

**Die Funktion des mitochondrialen ABC-Transporters  
Atm1p und anderer Proteine bei der Reifung cytosolischer  
Fe/S-Proteine in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
Corinna Prohl  
aus Lübeck

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28.06.00 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Lill

Tag der mündlichen Prüfung am 29.08.00

## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich meine Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 18.05.00

<b>Inhalt</b>	i
<b>Abkürzungen</b>	vii
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Mitochondrien: Organellen mit komplexen biologischen Aufgaben	1
1.1.1 Proteintransport in die und aus den Mitochondrien	2
1.1.2 Transport von Metaboliten in die Mitochondrien	3
1.1.2.1 Carrierproteine	3
1.1.2.2 Der mitochondriale ABC-Transporter Atm1p	4
1.2 Eisenstoffwechsel einer Hefezelle	6
1.2.1 Transport von Eisen in die Hefezelle	6
1.2.2 Das Frataxinhomolog ist wichtig für die Eisen-Homöostase der Zelle	7
1.2.3 Funktion von Fe/S-Proteinen in der Zelle	7
1.2.4 Das bakterielle <i>nif</i> -Operon codiert Komponenten für die Biogenese der Nitrogenase	9
1.2.5 Das bakterielle <i>isc</i> -Operon	10
1.3 Proteine, die in Wechselwirkung mit Atm1p stehen	11
1.3.1 Die Transaminasen Bat1p und Bat2p	11
1.3.2 Bisherige Erkenntnisse über Leu5p	13
1.4 Aufgabenstellung	13
<b>2. Methoden</b>	16
2.1 Methoden der Molekularbiologie	16
2.1.1 Präparation von DNA	16
2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	16
2.1.1.2 Isolierung von DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.1.2 Reinigung und Analyse von DNA	17
2.1.2.1 Phenolextraktion und Ethanol-fällung	17
2.1.2.2 Agarosegelelektrophorese von DNA	18
2.1.2.3 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen	18
2.1.3 Enzymatische Modifikation von DNA	18
2.1.3.1 Restriktionsspaltung von DNA	18

2.1.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	19
2.1.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten	19
2.1.4 Transformation von Mikroorganismen mit rekombinanter DNA	19
2.1.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	19
2.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.1.4.3 Automatisches Sequenzieren von DNA	21
2.2 Methoden der Hefegenetik	22
2.2.1 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.2.2 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.2.3 Sporulation diploider Hefestämme	23
2.2.4 Tetradenanalyse	23
2.2.5 Deletion eines Gens im Hefegenom	24
2.3 Methoden der Biochemie	24
2.3.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	24
2.3.1.1 <i>In vitro</i> -Transkription	24
2.3.1.2 <i>In vitro</i> -Translation von mitochondrialen Vorstufenproteinen	24
2.3.2 Isolierung von Mitochondrien und postmitochondrialem Überstand (PMS) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.3.3 Reinigung von Mitochondrien durch Dichtegradientenzentrifugation	26
2.3.4 Import von Proteinen in Mitochondrien	26
2.3.5 Gewinnung eines Zellextrakts bzw. kleiner Mengen an Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.3.6 Bestimmung des mitochondrialen Eisengehalts	28
2.3.7 Proteinanalytische Methoden	28
2.3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.3.7.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	29
2.3.7.4 Cytochromspektrum	29
2.3.8 Reinigung von rekombinantem Protein (Bat1p) aus <i>E. coli</i> und Analyse	29
2.3.9 Quervernetzung von interagierenden Proteinen	30
2.3.10 Messung von Enzymaktivitäten	31
2.3.10.1 Isopropylmalat-Isomerase	31
2.3.10.2 $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase	31

2.3.10.3 $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase	31
2.3.10.4 Citratsynthase	32
2.3.10.5 Aconitase	33
2.3.10.6 Malatdehydrogenase	33
2.3.10.7 Succinat-Dehydrogenase	33
2.3.10.8 Alkoholdehydrogenase	33
2.3.10.9 Transaminase verzweigtkettiger Aminosäuren	34
2.3.11 Metabolitbestimmung	35
2.3.11.1 Quantitative Bestimmung von Coenzym A	35
2.3.11.2 Quantitative Bestimmung von Citrat	36
2.3.11.3 ATP-Bildung in Abhängigkeit vom Membranpotential	36
2.4 Immunologische Methoden	37
2.4.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und anschließende Immundekoration	37
2.4.1.1 Erneute Immundekoration	37
2.4.2 Bestimmung des Einbaus von radioaktivem Eisen in Eisen-Schwefel-Proteine über Immunfällung	38
2.5 Materialien	39
2.5.1 Oligonukleotide	39
2.5.2 Plasmide	41
2.5.3 Verzeichnis der Plasmide	42
2.5.4 Verzeichnis der Bakterien- und Hefestämme	43
2.5.5 Häufig verwendete Medien und Puffer	45
2.5.6 Chemikalien und Feinchemikalien	47
2.5.7 Radiochemikalien	48
2.5.8 Laborgeräte	48
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1 Atm1p besitzt eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine	50
3.1.1 Die Deletion des <i>ATM1</i> Gens führt zu einem Defekt in Leu1p	50
3.1.2 Atm1p wird benötigt für den Einbau eines Fe/S-Clusters in ein cytosolisches Fe/S-Protein	51
3.2 Bat1p und Bat2p haben eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine	53

