ohne EDTA (Spuren 3-5) oder mit gereinigtem MBP-Hot13 (50  $\mu$ M, Spuren 9-12) inkubiert. Die Proben der Spuren 3-11 wurden für die angegebenen Zeiten mit 7  $\mu$ M Erv1 weiterinkubiert und anschließend mit AMS behandelt. Alle Proben wurden mittels nichtreduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt.

### 3.3.1.4 Die ersten beiden Cysteinreste in Mia40 sind essentiell für den Disulfidbrückentransfer von Erv1 auf Mia40

Als nächstes wurde untersucht, welche Cysteinreste in Mia40 an der Disulfidbrückenübertragung von Erv1 auf Mia40 beteiligt sind. Da die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C1 und C2 redoxsensitiv ist und Erv1 partiell reduziertes Mia40 oxidiert, könnten die ersten beiden Cysteinreste eine wichtige Rolle in dieser Reaktion spielen. Deshalb wurde getestet, ob Cysteinvarianten des CPC-Segments in Mia40 von Erv1 reoxidiert werden können. Die Varianten Mia40C-C1,2S und Mia40C-C1S wurden vollständig reduziert, über Gelfiltration vom Reduktionsmittel gereinigt und jeweils mit Erv1 inkubiert. Sowohl Mia40C-C1,2S als auch

Mia40C-C1S wurden im Gegensatz zu Mia40C nicht durch Erv1 oxidiert, wie aus der Modifikation mit AMS hervorgeht (Abbildung 3.18A). Das bedeutet, dass die redoxsensitiven Cysteinreste C1 und C2 notwendig für die Übertragung der Disulfidbrücken von Erv1 auf Mia40C sind und somit für die Bildung der Disulfidbrücken in Mia40. Fehlen diese Cysteinreste ist Mia40 kein Substrat von Erv1, d. h. die Disulfidbrücken des CX<sub>9</sub>C-Motivs können nicht direkt durch Erv1 oxidiert werden. Voraussetzung für die Bildung dieser Disulfidbrücken scheint die Ausbildung der redoxsensitiven Disulfidbrücke zu sein: die Oxidation der Variante Mia40C-C1S mit einem verbliebenen Cysteinrest im CPC-Segment war nicht möglich (Abbildung 3.18B), obwohl sie mit Erv1 interagieren kann, wie später gezeigt wurde (siehe Abbildung 3.19B).



**Abbildung 3.18 Beide Cysteinreste des CPC-Segments in Mia40 sind für die Oxidation durch Erv1 erforderlich**

**A)** Mia40C-C1,2S wird nicht durch Erv1 oxidiert. Mia40C-C1,2S wurde durch Inkubation mit 5 mM DTT bei 95°C vollständig reduziert. Nach Entfernung des DTT mittels Gelfiltration wurden 10 µg des Proteins mit Erv1 (2,5 µg) bei 25°C inkubiert. Nach Inkubation mit 30 mM AMS wurden die Proben mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen und Färbung mit Coomassie Blue analysiert.

**B)** Mia40C-C1S wird nicht durch Erv1 oxidiert. Mia40C und Mia40C-C1S wurden wie in **A)** behandelt und analysiert. Die in **A)** und **B)** beschriebenen Reaktionen wurden unter mikroanaeroben Bedingungen in einer mit Stickstoff gefüllten „glove bag“ durchgeführt.



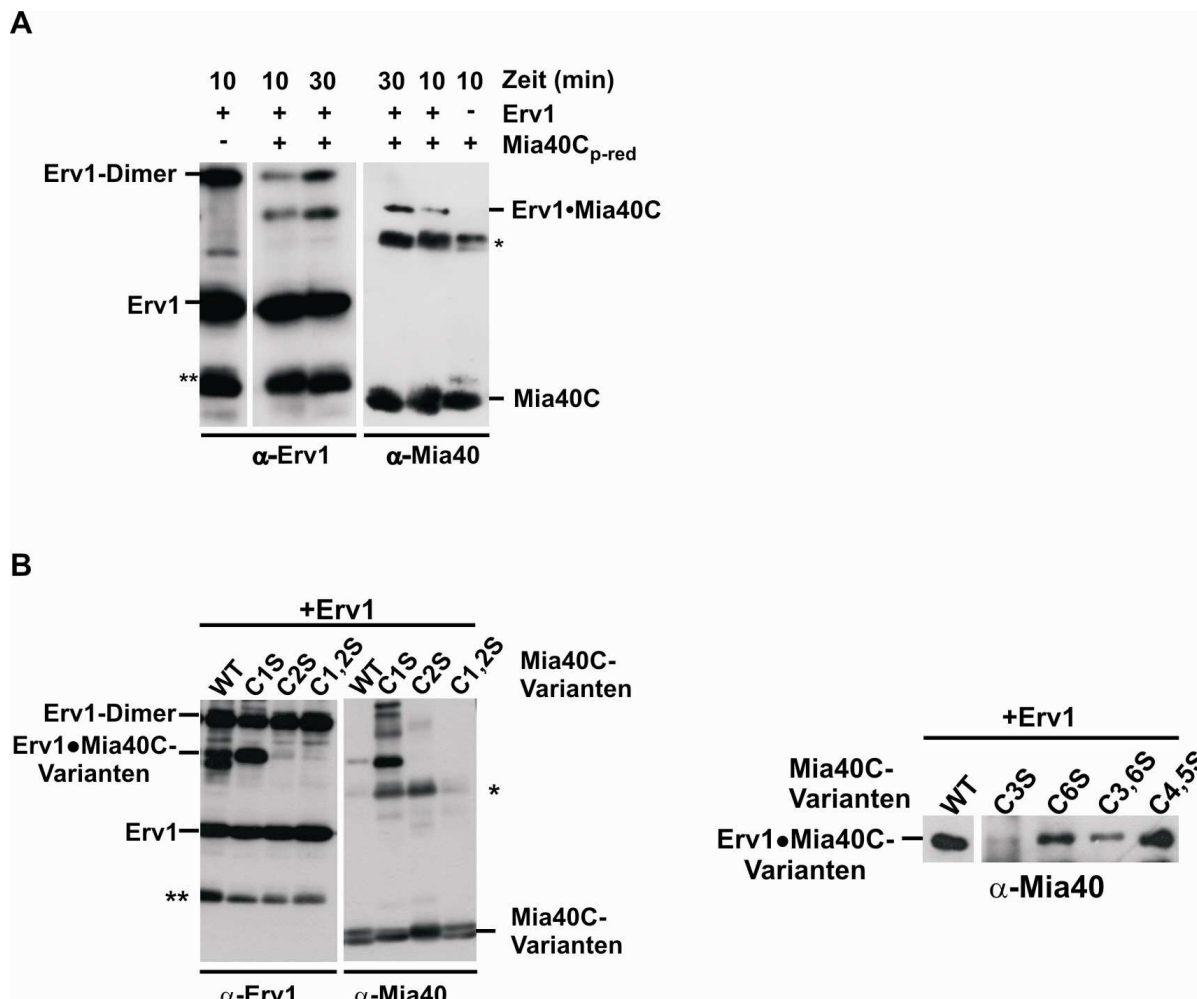
### 3.3.1.5 Mia40 interagiert über den zweiten Cysteinrest des CPC-Segments mit Erv1

Die Übertragung von Disulfidbrücken auf Mia40 erfordert die Bildung von Disulfidintermediaten zwischen Mia40 und Erv1. Um solche Intermediate zu detektieren, wurde partiell reduziertes Mia40C mit Erv1 und anschließend mit IAA inkubiert, das die Auflösung transienter Interaktionen blockiert. Mit Antikörpern sowohl gegen Erv1 als auch gegen Mia40 wurde eine Proteinspezies detektiert, die der Größe nach einem Komplex aus Mia40C und Erv1 entsprach (Abbildung 3.19A). Dieser Komplex war in Gegenwart von DTT nicht stabil (Daten nicht gezeigt), was für eine Interaktion über Disulfidbrücken spricht.

Als nächstes wurde untersucht, welche der Cysteinreste in Mia40 an der Interaktion mit Erv1 beteiligt sind. Mögliche Interaktionspartner sind die Cysteinreste C1 und C2, die in partiell reduziertem Mia40 als freie Thiole vorliegen. Dafür spricht außerdem, dass keine Übertragung von Disulfidbrücken auf Mia40C stattfinden kann, wenn die ersten beiden Cysteinreste fehlen. Tatsächlich konnte keine Interaktion von Erv1 mit Mia40C-C1,2S beobachtet werden (Abbildung 3.19B). Um zu testen, ob Erv1 mit einem der beiden Cysteinreste des CPC-Segments spezifisch interagiert, wurden die Cysteinvarianten Mia40C-C1S und Mia40C-C2S mit Erv1 inkubiert und mittels Immundekoration analysiert. Mia40C-C1S interagierte trotz des fehlenden ersten Cysteinrestes mit Erv1, wohingegen der Austausch des zweiten Cysteinrestes in Mia40C-C2S die Interaktion mit Erv1 verhinderte. Beachtenswert ist, dass größere Mengen des Intermediates zwischen Erv1 und Mia40C-C1S gebildet wurden. Vermutlich konnte in diesem Fall die Interaktion nicht effizient durch Bildung der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C1 und C2 aufgelöst werden.

Für alle getesteten Cysteinvarianten des CX<sub>9</sub>C-Motivs von Mia40C konnte eine Interaktion mit Erv1 detektiert werden (Abbildung 3.19B, rechte Seite). Allerdings waren die Mengen des Mia40-Erv1-Disulfidintermediates für die Varianten Mia40C-C6S und Mia40C-C3,6S deutlich verringert und nur sehr geringe Mengen der Interaktion von Erv1 mit der Variante Mia40C-C3S konnten nachgewiesen werden. Mia40C-C4,5S zeigte dagegen keine Beeinträchtigung in der Interaktion mit Erv1.





**Abbildung 3.19 Der zweite Cysteinrest in Mia40C ist essentiell für die Interaktion mit Erv1**

**A)** Mia40C interagiert mit Erv1 über Disulfidbrücken. Mia40C wurde wie in 3.15A partiell reduziert und mit äquimolaren Mengen an Erv1 bei 25°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit 80 mM IAA für 30 min bei 25°C inkubiert. Unter nichtreduzierenden Bedingungen wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immundekoration mit spezifischen Antikörpern gegen Erv1 und Mia40 analysiert. \*, Mia40C-Dimer; \*\*, Abbauprodukt von Erv1.

**B)** Interaktion von Mia40C-Cysteinvarianten mit Erv1. Partiiell reduziertes Mia40C und die angegebenen Cysteinvarianten (jeweils 7 µg, 14 µg für Mia40C-C3S) wurden mit Erv1 (7 µg) inkubiert und dann mit IAA modifiziert. Die Analyse der Proben erfolgte wie in A). \*, Mia40C-Dimer; \*\*, Abbauprodukt von Erv1.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Erv1 mit reduziertem Mia40C Disulfidintermediate bildet, wobei Erv1 spezifisch mit dem zweiten Cysteinrest C2 in Mia40C interagiert. Für die nachfolgende Übertragung der Disulfidbrücken auf Mia40C ist allerdings die Anwesenheit beider Cysteinreste des CPC-Segments erforderlich. Die Cysteinreste C3 und C6 scheinen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung einer funktionellen Konformation von Mia40C zu spielen, welche eine effiziente Interaktion mit Erv1 begünstigt.

### 3.3.2 Oxidation von Substratproteinen durch das Mia40-Erv1-Disulfidtransfer-system

Mia40 dient während der Importreaktion als Rezeptor für cysteinreiche IMR-Proteine, indem es Disulfidintermediate mit diesen Proteinen ausbildet. Einige dieser Substrate enthalten in ihrer nativen Konformation intramolekulare Disulfidbrücken. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, bei dem Disulfidbrücken von Mia40 auf das interagierende IMR-Protein übertragen werden. Allerdings konnte bisher solch ein Disulfidtransfer nicht direkt gezeigt werden. Daher wurde *in vitro* getestet, ob Mia40 nicht nur als Rezeptor, sondern auch als Oxidase für Substratproteine fungiert.

#### 3.3.2.1 Mia40C-C1,2S wird von Mia40 oxidiert

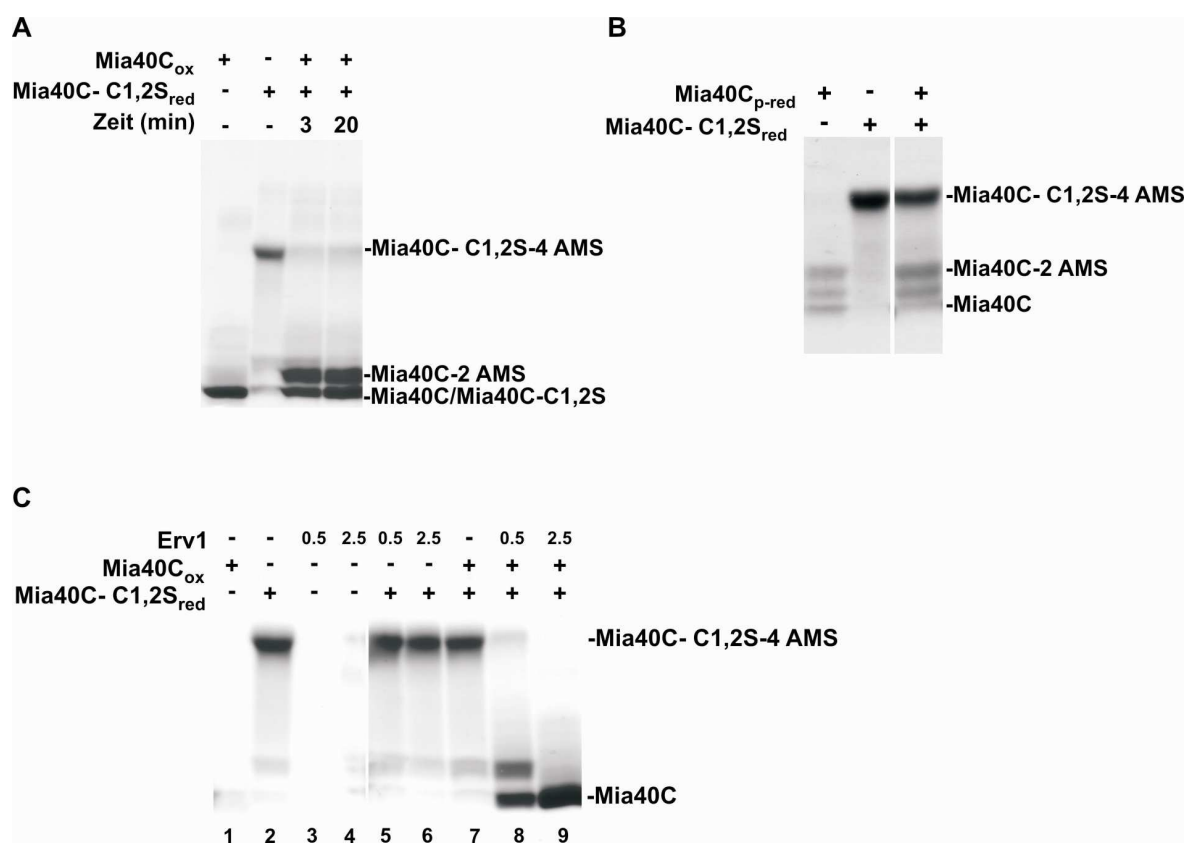
Wie bereits gezeigt, ist die Variante Mia40C-C1,2S kein Substrat der Sulphydryloxidase Erv1. Jedoch enthält Mia40C-C1,2S immer noch das *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv, welches charakteristisch für Substratproteine von Mia40 ist. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob Mia40C diese Variante oxidieren kann. Dazu wurden äquimolare Mengen der reduzierten Variante Mia40C-C1,2S und der oxidierten Form von Mia40C miteinander inkubiert. Der Redoxzustand der Proteine wurde durch AMS-Behandlung nachverfolgt. Die Inkubation mit Mia40C führte offensichtlich zur Oxidation der Variante, da die vollständig AMS-modifizierte Spezies von Mia40C-C1,2S nicht mehr detektiert werden konnte (Abbildung 3.20A). Durch die Übertragung von Disulfidbrücken auf Mia40C-C1,2S war Mia40C offenbar in die partiell reduzierte Form überführt worden, indiziert durch die Bildung einer Spezies, die mit zwei AMS-Molekülen modifiziert wurde.

Für die Übertragung oxidierender Äquivalente auf die Mia40C-Variante erschien die redox-sensitive Disulfidbrücke im CPC-Segment von Mia40C als Donor wahrscheinlich, da diese Disulfidbrücke von Erv1 regeneriert werden kann. Ist Mia40C in partiell reduzierter Form fähig

Mia40C-C1,2S zu reoxidieren? Nach Inkubation der beiden Proteine wurde die Cysteinvariante weiterhin mit AMS modifiziert, blieb also reduziert (Abbildung 3.20B). Die Cysteinreste des CPC-Segmentes in Mia40C müssen demnach in oxidierte Form vorliegen, um die Variante Mia40C-C1,2S oxidieren zu können. Eine Isomerisierungsreaktion zwischen den *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven zur Übertragung der Disulfidbrücken von Mia40C auf die Cysteinvariante ist daher unwahrscheinlich.

Für die bisherigen Experimente wurden äquimolare Mengen der beteiligten Komponenten eingesetzt. Da Mia40 enzymatisch aktiv sein könnte, wurde untersucht, ob katalytische Mengen der oxidierten Form von Mia40C die Oxidation der Cysteinreste des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs vermitteln können. Dies ist jedoch nicht der Fall, da ohne weitere Zugabe von Erv1 Mia40C-C1,2S reduziert blieb, angezeigt durch Modifikation mit AMS (Abbildung 3.20C, Spur 7). Wurde dem Reaktionsansatz hingegen zusätzlich Erv1 beigefügt, resultierte dies in effizienter Oxidation von Mia40C-C1,2S (Abbildung 3.20C, Spur 8 und 9). Diese Oxidationsreaktion wurde über die katalytischen Mengen an Mia40C vermittelt, da Erv1 nicht fähig war, Mia40C-C1,2S zu reoxidieren (Abbildung 3.20C, Spur 5 und 6). Erv1 hatte offensichtlich die oxidierte Form von Mia40C regeneriert, so dass weitere Oxidationszyklen von Mia40C-C1,2S möglich waren.

Daraus lässt sich schließen, dass Mia40 das Potential hat, Substratproteine mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven wie die Mia40C-C1,2S Variante zu oxidieren. Es wurde gezeigt, dass das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem in dem rekonstituierten System Disulfidbrücken auf Substratproteine mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven übertragen kann.



**Abbildung 3.20 Das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert Mia40C-C1,2S**

**A)** Mia40C oxidiert vollständig reduziertes Mia40C-C1,2S. Mia40C-C1,2S wurde wie in Abbildung 3.18A vollständig reduziert und mit äquimolaren Mengen an Mia40C bei 25°C inkubiert. Nach Inkubation mit 30 mM AMS für 1 h bei 25°C wurden die Proben mittels nichreduzierender SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Blue analysiert.

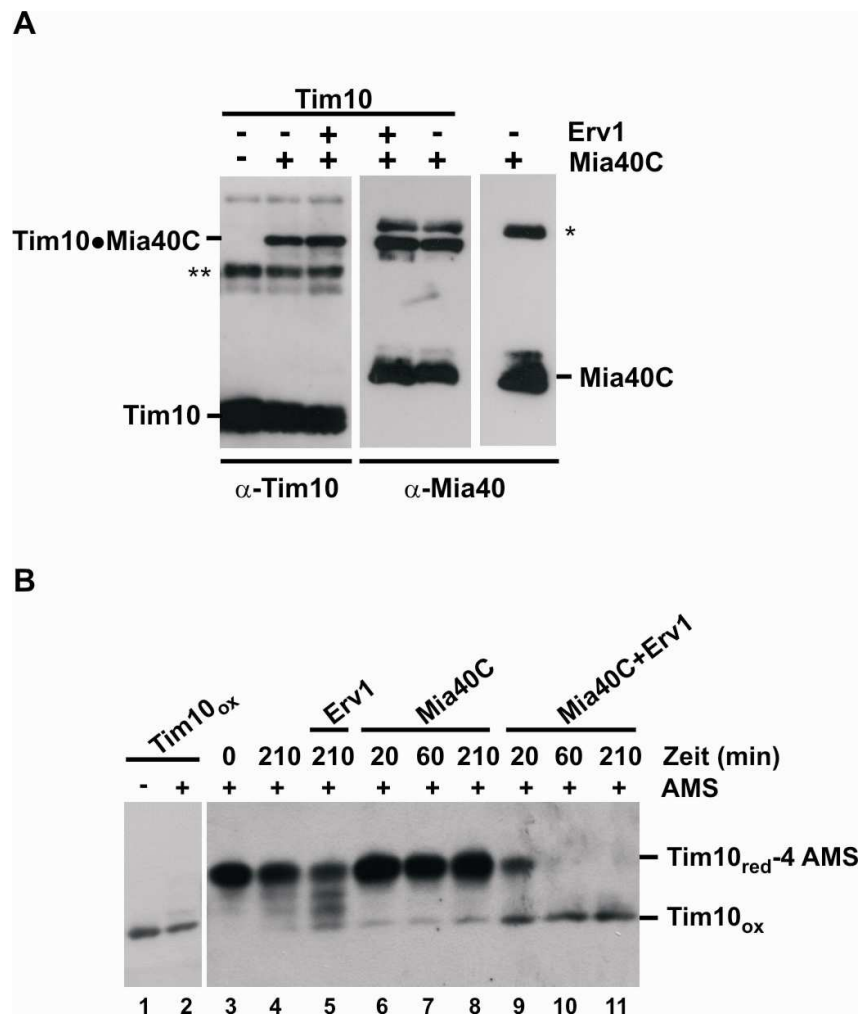
**B)** Mia40C-C1,2S wird nicht durch partiell reduziertes Mia40C oxidiert. Mia40C wurde wie in Abbildung 3.15A partiell reduziert und mit äquimolaren Mengen an vollständig reduziertem Mia40C-C1,2S für 20 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 30 mM AMS behandelt. Die Proben wurden über reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

**C)** Mia40C und Erv1 bilden ein Disulfidtransfersystem. Vollständig reduziertes Mia40C-C1,2S (7 µg) wurde mit 0,5 µg Mia40C und 0,5 oder 2,5 µg Erv1 für 20 min bei 25°C inkubiert (Spur 8 und 9). Als Kontrolle wurde vollständig reduziertes Mia40C-C1,2S entweder mit 0,5 µg Mia40C (Spur 7) oder mit 0,5 oder 2,5 µg Erv1 (Spur 5 und 6) inkubiert. Alle Proben wurden mit 15 mM AMS modifiziert und anschließend wie in A) analysiert. Die in A), B) und C) beschriebenen Reaktionen wurden unter mikroanaeroben Bedingungen in einer mit Stickstoff gefüllten „*glove bag*“ durchgeführt.

### 3.3.2.2 Das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert Tim10, ein Substrat mit *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiv

Die Übertragung von Disulfidbrücken erfordert die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen Mia40 und Substratproteinen. Solche DTT-sensitiven Disulfidintermediate konnten während des Importprozesses von Substratproteinen in Mitochondrien nachgewiesen werden (Mesecke et al., 2005; Terziyska et al., 2005). Um eine direkte Interaktion von Mia40 mit Substratprotein *in vitro* nachzuweisen, wurde das reduzierte Substratprotein Tim10 mit Mia40C inkubiert, mit IAA behandelt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim10 und Mia40 wurde eine Proteinspezies detektiert, die der Größe nach einem Intermediat aus Tim10 und Mia40C entsprach (Abbildung 3.21A). Dieses Intermediat war sensitiv gegenüber DTT (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass Mia40C Disulfidbrücken mit einem Substratprotein ausbildet. Als nächstes wurde getestet, ob Tim10, ein Substratprotein mit *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiv, ebenfalls durch das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert werden kann. Dazu wurde reduziertes Tim10 entweder mit katalytischen Mengen an Mia40C, Erv1 oder mit beiden Proteinen inkubiert. Der Redoxstatus von Tim10 wurde durch Modifikation der Proben mit AMS und nachfolgender Immundekoration der aufgetrennten Proteine mit Antikörpern gegen Tim10 bestimmt. Aus Abbildung 3.21B wird ersichtlich, dass katalytische Mengen an Mia40C (Spuren 6-8) oder Erv1 (Spur 5) nicht zu einer Oxidation von Tim10 führten. Die Zugabe beider Komponenten des Disulfidtransfersystems resultierte dagegen in der Reoxidation des Substratproteins Tim10 (Abbildung 3.21B, Spuren 9-11).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem die Fähigkeit besitzt, Disulfidbrücken auf typische Substratproteine mit *twin* CX<sub>3</sub>C- oder *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven zu transferieren und diese dadurch oxidiert.



**Abbildung 3.21 Tim10 wird durch das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem oxidiert**

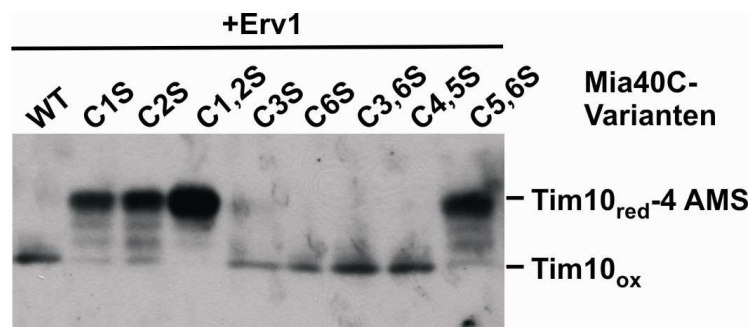
**A)** Mia40C interagiert mit Tim10 über Disulfidbrücken. Rekombinantes Tim10 wurde für 10 min bei 95°C mit 10 mM DTT reduziert und anschließend über Gelfiltration reisoliert. Reduziertes Tim10 wurde mit äquimolaren Mengen Mia40C oder Mia40C und Erv1 inkubiert. Die Proben wurden mit 80 mM IAA bei 25°C für 30 min inkubiert und über nichtreduzierende SDS-PAGE aufgetrennt. Proteine wurden durch Immundekoration mit spezifischen Antikörpern gegen Tim10 und Mia40 detektiert. \*, Mia40-Dimer; \*\*, Tim10-Dimer.

**B)** Mia40C und Erv1 werden für die Oxidation von Tim10 benötigt. Wie in **A)** reduziert Tim10 (10 mM) wurde bei 25°C ohne zusätzliche Proteine (Spur 4), mit Erv1 (0,6 mM, Spur 5), mit Mia40C (0,6 mM, Spuren 6-8), oder mit Mia40C (0,6 mM) und Erv1 (0,6 mM, Spuren 9-11) zusammen inkubiert. Der Redoxzustand von Tim10 wurde durch AMS-Modifikation, gefolgt von nichtreduzierender Tricin-SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim10 analysiert. Als Kontrolle für das Laufverhalten der Redoxformen von Tim10 wurde oxidiertes

und reduziertes Tim10 ebenfalls mit AMS modifiziert (Spur 2 und 3) und analysiert. Die oxidierte Form von Tim10 weist im Vergleich zur reduzierten Form eine weniger effiziente Bindung des Antikörpers auf (vergleiche Spuren 1 und 2 mit Spur 3). Die Reaktionen wurden unter mikroanaeroben Bedingungen in einer mit Stickstoff gefüllten „glove bag“ durchgeführt.

### 3.3.2.3 Die redoxsensitive Disulfidbrücke in Mia40 ist essentiell für die Oxidation von Tim10

Das etablierte rekonstituierte System wurde nun verwendet, um herauszufinden, welche Cysteinreste in Mia40 eine wichtige Rolle im Oxidationsprozess von Tim10 spielen. Dazu wurden verschiedene Cysteinvarianten des CPC-Segments und des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs in Mia40C zusammen mit Erv1 und reduziertem Tim10 inkubiert. Durch den Austausch des ersten oder zweiten Cysteinrestes oder beider Cysteinreste des CPC-Segments wurde die Bildung der oxidierten Form von Tim10 offensichtlich verhindert (Abbildung 3.22). Auch die Variante Mia40C-C5,6S, in der beide Disulfidbrücken des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs nicht gebildet werden können, führte nicht zur Oxidation von Tim10. Die Varianten Mia40C-C3S, Mia40C-C6S und Mia40C-C3,6 oxidierten Tim10, wenn auch mit reduzierter Effizienz, während der Verlust der Disulfidbrücke in Mia40C-C4,5S keinen Einfluß auf die Oxidation von Tim10 hatte.



**Abbildung 3.22 Die ersten beiden Cysteinreste in Mia40 sind notwendig für die Oxidation von Tim10**

Tim10 wurde wie in 3.21A reduziert und reisoliert. 10 mM reduziertes Tim10 wurde mit den angegebenen Cysteinvarianten von Mia40C (0,6 mM) zusammen mit Erv1 (0,6 mM) für 210 min bei 25°C inkubiert. Der Redoxzustand von Tim10 wurde durch AMS-Modifikation, gefolgt von nichtreduzierender Tricin-SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen Tim10 analysiert. Die Reaktionen wurden unter mikroanaeroben Bedingungen in einer mit Stickstoff gefüllten „glove bag“ durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die redoxensitive Disulfidbrücke essentiell für die katalytische Funktion von Mia40 im Transfer von Disulfidbrücken auf Substratproteine ist. Die Cysteinreste des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs spielen keine entscheidende Rolle für die katalytische Aktivität von Mia40. Der Verlust der Funktion von Mia40C-C5,6S ist vermutlich auf die Instabilität des Proteins zurückzuführen.



## 4 Diskussion

Alle Proteine des IMR werden im Zellkern kodiert und müssen in Mitochondrien importiert werden. Ein Großteil dieser Proteine enthält kein mitochondriales Sortierungssignal und wird unabhängig vom TIM23-Komplex importiert. Charakteristisch für diese Proteine sind konservierte Cysteinmotive. Für den Import dieser Proteine sind der redoxensitive Importrezeptor Mia40 und die Sulphydryloxidase Erv1 essentiell (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005; Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005). In dieser Arbeit wurden das Substratspektrum und der Mechanismus des Mia40/Erv1-Systems mit gereinigten Komponenten untersucht.

### 4.1 Erv1, ein untypisches Substrat des Mia40/Erv1-Systems

Es konnte gezeigt werden, dass Erv1 abhängig von dem Mia40/Erv1-System in Mitochondrien importiert wird. Für die Translokation in den IMR ist die Ausbildung eines Disulfidintermediats zwischen importiertem Erv1 und Mia40 notwendig. Dabei handelt es sich vermutlich um eine transiente Interaktion im Verlauf der Importreaktion, da die Menge des Intermediats mit der Zeit abnahm, wenn kein neues Erv1 importiert wurde. Mit einem Molekulargewicht von 22 kDa ist Erv1 das größte bislang identifizierte Substratprotein von Mia40. Die präsentierten Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass das Mia40/Erv1-System fähig ist, größere Proteine als bisher angenommen zu importieren.

Zu den am besten untersuchten Substratproteinen von Mia40 gehört die Gruppe der kleinen Tim-Proteine, die durch ein *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiv gekennzeichnet sind (Curran et al., 2002a; Paschen et al., 2000). Die zweite große Gruppe der bislang bekannten Mia40-Substrate beinhaltet Proteine mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiven. Dazu gehören das gut charakterisierte Kupferchaperon Cox17 und weitere Proteine wie Cox19, Cox23, Mdm35, Mic14 und Mic17 (Chacinska et al., 2004; Gabriel et al., 2007). Erv1 besitzt dagegen kein *twin* CX<sub>3</sub>C- oder *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv, wie es typisch für alle bekannten Substrate von Mia40 ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Cysteinreste in Erv1 erforderlich für seinen Import sind. Allerdings ist die Anordnung in zwei CX<sub>2</sub>C-Motiven dafür nicht notwendig. Austauschmutanten von Cysteinresten der beiden CX<sub>2</sub>C-Motive von Erv1 wurden ähnlich effizient importiert wie WT-Erv1. Damit übereinstimmend ist ein Hefestamm

überlebensfähig, der die Cysteinvariante Erv1-C30S des ersten CX<sub>2</sub>C-Motivs exprimiert. Diese Cysteinvariante des Erv1-Proteins ist im IMR der Mitochondrien lokalisiert (Hofhaus et al., 2003). Somit besitzt das Mia40/Erv1-System bezüglich der Anordnung der Cysteinreste ein größeres Substratspektrum als bisher bekannt war. Kürzlich wurde gezeigt, dass Substratproteine mit *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiven von Mia40 spezifisch am ersten N-terminalen Cysteinrest erkannt werden. Fehlt dieser Cysteinrest ist der Import drastisch reduziert, da keine Interaktion mit Mia40 stattfinden kann (Milenkovic et al., 2007; Sideris und Tokatlidis, 2007). Werden andere Substrattypen über den gleichen Mechanismus erkannt? Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass zumindest für Erv1 der erste N-terminale Cysteinrest für die Interaktion mit Mia40 nicht erforderlich ist. In diesem Fall können offenbar andere Cysteinreste die Funktion übernehmen. Der Importprozess von Erv1 könnte sich daher mechanistisch von dem der Substratproteine mit *twin* CX<sub>3</sub>C- und CX<sub>9</sub>C-Motiven unterscheiden.

Dafür sprechen weitere Vergleiche des Aufbaus der Substratproteine und der Funktion der Cysteinreste. Typische Substratproteine von Mia40 bestehen aus einer Domäne mit einfacher Faltung. Es wurde vorgeschlagen, dass die oxidative Faltung der Proteine im IMR die Triebkraft für ihren Nettoimport darstellt (Lu et al., 2004a; Mesecke et al., 2005). Zwei antiparallele Helices werden durch zwei interhelikale Disulfidbrücken zwischen den proximalen und distalen Cysteinresten der *twin* CX<sub>3</sub>C- oder *twin* CX<sub>9</sub>C-Motive stabilisiert (Allen et al., 2003; Arnesano et al., 2005; Webb et al., 2006). Erv1 dagegen besteht aus zwei strukturellen Segmenten: einem flexiblen N-terminalen Abschnitt und der katalytischen FAD-Bindedomäne mit komplexer Faltung. Das erste CX<sub>2</sub>C-Motiv befindet sich in der flexiblen Region, während das zweite katalytische CX<sub>2</sub>C-Motiv in räumlicher Nähe zum Isoalloxazinring des FAD angeordnet ist. Beide CX<sub>2</sub>C-Motive sind am Elektronentransport beteiligt und vermutlich nicht an der Stabilisierung von Erv1 (Coppock und Thorpe, 2006). Diese Aspekte unterscheiden Erv1 erheblich von den bisher bekannten Substraten und lassen auf Unterschiede im Importmechanismus schließen. Zu klären bleibt unter anderem wie Erv1 im IMR zurückgehalten wird. Spielt dabei auch die oxidative Faltung des Proteins eine Rolle? Erv1 enthält neben den beiden CX<sub>2</sub>C-Motiven eine Disulfidbrücke, die wahrscheinlich der Stabilisierung der FAD-Bindedomäne dient (Hofhaus et al., 2003). Zusätzlich trägt vermutlich auch der Einbau des FAD-Kofaktors zur Faltung von Erv1 bei.

Es gibt weitere Proteine im IMR von Mitochondrien, von denen bekannt ist, dass ihre Cysteinreste in gefaltetem Zustand Disulfidbrücken ausbilden. Cox12, eine Untereinheit der

Cytochrom *c* Oxidase, enthält ein CX<sub>9</sub>C-CX<sub>10</sub>C-Motiv, welches funktionell einem *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv gleichen könnte. Dagegen bilden die Cysteinreste in einigen anderen Proteinen keine spezifischen Motive, wie z. B. in Qcr 6, einer Untereinheit des Cytochrom *bc1* Komplexes oder in Sco1, einem Assemblierungsfaktor der Cytochrom *c* Oxidase. Es bleibt zu klären, ob sie ebenfalls Mia40-abhängig importiert und oxidiert werden und wenn ja, ob es übereinstimmende Merkmale des Importmechanismus der unterschiedlichen Substrattypen gibt. Für das Kupferchaperon Ccs1, welches neben einem CX<sub>2</sub>C-Motiv fünf weitere Cysteinreste enthält, konnte kürzlich eine Abhängigkeit des Imports von Mia40 nachgewiesen werden (Reddehase et al., 2009). Dies bestätigt ein Substratspektrum von Mia40, welches nicht nur auf Proteine mit *twin* CX<sub>3</sub>C- oder *twin* CX<sub>9</sub>C-Motive beschränkt ist. Allerdings ist auch für dieses Mia40-Substratprotein der genaue Importmechanismus nicht näher charakterisiert.

Erv1 wird nicht nur mittels des Mia40/Erv1-Systems in den IMR importiert, sondern ist auch eine essentielle Komponente dieses Systems. Die weiteren, bisher bekannten Komponenten, Mia40 und Cytochrom *c*, werden in Hefe nicht über das Mia40/Erv1-System in Mitochondrien transportiert. Cytochrom *c* wird über Interaktion mit der Cytochrom *c* Hämlyase in den IMR importiert (Dumont et al., 1991; Dumont et al., 1988; Nargang et al., 1988), während Mia40 über den TIM23-Komplex lateral in die Innenmembran inseriert wird (Chacinska et al., 2004; Naoe et al., 2004). In höheren Eukaryoten wird vermutlich auch Mia40 selbst über das Mia40/Erv1-System in den IMR importiert (siehe 4.4).

## 4.2 Redoxzustände von Mia40

In isolierten Mitochondrien aus Hefezellen wurden bisher eine oxidierte und eine reduzierte Form von Mia40 beschrieben, wobei Mia40 vor allem in der oxidierten Form vorliegt (Mesecke et al., 2005). Ähnliches wurde auch für humanes Mia40 beobachtet (Hofmann et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Redoxzustände von Mia40 anhand der gereinigten C-terminalen Domäne von Mia40 auf molekularer Ebene charakterisiert.

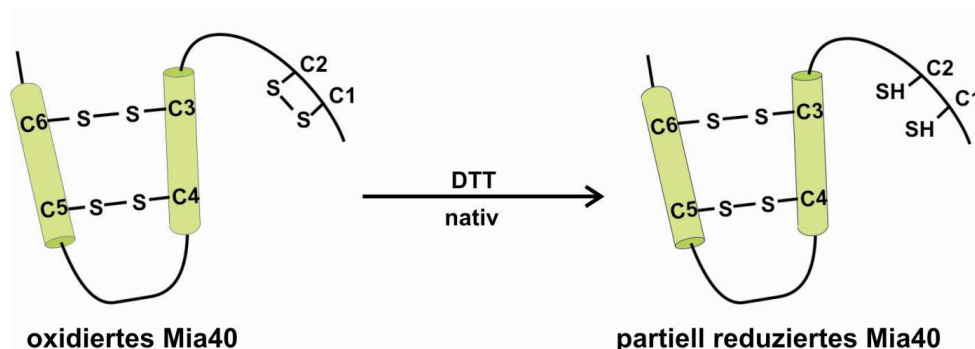
Diese Domäne ist hochkonserviert und enthält sechs invariante Cysteinreste, angeordnet in einem CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C-Muster. Eine hohe Sequenzübereinstimmung zwischen Mia40 Homologen in diesem Bereich deutete bereits auf eine wichtige Funktion dieses Proteinsegments hin. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die in den IMR sortierte C-terminale Domäne notwendig

und ausreichend ist, um Vollängen-Mia40 in Hefezellen funktionell zu ersetzen (Terziyska et al., 2009).

#### 4.2.1 Mia40 enthält eine katalytische redoxensitive Disulfidbrücke

Anhand von AMS-Modifikations-Experimenten und massenspektrometrischer Analysen des gereinigten monomeren Proteins konnten der oxidierten Form von Mia40 drei Disulfidbrücken zugeordnet werden. Das bedeutet, alle sechs Cysteinreste liegen oxidiert in intramolekularen Disulfidbrücken vor. Die ersten beiden Cysteinreste des CPC-Segments bilden eine Disulfidbrücke, die unter nativen Bedingungen leicht zugänglich und redoxsensitiv ist. Sie ist essentiell für katalytische Redoxreaktionen sowohl mit Substratproteinen als auch mit Erv1. Eine strukturelle Funktion ist unwahrscheinlich, da die Reduktion dieser Disulfidbrücke keinen Einfluß auf die Stabilität von Mia40 hatte. *In vivo* Beobachtungen an endogenem Mia40 und Cysteinvarianten von Mia40 stimmen sehr gut mit diesen Ergebnissen überein (Terziyska et al., 2009).

Durch die Reduktion der Disulfidbrücke zwischen den ersten beiden Cysteinresten entsteht eine partiell reduzierte Form von Mia40, die zwei Disulfidbrücken enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese der *in vivo* beobachteten reduzierten Form von Mia40 entspricht. Die reduzierte Form von Mia40 entsteht vermehrt durch den Import chemischer Mengen an Substratproteinen wie Tim13 und Cox17 in isolierte Mitochondrien (Mesecke et al., 2008; Terziyska et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass Mia40 in einer Reaktion mit dem Substratprotein von der oxidierten in die partiell reduzierte Form überführt wird. Die nahe Anordnung der beiden Cysteinreste in einem CXC-Motiv ist vermutlich der Grund für die Ausbildung einer relativ instabilen Disulfidbrücke (Zhang und Snyder, 1989). Die Instabilität dieser Disulfidbrücke könnte vorteilhaft für die effiziente Übertragung von oxidativen Äquivalenten auf Substratproteine sein. Eine ähnliche Anordnung in einem CGC-Motiv findet sich in Erv2 wieder, welches Disulfidbrücken auf Substratproteine wie PDI im Endoplasmatischen Retikulum überträgt (Vala et al., 2005).



**Abbildung 4.1** Schematische Darstellung der oxidierten und partiell reduzierten Form von Mia40

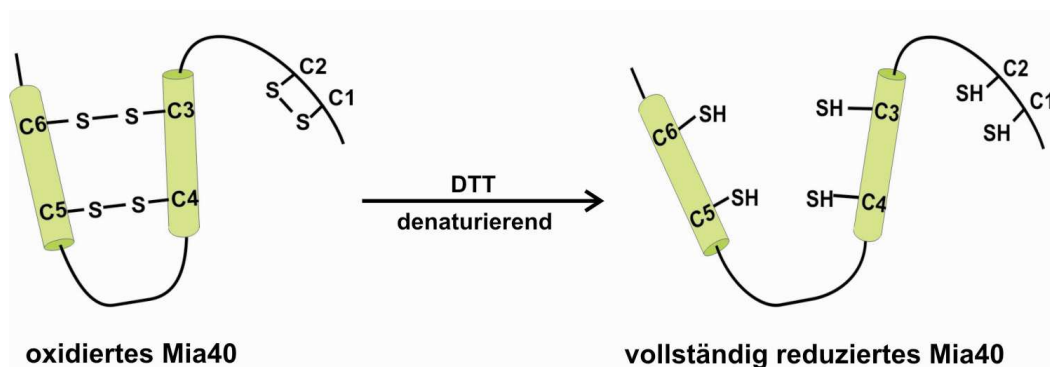
Oxidiertes Mia40 enthält drei intramolekulare Disulfidbrücken. Eine redoxsensitive Disulfidbrücke wird zwischen den ersten beiden Cysteinresten C1 und C2 gebildet. Sie wird unter nativen Bedingungen durch DTT reduziert, wodurch Mia40 in eine partiell reduzierte Form überführt wird.

#### 4.2.2 Mia40 wird durch Disulfidbrücken des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs stabilisiert

Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass die CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs über zwei Disulfidbrücken zwischen den proximalen (C3 und C6) und distalen (C4 und C5) Cysteinresten verbunden sind. Diese Disulfidbrücken konnten nur unter denaturierenden Bedingungen reduziert werden und scheinen auch *in vivo* nicht geöffnet zu werden (Terziyska et al., 2009). Sie sind wichtig für eine stabile Faltung der konservierten Domäne von Mia40. Fehlt eine dieser redoxstabilen Disulfidbrücken, wird das Protein nicht mehr zu einem proteaseresistenten Fragment abgebaut, sondern vollständig durch Trypsin degradiert. Dabei scheint die äußere Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C3 und C6 wichtiger für die Stabilisierung einer funktionellen Konformation von Mia40 zu sein, als die innere Disulfidbrücke. Wird einer der Cysteinreste C3 oder C6 ausgetauscht, ist die Interaktion mit Erv1 und Substratproteinen stark beeinträchtigt (Terziyska et al., 2009). Das Fehlen der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C4 und C5 hat dagegen weniger starke Auswirkungen, da vermutlich die beiden Helices des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs immer noch ausreichend durch die äußere Disulfidbrücke verknüpft werden und eine zumindest teilweise Faltung möglich ist.

Die Cysteinreste des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs in Mia40 befinden sich in einer vorhergesagten CHCH (*coiled-coil-helix-coiled-coil*)-Domäne, die sich auch in einer Vielzahl von Mia40

Substratproteinen, wie Cox17, Cox19, Mic14, Mic17 und Mdm35 findet (Beers et al., 1997; Gabriel et al., 2007; Nobrega et al., 2002). Die NMR-Struktur von Cox17 zeigt, übereinstimmend mit den hier präsentierten Ergebnissen, zwei interhelikale Disulfidbrücken zwischen den beiden Helices des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs (Arnesano et al., 2005; Voronova et al., 2007). Diese Disulfidbrücken stabilisieren die Helices in einer antiparallelen Haarnadelstruktur. Ähnlich wie die Disulfidbrücken in Mia40, werden sie unter milden reduzierenden Bedingungen nicht geöffnet. Somit könnte die Stabilisierung durch Disulfidbrücken ein generelles Charakteristikum für Proteine mit einem *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motiv in einer CHCH-Domäne sein. Mia40 und seine Substratproteine könnten sich daher aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt haben.



**Abbildung 4.2** Schematische Darstellung der oxidierten und vollständig reduzierten Form von Mia40

Neben einer redoxsensitiven Disulfidbrücke enthält oxidiertes Mia40 zwei stabilisierende Disulfidbrücken, die die CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs verbinden. Die äußere Disulfidbrücke wird zwischen den Cysteinresten C3 und C6 gebildet, die innere zwischen den Cysteinresten C4 und C5. Beide Disulfidbrücken werden nur unter denaturierenden Bedingungen durch DTT reduziert, so dass Mia40 unter diesen Bedingungen vollständig reduziert vorliegt.

Die Zuordnung der Disulfidbrücken und ihre unterschiedliche Redoxsensitivität wurden durch Beobachtungen an der vor kurzem gelösten Struktur des humanen Mia40 bestätigt. NMR-Analysen zeigten, dass das humane Protein aus einer Kerndomäne (*core*) und einem Deckelsegment (*lid*) zusammengesetzt ist (Banci et al., 2009). Wie in Mia40 aus Hefe besteht der Kern aus zwei Helices, die durch zwei Disulfidbrücken zwischen den CX<sub>9</sub>C-Segmenten in einer antiparallelen Konformation stabilisiert werden. Das Deckelsegment enthält das redoxensitive CPC-Motiv, welches unter nativen Bedingungen leicht zugänglich ist.

### 4.3 Rekonstitution des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Oxidation von Substratproteinen mit *twin* CX<sub>9</sub>C- und *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiven durch Mia40 und Erv1 rekonstituiert. Beide Proteine, die *in vivo* essentiell sind und Effekte auf die oxidative Faltung zeigen, waren für die Reaktion erforderlich und ausreichend. Katalytische Mengen an Mia40 alleine führten nicht zur Oxidation der Substratproteine, was gegen eine enzymatische Funktion von Mia40 spricht. Stattdessen erforderte der Ablauf weiterer Reaktionszyklen die Regeneration der aktiven Form von Mia40 durch Oxidation mit Erv1. Da Erv1 Substratproteine nicht direkt oxidierte, konnte gefolgert werden, dass die Oxidation der Substratproteine über die katalytischen Mengen an Mia40 vermittelt wird. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen somit für einen linearen Transfer der Disulfidbrücken, welcher sich in zwei Reaktionen unterteilt: zum einen der Oxidation der Substratproteine durch Mia40, zum anderen der Reoxidation von Mia40 durch Erv1.

#### 4.3.1 Mia40 ist ein Substrat von Erv1

Kürzlich wurde Mia40 als erstes physiologisches Substrat der Sulphydryloxidase Erv1 vorgeschlagen, da Disulfidintermediate zwischen Mia40 und Erv1 in Mitochondrien detektiert wurden (Mesecke et al., 2005; Rissler et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der direkte Transfer von Disulfidbrücken von Erv1 auf Mia40 im rekonstituierten System demonstriert und somit gezeigt, dass Mia40 ein Substrat von Erv1 ist. Funktionelles Erv1 benötigte *in vitro* keine weiteren Faktoren, um Disulfidbrücken auf Mia40 zu übertragen.

Für die Interaktion mit Erv1 ist der zweite Cysteinrest des CPC-Segments in Mia40 essentiell. Es konnte kein Disulfidintermediat zwischen der Cysteinvarianten Mia40C-C2S und Erv1 detektiert werden, während Mia40C-C1S, sowie Cysteinvarianten des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs weiterhin mit Erv1 interagierten. Bei Verlust der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C3 und C6 war die Bildung des Disulfidintermediats allerdings beeinträchtigt, was auf die Notwendigkeit einer stabilen Konformation von Mia40 schließen lässt, um mit Erv1 optimal interagieren zu können. Beobachtungen aus Mutationsanalysen von Mia40 *in vivo* bestätigen diese Ergebnisse (Terziyska et al., 2009) und zeigen, dass die *in vitro* Bedingungen gut für die Beschreibung der Zustände *in vivo* geeignet sind.



Erv1 vermag Mia40 nur zu oxidieren, wenn die ersten beiden Cysteinreste des CPC-Segments in Mia40 vorhanden sind. Da es keine Hinweise darauf gibt, dass Mia40 unter physiologischen Bedingungen vollständig reduziert vorkommt, läßt sich folgern, dass Erv1 die katalytische Disulfidbrücke zwischen dem ersten und zweiten Cysteinrest regeneriert. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Beobachtung, dass Mia40 in Erv1-depletierten Mitochondrien in der partiell reduzierten Form akkumuliert (Mesecke et al., 2005).

Es bleibt zu klären, ob Mia40 das einzige Substratprotein von Erv1 im IMR von Mitochondrien ist. Neben Proteinen mit *twin* CX<sub>n</sub>C-Motiven gibt es weitere Proteine mit Disulfidbrücken im IMR wie z. B. das Rieskeprotein der Atmungskette, die durch Erv1 oxidiert werden könnten. Außerdem wird Erv1 für die Reifung zytosolischer Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern benötigt (Lange et al., 2001). Daher könnten mögliche Substratproteine von Erv1 am Export von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol beteiligt sein.

### 4.3.2 Mia40 oxidiert Substratproteine mit *twin* CX<sub>9</sub>C- und CX<sub>3</sub>C-Motiven

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal der Disulfidbrückentransfer von Mia40 auf ein Substratprotein *in vitro* demonstriert werden. Eine Cysteinvariante von Mia40, die nur das *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv enthält und somit typischen Substratproteinen wie Cox17 ähnelt, wurde vollständig durch Mia40 oxidiert, wobei Mia40 offenbar in die partiell reduzierte Form überführt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die redoxsensitive Disulfidbrücke für die Oxidation von Substratproteinen eine wichtige Rolle spielt. Tatsächlich konnte Mia40C-C1,2S nicht oxidiert werden, wenn die ersten beiden Cysteinreste in Mia40 reduziert waren. Außerdem waren Cysteinmutanten von Mia40, in denen die redoxsensitive Disulfidbrücke nicht gebildet werden konnte, nicht fähig, Tim10 zu oxidieren.

Diese Ergebnisse lassen auf die Übertragung der redoxsensitiven Disulfidbrücke von Mia40 auf Substratproteine schließen. Sie stimmen gut mit der früher gemachten Beobachtung überein, dass die Modifikation der partiell reduzierten Form von Mia40 mit NEM, den Import von Substratproteinen in den IMR von Mitochondrien inhibiert (Mesecke et al., 2005). Durch die Alkylierung der Thiolgruppen mit NEM wurde verhindert, dass Erv1 die redoxsensitive Disulfidbrücke regeneriert. Zudem wird Mia40 durch den Import chemischer Mengen an Substratproteinen vermehrt in die partiell reduzierte Form überführt (Mesecke et al., 2008; Terziyska et al., 2009). In einer neuen Studie konnte Cox17 durch humanes Mia40 *in vitro*



oxidiert werden, wobei anhand von NMR-Spektren ebenfalls die Bildung von partiell reduziertem Mia40 nachgewiesen wurde (Banci et al., 2009).

Die Ergebnisse unterstützen die Präsenz eines Mechanismus durch den die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Mia40 und Substratprotein so aufgelöst wird, dass oxidiertes Substrat freigesetzt wird, während Mia40 in partiell reduzierter Form zurückbleibt. In Übereinstimmung mit der Oxidation von Mia40C-C1,2S und Tim10 durch Mia40 *in vitro*, konnte kürzlich in Mitochondrien gezeigt werden, dass Substratproteine als oxidierte Monomere von Mia40 freigesetzt werden, bevor sie in hexamere Komplexe assemblieren (Muller et al., 2008).

Da Mia40 offensichtlich nur eine redox-sensitive und katalytisch wirksame Disulfidbrücke enthält, könnte die Bildung zweier Disulfidbrücken in den Substratproteinen mit *twin CX<sub>3</sub>C*- oder *twin CX<sub>9</sub>C*-Motiven durch zwei Moleküle Mia40 erfolgen. Da unter den Reaktionsbedingungen noch Sauerstoff vorhanden ist, besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass Mia40 eine Disulfidbrücke einführt und die zweite Disulfidbrücke durch die Übertragung der Elektronen vom Substrat auf molekularen Sauerstoff entsteht. Dies wurde auch von Banci und Kollegen vorgeschlagen, die zeigen konnten, dass äquimolare Mengen an Mia40 ausreichend waren, um zwei Disulfidbrücken in Cox17 einzuführen. Dabei scheint die Bildung der Mia40-abhängigen Disulfidbrücke Voraussetzung für die Oxidation der zweiten Disulfidbrücke zu sein, da die Substratproteine in Abwesenheit von Mia40 in der gleichen Zeit nicht oxidiert wurden. Vermutlich werden durch die Bildung der ersten Disulfidbrücke die verbleibenden Cysteinreste so positioniert, dass sie nun effizient durch Sauerstoff oxidiert werden können. Bei dieser Reaktion müsste Wasserstoffperoxid entstehen, welches Banci und Kollegen während der Oxidation von Cox17 tatsächlich nachweisen konnten.

Mia40 war *in vitro* als Monomer aktiv. NMR-Analysen ergaben, dass humanes Mia40 *in vitro* ebenfalls in monomerer Form präsent ist (Banci et al., 2009). *In vivo* ist jedoch nicht ausreichend geklärt, ob Mia40 als Monomer vorliegt. Nach dem Verhalten in Gelfiltrations- und Dichtegradientenzentrifugations-Experimenten zu urteilen, könnte natives Mia40 auch in einem oligomeren Komplex vorkommen (Hofmann et al., 2005; Naoe et al., 2004). Allerdings ändert sich das Laufverhalten von Mia40 aus Hefe in nativer Gelelektrophorese in Gegenwart von Reduktionsmitteln oder stark denaturierenden Bedingungen nicht, was eher für eine monomere Form spricht (Chacinska et al., 2004).

#### 4.4 Biogenese von Mia40

Die Oxidation von Mia40C-C1,2S durch Mia40 läßt die Annahme zu, dass die Biogenese von Mia40 selbst abhängig vom Mia40/Erv1-System im IMR ist. Wie bereits erwähnt, ist in Hefe der Import von Mia40 in Mitochondrien nicht abhängig von diesem System, da Mia40 ein N-terminales Sortierungssignal enthält und über den TIM23-Komplex in der Innenmembran verankert wird. Die Faltung und Oxidation der konservierten C-terminalen Domäne findet im IMR statt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Mia40 die Disulfidbrücken des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs in neu importiertem Mia40 einbaut, wodurch die Faltung des Proteins im IMR ermöglicht wird.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass Cysteinvarianten des *twin* CX<sub>9</sub>C-Motivs von humanem Mia40 deutlich schlechter in Hefemitochondrien importiert wurden (Hofmann et al., 2005). Mia40 Homologe in höheren Eukaryoten sind mit Substratproteinen des Mia40/Erv1-Systems vergleichbar: sie enthalten kein N-terminales Sortierungssignal und besitzen ein *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv. Vermutlich werden sie über das Mia40/Erv1-System importiert, so dass in diesem Fall der Einbau der Disulfidbrücken in Mia40 an dessen Import gekoppelt ist. Die oxidative Faltung führt zur Stabilisierung des Proteins im IMR, wodurch der Nettoimport in den IMR ermöglicht wird. In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass ein verkürztes Konstrukt von Mia40 aus Hefe ohne N-terminales Sortierungssignal und Transmembransegment abhängig von Mia40 in den IMR transportiert wird (Chacinska et al., 2008). Somit erfolgt auch die Faltung dieses Konstrukts durch Mia40. Dies unterstützt die Hypothese, dass in Vollängen-Mia40 die Disulfidbrücken ebenfalls von Mia40 eingebaut werden.

Der Import der löslichen kurzen Mia40-Proteine erfordert präexistierendes Mia40. Da bislang keine prokaryotischen Homologe von Mia40 gefunden wurden, ist anzunehmen, dass nach der Endosymbiose kein Mia40 im Mitochondrienvorläufer vorhanden war. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Formen von Mia40 mit N-terminalem Sortierungssignal schon früh in der Evolution etabliert wurden, um den Import von Mia40 über den existierenden TIM23-Komplex zu ermöglichen. Nach der Etablierung des Mia40/Erv1-Systems konnte Mia40 dann über diesen Weg importiert werden, so dass die Notwendigkeit des N-terminalen Sortierungssignals nicht mehr gegeben war.

#### 4.5 Einfluss von Metallionen auf das Mia40/Erv1-System

Bei Vergleich des Substratproteins Cox17 mit Mia40 fällt neben den beiden stabilisierenden Disulfidbrücken im *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv eine weitere Gemeinsamkeit auf. Cox17 enthält zwei weitere Cysteinreste in einem KXCC-Motiv, die unter oxidierenden Bedingungen eine ebenfalls instabile Disulfidbrücke ausbilden können (Arnesano et al., 2005; Voronova et al., 2007). Allerdings ist im Gegensatz zu Mia40 nicht geklärt, ob diese Konformation von Cox17 eine physiologische Funktion besitzt. Die partiell reduzierte Form von Cox17 kann nach einer intramolekularen Isomerisierungsreaktion ein Kupfer (I)-Ion über die reduzierten Cysteinreste im KXCC-Motiv komplexieren (Arnesano et al., 2005). Wurde rekombinantes Mia40 in Gegenwart von Kupfer- und Zinkionen unter reduzierenden Bedingungen gereinigt, konnte ebenso eine Bindung von Metallionen nachgewiesen werden (Terziyska et al., 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Reoxidation der partiell reduzierten Form von Mia40 durch Erv1 fast vollständig inhibiert wurde, wenn Mia40 vorher mit Zinkacetat inkubiert worden war. Die Bindung von Metallionen durch die Thiolgruppen der ersten beiden Cysteinreste könnte die partiell reduzierte Form von Mia40 stabilisieren, ähnlich wie es für die reduzierte Form der kleinen Tim-Proteine beobachtet wurde (Lu et al., 2004b; Lutz et al., 2003; Sirrenberg et al., 1998).

Welche Rolle könnte die Bindung von Metallionen durch Mia40 im Importprozess von Mia40-Substratproteinen spielen? Die Relevanz von Metallionen in der Biogenese einiger Substratproteine, vor allem die der kleinen Tim-Proteine, wird bis heute diskutiert. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass kleine Tim-Proteine in ihren Komplexen Disulfidbrücken enthalten und die Oxidation der Monomere Voraussetzung für die Assemblierung der Komplexe ist (Curran et al., 2002a; Lu et al., 2004a; Muller et al., 2008; Webb et al., 2006). Auf der anderen Seite werden die kleinen Tim-Proteine nur in reduzierter Form importiert (Lu und Woodburn, 2005; Lutz et al., 2003). Auch wenn die postulierte Faltung durch Zinkionen die Nettotranslokation in den IMR nicht zu treiben scheint, könnten Zinkionen eine Rolle für den Import spielen. Es wurde gezeigt, dass neusynthetisierte Tim-Proteine Zinkionen binden können (Lu und Woodburn, 2005; Morgan et al., 2009). Da kleine Tim-Proteine ein negatives Redoxpotential als GSH besitzen, oxidieren sie möglicherweise in der reduzierenden Umgebung des Zytosols. Es wurde vorgeschlagen, dass durch Zinkbindung im Zytosol eine reduzierte importkompetente Konformation der Tim-Proteine stabilisiert wird (Morgan et al., 2009). Der Porendurchmesser von Tom40 würde den Import von zinkgebundenen Tim-Proteinen erlauben.

Für Cox17 konnte gezeigt werden, dass der Import durch die Gegenwart von Zinkionen stimuliert wird (Mesecke et al., 2008). Möglicherweise gelangen Proteine mit konservierten Cysteinresten in Assoziation mit Metallionen in den IMR, wo sie mit Mia40 interagieren. Dort könnten die Metallionen auf Mia40 übertragen werden, wodurch die Oxidation der importierten Proteine möglich wäre. Was passiert allerdings mit den auf Mia40 übertragenen Metallionen? Um eine effiziente Regeneration der aktiven oxidierten Form von Mia40 zu ermöglichen, müssten sie entfernt werden.

#### 4.6 Hot13 erleichtert die Reoxidation von Mia40

Einen möglichen Kandidaten für die Übernahme der Zinkionen von Mia40 stellte das IMR-Protein Hot13 dar. Hot 13 enthält eine konservierte cysteinreiche CHY-Zinkfingerdomäne und tatsächlich konnte für gereinigtes Hot13 eine Bindung von Zinkionen nachgewiesen werden (Mesecke et al., 2008). Weiterhin wurde beobachtet, dass in Abwesenheit von Hot13 Mia40 schon bei geringen Konzentrationen von GSH vollständig in die reduzierte Form überführt wird. Ein ähnlicher Phänotyp, wenn auch deutlich stärker ausgeprägt, tritt in Erv1-depletierten Mitochondrien auf (Mesecke et al., 2005). Daher lag die Vermutung nahe, dass Hot13 den Redoxzustand von Mia40 beeinflusst, möglicherweise indem es auf die Zinkbindung von Mia40 wirkt.

In dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Reoxidation von zinkgebundenem Mia40 durch Erv1 in Gegenwart von Hot13 erleichtert wurde. Sowohl *in vitro* als auch in Mitochondrien konnte Hot13 funktionell durch zinkbindende Chelatoren, wie EDTA ersetzt werden. Da der Reaktionsansatz keine weiteren Komponenten enthielt, ist anzunehmen, dass Hot13 direkt mit Mia40 interagiert und es in eine zinkfreie Form konvertiert, die durch Erv1 oxidiert werden kann. Gegen eine Oxidaseaktivität von Hot13 spricht, dass Mia40 *in vitro* nicht direkt von Hot13 oxidiert werden konnte. Außerdem wurde kein vermindertes Wachstum von Hefezellen in Abwesenheit von Hot13 nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT beobachtet (Mesecke et al., 2008).

Den Ergebnissen zufolge kann folgende Rolle von Hot13 im Mia40-abhängigen Importprozess postuliert werden. Nach dem Import von zinkionenbeladenen Proteinen in den IMR, werden diese durch Interaktion mit Mia40 im IMR festgehalten. Dabei werden die Zinkionen auf Mia40 übertragen, so dass die nun freien Thiolgruppen im Substratprotein oxidiert werden können. Die

Zinkionen werden dann weiter auf Hot13 transferiert, um so eine effiziente Reoxidation von Mia40 zu ermöglichen. Demnach würde Hot13 als Metallchaperon fungieren, welches Zinkionen von Mia40 auf einen bisher unbekanntem Akzeptor überträgt. Es bleibt zu klären, ob diese Funktion auf Mia40 als Substrat beschränkt ist, da Homologe von Hot13 auch in Bakterien vorkommen, die keine Mia40-ähnlichen Proteine enthalten. Dies spricht für eine wichtige Rolle von Hot13 auch in Mia40-unabhängigen Prozessen.

#### 4.7 Modell des Mia40/Erv1-Systems

Aus den in dieser Arbeit präsentierten und vorherigen Daten kann folgendes Modell des Mia40/Erv1-Systems aufgestellt werden. Mia40 und Erv1 bilden ein Disulfidtransfersystem, das die vektorielle Translokation von kleinen cysteinreichen Proteinen in den IMR vermittelt, indem es Disulfidbrücken auf diese Proteine überträgt (Abbildung 4.3). Neusynthetisierte Proteine überqueren die äußere Membran durch den TOM-Komplex in reduzierter und ungefalteter Konformation. Diese importkompetente Konformation wird bei einigen der Substratproteine vermutlich durch Zinkbindung stabilisiert. Im IMR interagieren sie mit aktivem Mia40 über transiente Disulfidbrücken. Die aktive Form von Mia40 ist vollständig oxidiert und enthält somit drei Disulfidbrücken. Die redoxensitive Disulfidbrücke im CPC-Segment ist essentiell für die Ausbildung der Disulfidintermediate mit Substratproteinen. Durch Isomerisierung der intermolekularen Disulfidbrücke werden Disulfidbrücken auf Substratproteine übertragen. Anschließend werden Substratproteine in oxidiertem und somit gefalteter Form freigesetzt, während die katalytische Disulfidbrücke in Mia40 reduziert wird. Die gefalteten Substratproteine können nicht mehr durch den TOM-Komplex zurück ins Zytosol diffundieren und werden dadurch im IMR zurückgehalten.

Von Substratproteinen gebundene Zinkionen werden über Mia40 an Hot13 weitergegeben. Die aktive Form von Mia40 kann nun durch Erv1 regeneriert werden. Erv1 formt spezifisch mit dem zweiten reduzierten Cysteinrest in Mia40 eine Disulfidbrücke, die durch Isomerisierung auf Mia40 übertragen wird, um die katalytische Disulfidbrücke zu bilden. Weitere Importzyklen können nun stattfinden. Die Reoxidation von Erv1 erfolgt durch Übertragung der Elektronen auf Cytochrom *c*, welches diese über die Cytochrom *c* Oxidase in die Atmungskette einschleust. Alternativ können Elektronen auch direkt auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht, das durch die Cytochrom *c* Peroxidase zu Wasser reduziert werden

kann (Dabir et al., 2007). Hefe ist auch unter anaeroben Bedingungen bzw. in Abwesenheit einer funktionellen Atmungskette überlebensfähig, was auf einen weiteren bislang unbekanntem finalen Elektronenakzeptor schließen lässt.

Obwohl in der vergangenen Zeit und im Rahmen dieser Arbeit entscheidende Fortschritte in der Erforschung des Mia40/Erv1-Systems erzielt wurden, bleiben verschiedene Fragen zum molekularen Mechanismus des Systems zu klären.

Wie werden Substratproteine oxidiert? Überträgt Mia40 beide oder nur eine der Disulfidbrücken auf Substratproteine? Wirken dabei weitere Faktoren mit Mia40 zusammen? In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Mia40 *in vitro* Substratproteine vollständig oxidieren kann. Es kann für die *in vitro* Ergebnisse allerdings bisher nicht ausgeschlossen werden, dass Sauerstoff bei der Oxidation eine Rolle spielt. Dies zeigen auch die Experimente von Banci und Kollegen, in denen äquimolare Mengen an Mia40 Cox17 vollständig oxidieren können, obwohl nur eine Disulfidbrücke in Mia40 reduziert wird (Banci et al., 2009). Ob *in vivo* Sauerstoff an der Bildung der zweiten Disulfidbrücke beteiligt ist, bleibt zu überprüfen. Alternativ können möglicherweise zwei Moleküle Mia40 die Cysteinreste der Substratproteine oxidieren. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass nur der erste Cysteinrest im Substratprotein essentiell für die Bildung des Disulfidintermediats mit Mia40 ist. Dies lässt vermuten, dass spezifisch eine Disulfidbrücke zwischen dem ersten Cysteinrest und Mia40 gebildet wird, welche dann auf das Substratprotein transferiert wird. Andererseits könnte es zu einer Isomerisierung der ersten Disulfidbrücke im Substrat kommen, so dass ein zweites Molekül Mia40 wiederum mit dem ersten Cysteinrest interagieren kann.

Wurden in den Experimenten katalytische Mengen an Mia40 eingesetzt, war die Anwesenheit von Erv1 erforderlich, um Substratproteine zu oxidieren. Erv1 könnte *in vivo* nicht nur Mia40 regenerieren, sondern auch zusammen mit Mia40 an der Oxidation der Substratproteine beteiligt sein. Es wurde gezeigt, dass in Mitochondrien einer temperatursensitiven Erv1-Mutante die Bindung der Substratproteine an Mia40 nicht beeinträchtigt war, wohingegen die nachfolgende Freisetzung und Bildung oxidierten Monomere stark inhibiert wurde (Muller et al., 2008).

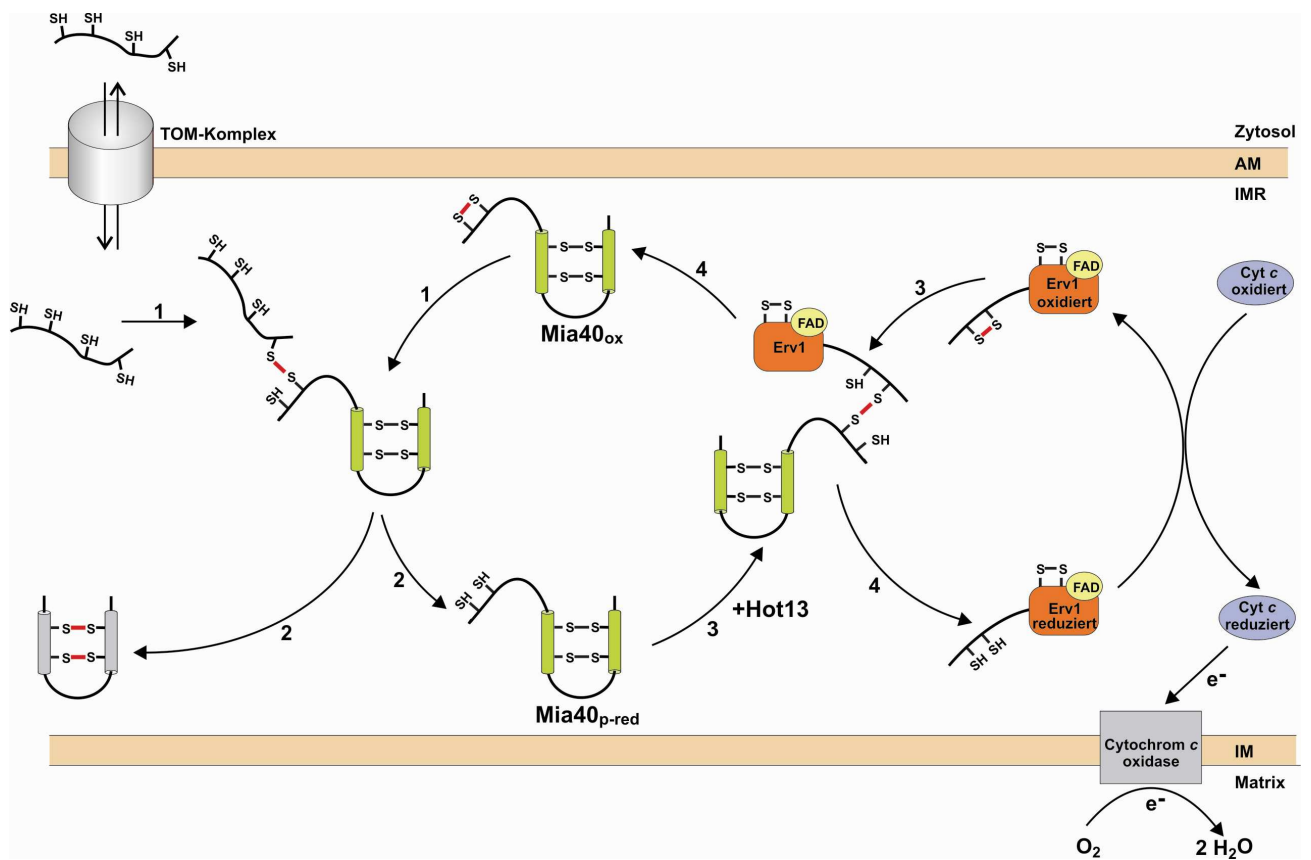
Stojanovski und Kollegen konnten zudem kürzlich in Mitoplasten einen DTT-sensitiven Komplex detektieren, der Mia40, Substratprotein und Erv1 enthält. Die Autoren schlagen vor, dass Erv1 in diesem Komplex Disulfidbrücken über Mia40 auf das Mia40-gebundene Substratprotein überträgt, was die Voraussetzung für die Freisetzung des oxidierten

Substratproteins ist. Inwieweit der Komplex tatsächlich eine physiologische Funktion hat, bleibt zu klären. Für die Freisetzung des Substratproteins scheint auch der C-terminale Cysteinrest im Substrat eine wichtige Rolle zu spielen (Sideris und Tokatlidis, 2007). Fehlte dieser Cysteinrest in importiertem Tim10 wurden erhöhte Mengen an Disulfidintermediat mit Mia40 detektiert, während die Bildung des Monomers fast vollständig inhibiert war. Vermutlich ist die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen dem ersten und vierten Cysteinrest im *twi*n CX<sub>3</sub>C-Motiv für die Freisetzung des Substratproteins in oxidiert Form notwendig.

Eine weitere Frage betrifft die Spezifität von Mia40. Bindet Mia40 zufällig jede freie Thiolgruppe der importierten Substratproteine? Wie bereits erwähnt, ist der erste N-terminale Cysteinrest in Tim9 und Tim10 essentiell für die Interaktion mit Mia40, was auf eine spezifische Erkennung der kleinen Tim-Proteine durch Mia40 schließen lässt (Milenkovic et al., 2007; Sideris und Tokatlidis, 2007). Allerdings scheint dieses Prinzip nicht auf alle Substratproteine übertragbar zu sein, wie am Beispiel von Erv1 ersichtlich wird. Bislang wurde kein spezielles Sequenz- oder Strukturmotiv als Erkennungssignal für Mia40 identifiziert. Es muss jedoch weitere Signale im Kontext der Cysteinreste geben, die Mia40-Substratproteine von anderen IMR-Proteinen unterscheiden, da es Proteine im IMR wie CCHL gibt, die Cysteinreste enthalten und keine Substrate von Mia40 sind.

Nicht geklärt ist ebenso die Frage, wie die unterschiedliche Anzahl an Elektronen im Disulfidtransfersystem auf den finalen Elektronenakzeptor transferiert wird. Nach dem Modell werden vier Elektronen von Substratproteinen mit *twi*n CX<sub>3</sub>C- oder *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motiven auf Mia40 übertragen, welches zwei Elektronen an Erv1 weitergibt. Zwei Elektronen müssen von Erv1 über den Flavin-Kofaktor auf Cytochrom *c* transferiert werden, welches aber nur ein Elektron aufnehmen kann. Für ALR wurde vorgeschlagen, dass die Elektronen in zwei Schritten unter Bildung eines Flavin-Semiquinons auf Cytochrom *c* übertragen werden (Farrell und Thorpe, 2005). In Erv1 wurde jedoch bislang keine Bildung eines Flavin-Semiquinons beobachtet (Dabir et al., 2007).





**Abbildung 4.3 Modell des Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystems**

Ungefaltete, reduzierte Substratproteine gelangen über den TOM-Komplex in den Intermembranraum (IMR). In diesem Zustand können sie jedoch zurück ins Zytosol diffundieren. Im IMR interagieren die Substratproteine mit einem Cysteinrest der redoxsensitiven Disulfidbrücke im CPC-Segment von Mia40 (Mia40<sub>ox</sub>; Schritt 1). Durch Übertragung dieser Disulfidbrücke auf die Substratproteine werden sie in einen gefalteten Zustand überführt, in dem sie den TOM-Komplex nicht mehr passieren können (Schritt 2). Die redoxsensitiven Disulfidbrücke wird in dieser Reaktion reduziert und Mia40 dadurch in die partiell reduzierte, inaktive Form überführt (Mia40<sub>p-red</sub>). Möglicherweise bindet diese Form Metallionen der Substratproteine, die anschließend von Hot13 übernommen werden. Erv1 interagiert mit dem zweiten Cysteinrest in Mia40 (Schritt 3) und überträgt eine Disulfidbrücke, wodurch die oxidierte, aktive Form von Mia40 regeneriert wird (Schritt 4). Der oxidierte Zustand von Erv1 wird durch Übertragung der Elektronen auf Cytochrom *c* (Cyt *c*) wieder hergestellt. Die übertragene Disulfidbrücke ist rot markiert. AM, Außenmembran; IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum



## 4.8 Vergleich zu anderen Systemen der oxidativen Proteinfaltung

Das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem im IMR von Mitochondrien ähnelt in seiner Funktionsweise den Systemen zur Proteinoxidation im ER eukaryotischer Zellen und im Periplasma von Bakterien, weist aber auch Unterschiede auf (Kadokura et al., 2003; Sevier und Kaiser, 2006a). Das Grundprinzip einer Kaskade von Oxidoreduktasen zur Übertragung von Disulfidbrücken ist in jedem dieser Systeme wiederzufinden. Der erste Schritt umfasst die Übertragung von Disulfidbrücken auf reduzierte Substratproteine durch PDI im ER, DsbA im Periplasma oder Mia40 im IMR. Dadurch wird die oxidative Faltung der Substratproteine ermöglicht. Im Anschluss werden Elektronen über Flavoproteine oder Quinone auf Nicht-Thiol-Verbindungen weitergeleitet. Im ER werden Elektronen von Ero1 oder Erv2 aufgenommen und auf Sauerstoff übertragen. Im Periplasma reduziert DsbA das Membranprotein DsbB, welches Elektronen über Quinone an die Atmungskette weitergibt. Im IMR werden Elektronen durch Erv1 über Cytochrom *c* ebenfalls auf die Atmungskette übertragen.

Mitochondriales Erv1 ist homolog zu Erv2 im ER und funktionell mit Ero1 und DsbB vergleichbar, auch wenn diese Proteine nicht zur Familie der Erv/ALR-Sulphydryloxidasen gehören. Allen gemeinsam ist die Sekundärstruktur der katalytischen Domäne, welche ein Bündel aus vier Helices bildet. Die Funktion von Mia40 entspricht der von PDI und DsbA, obwohl Mia40 keine offensichtliche Homologie zu diesen Proteinen aufweist. Im Gegensatz zu vielen Oxidoreduktasen enthält Mia40 keine Thioredoxindomäne und die Struktur des humanen Mia40 zeigt keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Oxidoreduktasen (Banci et al., 2009). Auch die zusätzliche Funktion als Rezeptor im Importprozess von Proteinen aus dem Zytosol in den IMR von Mitochondrien unterscheidet Mia40 von PDI und DsbA.

Sowohl im ER als auch im Periplasma können falsche Disulfidbrücken in Proteine eingebaut werden, was die Funktion von Disulfidisomerasen wie PDI oder DsbC erforderlich macht. Im IMR gibt es dagegen bisher keine Beweise für eine solche Disulfidisomeraseaktivität. Da Mia40 im Gegensatz zu PDI und DsbA sehr viel spezifischer mit Substratproteinen interagiert und Disulfidbrücken einbaut, ist möglicherweise eine Korrektur falscher Disulfidbrücken in diesem System nicht nötig. Denkbar ist auch, dass durch die reduzierenden Bedingungen des IMR der Einbau falscher, weniger stabiler Disulfidbrücken verhindert wird.

## 5 Zusammenfassung

Alle Proteine des Intermembranraums (IMR) werden im Zytosol synthetisiert und müssen in Mitochondrien importiert werden. Einige lösliche IMR-Proteine enthalten kein N-terminales Sortierungssignal und zeichnen sich durch die Präsenz konservierter Cysteinreste aus. Vor einigen Jahren wurde Mia40 identifiziert, das zusammen mit der Sulphydryloxidase Erv1 essentiell für den Import dieser IMR-Proteine ist.

Zu Beginn der Arbeit bekannte Substratproteine dieses Importweges waren gekennzeichnet durch die Anordnung der Cysteinreste in *twi*n CX<sub>3</sub>C- oder *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motiven. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Mia40/Erv1-System nicht auf diese Substrattypen beschränkt ist. Erv1 ist nicht nur eine Komponente dieses Importweges, sondern wird auch abhängig von Mia40 in den IMR von Mitochondrien importiert. Erv1 unterscheidet sich in Größe, Struktur und Anordnung der Cysteinreste erheblich von bisher identifizierten Substratproteinen und repräsentiert somit einen neuen Substrattyp des Mia40/Erv1-Systems.

Mia40 enthält sechs in einem CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C-Motiv angeordnete Cysteinreste, die wichtig für die Funktion von Mia40 sind. In Mitochondrien liegt Mia40 zum größten Teil in einer oxidierten Form vor, welche durch den Import von Substratproteinen in eine reduzierte Form überführt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der gereinigten C-terminalen Domäne das Redoxverhalten von Mia40 und die Funktion einzelner Disulfidbrücken auf molekularer Ebene charakterisiert. In der oxidierten Form von Mia40 liegen die sechs Cysteinreste in drei intramolekularen Disulfidbrücken vor. Die ersten beiden Cysteinreste im CPC-Segment bilden eine redoxensitive Disulfidbrücke. Die Reduktion dieser Disulfidbrücke unter nativen Bedingungen führt zu partiell reduziertem Mia40, welches der reduzierten Form in Mitochondrien entspricht. Die beiden anderen Disulfidbrücken verbinden die CX<sub>9</sub>C-Segmente des *twi*n CX<sub>9</sub>C-Motivs. Diese Disulfidbrücken werden nur unter denaturierenden Bedingungen reduziert und dienen der strukturellen Integrität des Proteins.

Die redoxensitive Disulfidbrücke kann *in vitro* von Erv1 reoxidiert werden, so dass die aktive oxidierte Form von Mia40 regeneriert wird. Dabei bildet Erv1 eine intermolekulare Disulfidbrücke mit dem zweiten Cysteinrest in Mia40 aus, die dann durch eine Isomerisierungsreaktion auf Mia40 übertragen wird. Hatte Mia40 Zinkionen gebunden, war die

Oxidation inhibiert und erforderte die Anwesenheit von Hot13 für eine effiziente Regeneration von Mia40 durch Erv1.

Mit der oxidierten Form von Mia40 war es möglich die reduzierte Cysteinvariante Mia40C-C1,2S zu reoxidieren. Somit konnte zum erstmal die direkte Übertragung von Disulfidbrücken von Mia40 auf ein Substratprotein mit *twin* CX<sub>9</sub>C-Motiv demonstriert werden. Auch Tim10, ein Substratprotein mit *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiv, wurde durch katalytische Mengen an Mia40 und Erv1 oxidiert. Für die Übertragung von Disulfidbrücken auf Substratproteine ist die redoxsensitive Disulfidbrücke in oxidierten Form erforderlich, was für die katalytische Funktion dieser Disulfidbrücke spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit erstmals das Mia40-Erv1-Disulfidtransfersystem des IMR von Mitochondrien rekonstituiert werden. Es war möglich den Transfer von Disulfidbrücken von Erv1 über Mia40 auf Substratproteine mit *twin* CX<sub>9</sub>C- und *twin* CX<sub>3</sub>C-Motiven zu demonstrieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allen, S., V. Balabanidou, D.P. Sideris, T. Lisowsky, and K. Tokatlidis. 2005. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome *c*. *J Mol Biol.* 353:937-44.
- Allen, S., H. Lu, D. Thornton, and K. Tokatlidis. 2003. Juxtaposition of the two distal CX<sub>3</sub>C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem.* 278:38505-13.
- Arnesano, F., E. Balatri, L. Banci, I. Bertini, and D.R. Winge. 2005. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure.* 13:713-22.
- Bader, M., W. Muse, D.P. Ballou, C. Gassner, and J.C. Bardwell. 1999. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell.* 98:217-27.
- Bader, M.W., A. Hiniker, J. Regeimbal, D. Goldstone, P.W. Haebel, J. Riemer, P. Metcalf, and J.C. Bardwell. 2001. Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *EMBO J.* 20:1555-62.
- Banci, L., I. Bertini, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, M. Martinelli, D.P. Sideris, N. Ktrakili, and K. Tokatlidis. 2009. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol.* 16:198-206.
- Bardwell, J.C., K. McGovern, and J. Beckwith. 1991. Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell.* 67:581-9.
- Becher, D., J. Kricke, G. Stein, and T. Lisowsky. 1999. A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast.* 15:1171-81.
- Beers, J., D.M. Glerum, and A. Tzagoloff. 1997. Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem.* 272:33191-6.
- Berkmen, M., D. Boyd, and J. Beckwith. 2005. The nonconsecutive disulfide bond of Escherichia coli phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *J Biol Chem.* 280:11387-94.
- Bertoli, G., T. Simmen, T. Anelli, S.N. Molteni, R. Fesce, and R. Sitia. 2004. Two conserved cysteine triads in human Ero1alpha cooperate for efficient disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 279:30047-52.
- Bihlmaier, K., N. Mesecke, N. Terziyska, M. Bien, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2007. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol.* 179:389-95.
- Borst, P., and L.A. Grivell. 1978. The mitochondrial genome of yeast. *Cell.* 15:705-23.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brix, J., K. Dietmeier, and N. Pfanner. 1997. Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem.* 272:20730-5.
- Burri, L., Y. Strahm, C.J. Hawkins, I.E. Gentle, M.A. Puryer, A. Verhagen, B. Callus, D. Vaux, and T. Lithgow. 2005. Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell.* 16:2926-33.
- Chacinska, A., B. Guiard, J.M. Muller, A. Schulze-Specking, K. Gabriel, S. Kutik, and N. Pfanner. 2008. Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem.* 283:29723-9.
- Chacinska, A., S. Pfanschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L.K. Sanjuan Szklarz, A. Schulze-Specking, K.N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23: 3735-3746
- Collet, J.F., J. Riemer, M.W. Bader, and J.C. Bardwell. 2002. Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J Biol Chem.* 277:26886-92.
- Coppock, D.L., and C. Thorpe. 2006. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 8:300-11.
- Cuozzo, J.W., and C.A. Kaiser. 1999. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol.* 1:130-5.
- Curran, S.P., D. Leuenberger, E.P. Leverich, D.K. Hwang, K.N. Beverly, and C.M. Koehler. 2004. The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J Biol Chem.* 279:43744-51.
- Curran, S.P., D. Leuenberger, W. Oppliger, and C.M. Koehler. 2002a. The Tim9p--Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* 21:942-953.
- Curran, S.P., D. Leuenberger, E. Schmidt, and C.M. Koehler. 2002b. The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol.* 158:1017-27.
- Dabir, D.V., E.P. Leverich, S.K. Kim, F.D. Tsai, M. Hirasawa, D.B. Knaff, and C.M. Koehler. 2007. A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J.* 26:4801-11.
- Diekert, K., G. Kispal, B. Guiard, and R. Lill. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11752-7.

- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.
- Dumont, M.E., T.S. Cardillo, M.K. Hayes, and F. Sherman. 1991. Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 11:5487-96.
- Dumont, M.E., J.F. Ernst, and F. Sherman. 1988. Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 263:15928-15937.
- Esaki, M., T. Kanamori, S. Nishikawa, and T. Endo. 1999. Two distinct mechanisms drive protein translocation across the mitochondrial outer membrane in the late step of the cytochrome b(2) import pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11770-5.
- Farrell, S.R., and C. Thorpe. 2005. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry*. 44:1532-41.
- Fass, D. 2008. The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta*. 1783:557-66.
- Frand, A.R., and C.A. Kaiser. 1998. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*. 1:161-70.
- Frand, A.R., and C.A. Kaiser. 2000. Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 11:2833-43.
- Gabriel, K., D. Milenkovic, A. Chacinska, J. Muller, B. Guiard, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2007. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol*. 365:612-20.
- Gakh, O., P. Cavadini, and G. Isaya. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*. 1592:63-77.
- Geissler, A., A. Chacinska, K.N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner, and P. Rehling. 2002. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*. 111:507-18.
- Gerber, J., U. Muhlenhoff, G. Hofhaus, R. Lill, and T. Lisowsky. 2001. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem*. 276:23486-91.
- Glick, B.S., E.M. Beasley, and G. Schatz. 1992a. Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 17:453-9.
- Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R.L. Hallberg, and G. Schatz. 1992b. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*. 69:809-22.

- Goldberger, R.F., C.J. Epstein, and C.B. Anfinsen. 1963. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem.* 238:628-35.
- Gross, E., D.B. Kastner, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2004. Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell.* 117:601-10.
- Gross, E., C.S. Sevier, N. Heldman, E. Vitu, M. Bentzur, C.A. Kaiser, C. Thorpe, and D. Fass. 2006. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:299-304.
- Gross, E., C.S. Sevier, A. Vala, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2002. A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Ero1p. *Nat Struct Biol.* 9:61-7.
- Grumbt, B., V. Stroobant, N. Terziyska, L. Israel, and K. Hell. 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., A. Francavilla, L. Polimeno, I. Ihara, H. Sakai, T. Seki, M. Shimonishi, K.A. Porter, and T.E. Starzl. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8142-6.
- Hartl, F.U., J. Ostermann, B. Guiard, and W. Neupert. 1987. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell.* 51:1027-37.
- Hell, K., J. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, and R.A. Stuart. 1997. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* 418:367-70.
- Hell, K., W. Neupert, and R.A. Stuart. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20:1281-8.
- Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol.* 165:167-73.
- Herrmann, J.M., and K. Hell. 2005. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 30:205-11.
- Herrmann, J.M., W. Neupert, and R.A. Stuart. 1997. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* 16:2217-26.
- Hill, K., K. Model, M.T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, and N. Pfanner. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature.* 395:516-21.



- Hiniker, A., and J.C. Bardwell. 2004. In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem.* 279:12967-73.
- Hofhaus, G., J.E. Lee, I. Tews, B. Rosenberg, and T. Lisowsky. 2003. The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur J Biochem.* 270:1528-35.
- Hofhaus, G., G. Stein, L. Polimeno, A. Francavilla, and T. Lisowsky. 1999. Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. *Eur J Cell Biol.* 78:349-56.
- Hofmann, S., U. Rothbauer, N. Muhlenbein, K. Baiker, K. Hell, and M.F. Bauer. 2005. Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol.* 353:517-28.
- Hofmann, S., U. Rothbauer, N. Muhlenbein, W. Neupert, K.D. Gerbitz, M. Brunner, and M.F. Bauer. 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.* 277:23287-93.
- Hogg, P.J. 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci.* 28:210-4.
- Hoppins, S.C., and F.E. Nargang. 2004. The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* 279:12396-405.
- Hornig, Y.C., P.A. Cobine, A.B. Maxfield, H.S. Carr, and D.R. Winge. 2004. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem.* 279:35334-40.
- Horwich, A.L., F. Kalousek, I. Mellmann, and L.E. Rosenberg. 1985. A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J.* 4:1129-1135.
- Hu, J., L. Dong, and C.E. Outten. 2008. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem.* 283:29126-34.
- Hunte, C., J. Koepke, C. Lange, T. Rossmannith, and H. Michel. 2000. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure.* 8:669-84.
- Hurt, E.C., B. Pesold-Hurt, and G. Schatz. 1984. The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* 178:306-10.
- Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 257:1496-502.



- Inaba, K., S. Murakami, M. Suzuki, A. Nakagawa, E. Yamashita, K. Okada, and K. Ito. 2006. Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*. 127:789-801.
- Ishikawa, D., H. Yamamoto, Y. Tamura, K. Moritoh, and T. Endo. 2004. Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly. *J Cell Biol*. 166:621-7.
- Iwata, S., J.W. Lee, K. Okada, J.K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T.A. Link, S. Ramaswamy, and B.K. Jap. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science*. 281:64-71.
- Iwata, S., M. Saynovits, T.A. Link, and H. Michel. 1996. Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*. 4:567-79.
- Jia, L., M. Dienhart, M. Schrapf, M. McCauley, K. Hell, and R.A. Stuart. 2003. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J*. 22:6438-6447.
- Kadokura, H., F. Katzen, and J. Beckwith. 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*. 72:111-35.
- Katzen, F., and J. Beckwith. 2000. Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*. 103:769-79.
- Khyse-Anderson, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10:203-207.
- Kobayashi, T., and K. Ito. 1999. Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the Escherichia coli disulfide bond formation pathway. *EMBO J*. 18:1192-8.
- Koehler, C.M. 2004. The small Tim proteins and the twin Cx(3)C motif. *Trends Biochem Sci*. 29:1-4.
- Komiya, T., S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz, and K. Mihara. 1998. Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J*. 17:3886-98.
- Krayl, M., J.H. Lim, F. Martin, B. Guiard, and W. Voos. 2007. A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol Cell Biol*. 27:411-25.
- Krimmer, T., D. Rapaport, M.T. Ryan, C. Meisinger, C.K. Kassenbrock, E. Blachly-Dyson, M. Forte, M.G. Douglas, W. Neupert, F.E. Nargang, and N. Pfanner. 2001. Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol*. 152:289-300.

- Kunkele, K.P., S. Heins, M. Dembowski, F.E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger, and W. Neupert. 1998. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*. 93:1009-19.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lange, H., T. Lisowsky, J. Gerber, U. Muhlenhoff, G. Kispal, and R. Lill. 2001. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*. 2:715-20.
- Lee, J., G. Hofhaus, and T. Lisowsky. 2000. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett*. 477:62-6.
- Lisowsky, T. 1994. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 26:15-20.
- Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86:147-57.
- Lu, H., S. Allen, L. Wardleworth, P. Savory, and K. Tokatlidis. 2004a. Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem*. 279:18952-8.
- Lu, H., A.P. Golovanov, F. Alcock, J.G. Grossmann, S. Allen, L.Y. Lian, and K. Tokatlidis. 2004b. The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J Biol Chem*. 279:18959-66.
- Lu, H., and J. Woodburn. 2005. Zinc binding stabilizes mitochondrial Tim10 in a reduced and import-competent state kinetically. *J Mol Biol*. 353:897-910.
- Lutz, T., W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2003. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J*. 22:4400-8.
- Lyles, M.M., and H.F. Gilbert. 1991. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry*. 30:613-9.
- Manning-Krieg, U.C., P.E. Scherer, and G. Schatz. 1991. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J*. 10:3273-80.
- Margulis, L. 1970. Origin of Eukaryotic Cell. *Yale Univ Press, New Haven, CT*.
- Martin, J., K. Mahlke, and N. Pfanner. 1991. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*. 266:18051-7.
- Mayer, A., W. Neupert, and R. Lill. 1995. Mitochondrial protein import: Reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*. 80:127-137.

- Meisinger, C., M. Rissler, A. Chacinska, L.K. Szklarz, D. Milenkovic, V. Kozjak, B. Schonfisch, C. Lohaus, H.E. Meyer, M.P. Yaffe, B. Guiard, N. Wiedemann, and N. Pfanner. 2004. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*. 7:61-71.
- Melton DA, K.P., Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, and Green MR,. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active mRNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *NAR*. 12:7035-7056.
- Mesecke, N., K. Bihlmaier, B. Grumbt, S. Longen, N. Terziyska, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2008. The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. *EMBO Rep*. 9:1107-13.
- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*. 121:1059-69.
- Michaelis, G., K. Esser, B. Tursun, J.P. Stohn, S. Hanson, and E. Pratje. 2005. Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome c peroxidase. *Gene*. 354:58-63.
- Milenkovic, D., K. Gabriel, B. Guiard, A. Schulze-Specking, N. Pfanner, and A. Chacinska. 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*. 282:22472-80.
- Missiakas, D., C. Georgopoulos, and S. Raina. 1994. The Escherichia coli dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J*. 13:2013-20.
- Missiakas, D., F. Schwager, and S. Raina. 1995. Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in Escherichia coli. *EMBO J*. 14:3415-24.
- Model, K., C. Meisinger, T. Prinz, N. Wiedemann, K.N. Truscott, N. Pfanner, and M.T. Ryan. 2001. Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Biol*. 8:361-70.
- Mokranjac, D., and W. Neupert. 2009. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta*. 1793:33-41.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. 2003. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J*. 22:816-825.
- Morgan, B., S.K. Ang, G. Yan, and H. Lu. 2009. Zinc Can Play Chaperone-like and Inhibitor Roles during Import of Mitochondrial Small Tim Proteins. *J Biol Chem*. 284:6818-25.
- Morgan, B., and H. Lu. 2008. Oxidative folding competes with mitochondrial import of the small Tim proteins. *Biochem J*. 411:115-22.

- Muhlenhoff, U., and R. Lill. 2000. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1459:370-82.
- Muller, J.M., D. Milenkovic, B. Guiard, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2008. Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell*. 19:226-36.
- Naoe, M., Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo. 2004. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*. 279:47815-21.
- Nargang, F.E., M.E. Drygas, P.L. Kwong, D.W. Nicholson, and W. Neupert. 1988. A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem*. 263:9388-94.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 66:863-917.
- Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:555-65.
- Nobrega, M.P., S.C. Bandeira, J. Beers, and A. Tzagoloff. 2002. Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 277:40206-11.
- Ostergaard, H., C. Tachibana, and J.R. Winther. 2004. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol*. 166:337-45.
- Pace, C.N., G.R. Grimsley, J.A. Thomson, and B.J. Barnett. 1988. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem*. 263:11820-5.
- Palumaa, P., L. Kangur, A. Voronova, and R. Sillard. 2004. Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase. *Biochem J*. 382:307-14.
- Palumaa, P., and K. Zovo. 2008. Modulation of redox switches of copper chaperone Cox17 by Zn(II) ions, determined by new ESI MS based approach. *Antioxid Redox Signal*. 11: 985-995.
- Paschen, S.A., U. Rothbauer, K. Kaldi, M.F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J*. 19:6392-400.
- Pawlowski, R., and J. Jura. 2006. ALR and liver regeneration. *Mol Cell Biochem*. 288:159-69.
- Pelham, H.R.B., and R.J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*. 67:247-256.
- Pfanner, N., E.A. Craig, and A. Honlinger. 1997. Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:25-51.

- Pfanner, N., M. Tropschug, and W. Neupert. 1987. Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell*. 49:815-23.
- Pollard, M.G., K.J. Travers, and J.S. Weissman. 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*. 1:171-82.
- Rapaport, D. 2002. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci*. 27:191-7.
- Rapaport, D., K.P. Kunkele, M. Dembowski, U. Ahting, F.E. Nargang, W. Neupert, and R. Lill. 1998a. Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol*. 18:5256-62.
- Rapaport, D., A. Mayer, W. Neupert, and R. Lill. 1998b. cis and trans sites of the TOM complex of mitochondria in unfolding and initial translocation of preproteins. *J Biol Chem*. 273:8806-13.
- Rapaport, D., and W. Neupert. 1999. Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol*. 146:321-31.
- Reddehase, S., B. Grumbt, W. Neupert, and K. Hell. 2009. The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol*. 385:331-8.
- Rehling, P., K. Model, K. Brandner, P. Kovermann, A. Sickmann, H.E. Meyer, W. Kuhlbrandt, R. Wagner, K.N. Truscott, and N. Pfanner. 2003. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*. 299:1747-51.
- Rietsch, A., D. Belin, N. Martin, and J. Beckwith. 1996. An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13048-53.
- Rietsch, A., P. Bessette, G. Georgiou, and J. Beckwith. 1997. Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*. 179:6602-8.
- Rissler, M., N. Wiedemann, S. Pfannschmidt, K. Gabriel, B. Guiard, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2005. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol*. 353:485-92.
- Roise, D., F. Theiler, S.J. Horvath, J.M. Tomich, J.H. Richards, D.S. Allison, and G. Schatz. 1988. Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J*. 7:649-53.
- Rothstein RJ. 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*. 101:202-211.
- Schmidt, B., L. Ho, and P.J. Hogg. 2006. Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry*. 45:7429-33.

- Sevier, C.S., J.W. Cuzzo, A. Vala, F. Aslund, and C.A. Kaiser. 2001. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol.* 3:874-82.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2006a. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal.* 8:797-811.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2006b. Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell.* 17:2256-66.
- Sevier, C.S., H. Qu, N. Heldman, E. Gross, D. Fass, and C.A. Kaiser. 2007. Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell.* 129:333-44.
- Sideris, D.P., and K. Tokatlidis. 2007. Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol Microbiol.* 65:1360-73.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Sirrenberg, C., M.F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. 1996. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature.* 384:582-5.
- Sirrenberg, C., M. Endres, H. Folsch, R.A. Stuart, W. Neupert, and M. Brunner. 1998. Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature.* 391:912-5.
- Srinivasan, C., M.C. Posewitz, G.N. George, and D.R. Winge. 1998. Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 37:7572-7.
- Stan, T., U. Ahting, M. Dembowski, K.P. Kunkele, S. Nussberger, W. Neupert, and D. Rapaport. 2000. Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J.* 19:4895-902.
- Steiner, H., A. Zollner, A. Haid, W. Neupert, and R. Lill. 1995. Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem.* 270:22842-9.
- Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, and G. Kroemer. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397:441-6.
- Szyrach, G., M. Ott, N. Bonnefoy, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2003. Ribosome binding to the Oxal1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22:6448-57.



- Terziyska, N., B. Grumbt, M. Bien, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2007. The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* 581:1098-102.
- Terziyska, N., B. Grumbt, C. Kozany, and K. Hell. 2009. Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem.* 284:1353-63.
- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2005. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* 579:179-84.
- Thornton, J.M. 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol.* 151:261-87.
- Tian, G., S. Xiang, R. Noiva, W.J. Lennarz, and H. Schindelin. 2006. The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell.* 124:61-73.
- Truscott, K.N., P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A.J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner, and R. Wagner. 2001. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol.* 8:1074-82.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. 1995. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 269:1069-74.
- Tu, B.P., S.C. Ho-Schleyer, K.J. Travers, and J.S. Weissman. 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science.* 290:1571-4.
- Tu, B.P., and J.S. Weissman. 2002. The FAD- and O<sub>2</sub>-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 10:983-94.
- Vala, A., C.S. Sevier, and C.A. Kaiser. 2005. Structural determinants of substrate access to the disulfide oxidase Erv2p. *J Mol Biol.* 354:952-66.
- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102:43-53.
- Vial, S., H. Lu, S. Allen, P. Savory, D. Thornton, J. Sheehan, and K. Tokatlidis. 2002. Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J Biol Chem.* 277:36100-8.
- Von Heijne, G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5:1335-42.
- Voronova, A., W. Meyer-Klaucke, T. Meyer, A. Rompel, B. Krebs, J. Kazantseva, R. Sillard, and P. Palumaa. 2007. Oxidative switches in functioning of mammalian copper chaperone Cox17. *Biochem J.*

- Waizenegger, T., S.J. Habib, M. Lech, D. Mokranjac, S.A. Paschen, K. Hell, W. Neupert, and D. Rapaport. 2004. Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep.* 5:704-709.
- Webb, C.T., M.A. Gorman, M. Lazarou, M.T. Ryan, and J.M. Gulbis. 2006. Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell.* 21:123-33.
- Wiedemann, N., A.E. Frazier, and N. Pfanner. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:14473-6.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature.* 424:565-71.
- Wilkinson, B., and H.F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 1699:35-44.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo. 2002. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell.* 111:519-28.
- Zapun, A., J.C. Bardwell, and T.E. Creighton. 1993. The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry.* 32:5083-92.
- Zhang, R.M., and G.H. Snyder. 1989. Dependence of formation of small disulfide loops in two-cysteine peptides on the number and types of intervening amino acids. *J Biol Chem.* 264:18472-9.



**Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:**

- Terziyska, N., B. Grumbt, M. Bien, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2007. The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* 581:1098-102.
- Grumbt, B., V. Stroobant, N. Terziyska, L. Israel, and K. Hell. 2007. Functional Characterization of Mia40p, the Central Component of the Disulfide Relay System of the Mitochondrial Intermembrane Space. *J Biol Chem.* 282:37461-37470.
- Mesecke, N., K. Bihlmaier, B. Grumbt, S. Longen, N. Terziyska, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2008. The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. *EMBO Rep.* 9:1107-13.
- Reddehase, S., B. Grumbt, W. Neupert, and K. Hell. 2009. The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol.* 385:331-8.
- Terziyska, N., B. Grumbt, C. Kozany, and K. Hell. 2009. Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem.* 284:1353-63.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAC	ADP/ATP- <i>carrier</i>
ALR	<i>augmenter of liver regeneration</i>
Amp	Ampicillin
AMS	4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Circulardichroismus
CHCH	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix</i>
Cox	<i>cytochrome c oxidase</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ero1	<i>ER oxidoreductin</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
G	Erdbeschleunigung
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IMR	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- $\beta$ ,D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin

kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
m7G (5')ppp(5')G	7-methylguanosid-triphosphat
MBP	Maltosebindeprotein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
N-Terminus	Aminoterminus
NEM	N-ethylmaleimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmun
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TIM	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

U	<i>unit</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WT	Wildtyp
YP	Hefeextrakt, Pepton ( <i>yeast extract, peptone</i> )

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert dafür danken, die Möglichkeit gehabt zu haben in diesem hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld meine Arbeit anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll möchte ich mich für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie bedanken.

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Dr. Kai Hell bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine Ideen und die Unterstützung bei der Gestaltung meiner Projekte haben mir sehr geholfen.

Bei Dr. Vincent Stroobant möchte ich mich für die unkomplizierte und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der massenspektrometrischen Analyse von Mia40 besonders bedanken.

Lars Israel vom Zentrallabor für Proteinanalytik möchte ich für die Hilfe bei einigen massenspektrometrischen Untersuchungen von Mia40 danken.

Bei Elisabeth Weyer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der CD-Spektren von Mia40.

Für die technische Unterstützung und sehr nette Zusammenarbeit möchte ich Ulrike und Alex danken.

Dem Elite Netzwerk Bayern und der Bayerischen Eliteförderung möchte ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit, sowie die Ermöglichung von Konferenzbesuchen und der Teilnahme an verschiedenen Kursen zur beruflichen und persönlichen Weiterbildung danken.

Frau Hauck und besonders Christine Werner danke ich für die administrative Unterstützung.

Peter und Gerd von der Werkstatt des Instituts danke ich für die Hilfe bei verschiedenen technischen Problemen.

Unseren Spülfrauen danke ich für die Bereitstellung des sauberen Arbeitsmaterials. Marica und Zdenka möchte ich für nette Gespräche, die besten Süßigkeiten und Mitos danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für eine nette Arbeitsatmosphäre danken. Vielen Dank besonders an Nadia, Koyeli, Dusan, Christian, Patrick, Astrid, Silvia, Marta und Jelena.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zum Schluß möchte ich Adjmal danken, der mich während der gesamten Doktorarbeit immer unterstützt hat. اش ليبي ديش اجمل اوند فروي ميش اوبر الس اوف دايني دختر

## Curriculum vitae

Barbara Grumbt

geboren am 14. Februar 1980 in München

1986-1990	Besuch der Grundschule Neuried
1990-1999	Besuch des Feodor-Lynen-Gymnasiums, Neuried
1999	Abitur am Feodor-Lynen-Gymnasiums, Neuried
1999-2005	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2004-2005	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität, München Titel „Polymorphismen von HLA-G und Regulation der Expression“ Betreuerin Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
2005	Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert in der Arbeitsgruppe von Dr. Kai Hell am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