3.2.1 Die Bat Proteine besitzen eine Transaminase-Funktion	53
3.2.1.1 Reinigung von Bat1p	53
3.2.1.2 Gereinigtes Bat1p ist als Transaminase aktiv	54
3.2.1.3 Bat1p bildet ein Dimer	55
3.2.2 Bestimmung der zweiten Funktion der Bat Proteine	57
3.2.2.1 Die zweite Funktion der Bat-Proteine ist Transaminase-unabhängig	57
3.2.2.2 Bakteriell <i>ilvE</i> besitzt ebenfalls eine zweite Funktion	61
3.2.2.3 Die Bat Proteine besitzen eine Funktion in der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine	62
3.2.2.3.1 In $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen ist die Aktivität des cytosolischen Fe/S-Proteins Leu1p reduziert	62
3.2.2.3.2 Die Bat Proteine sind notwendig für den Einbau der Fe/S-Cluster in cytosolische Apoproteine	64
3.2.2.4. Die Bat Proteine werden für die Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine nicht benötigt	67
3.3 Isu1p und Isu2p sind funktionell beteiligt an der Biogenese sowohl cytosolischer als auch mitochondrialer Fe/S-Proteine	69
3.3.1 Die Familie der Isu/IscU Proteine	69
3.3.2 Deletion der <i>ISU</i> Gene	70
3.3.3 $\Delta$ isu1- und $\Delta$ isu2-Zellen zeigen keinen Wachstumsphänotyp	71
3.3.4 Subzelluläre Lokalisierung der Isu Proteine	72
3.3.5 $\Delta$ isu1- und $\Delta$ isu2-Zellen zeigen keine signifikante Veränderung in der Aktivität von Fe/S-Cluster-haltigen Enzymen	74
3.3.6 Herstellung von $\Delta$ isu2Gal- <i>ISU1</i> - bzw. $\Delta$ isu1Gal- <i>ISU2</i> -Zellen zur regulierten Expression der Isu Proteine	75
3.3.7 $\Delta$ isu2Gal- <i>ISU1</i> - bzw. $\Delta$ isu1Gal- <i>ISU2</i> -Zellen zeigen keinen wesentlichen Wachstumsphänotyp	76
3.3.8 Die Depletion der Isu Proteine führt zu einem Defekt in der Biogenese von Fe/S-Clustern mitochondrialer Proteine	77
3.3.9 Isu Protein-depletierte Zellen zeigen eine Störung in der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine	79
3.3.10 Die Depletion der Isu Proteine führt zu einer Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien	82

3.3.11 Bakteriellcs IscU ist ortholog zu Isu1p und Isu2p	83
3.4 Funktionsaufklärung der Proteine Mdl1p und Mdl2p	85
3.4.1 Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p	85
3.4.1.1 Lokalisierung der Mdl Proteine in der mitochondrialen Innenmembran	86
3.4.2 Analyse des Phänotyps von Mdl Protein-defizienten Zellen	88
3.4.2.1 In Mdl2p-defizienten Zellen ist die Aktivität der Fe/S-Proteine nicht signifikant betroffen	89
3.4.3 Mdl2p kann den Wachstumsdefekt von Atm1p-defizienten Zellen komplementieren	91
3.4.3.1 Die Überexpression von Mdl2p komplementiert den Wachstumsdefekt von $\Delta atm1$ -Zellen	91
3.5 Aufklärung der Funktion des Proteins Leu5p	94
3.5.1 Import von Leu5p in die mitochondriale Innenmembran	95
3.5.2 Deletion von <i>LEU5</i>	97
3.5.2.1 Leu5p-defiziente Zellen sind funktionell in der oxidativen Phosphorylierung	98
3.5.3 Identifizierung des möglichen Substrats von Leu5p	100
3.5.3.1 Intakte Mitochondrien ohne Leu5p weisen einen Defekt in der Synthese von $\alpha$ -Isopropylmalat auf	101
3.5.3.2 Lysierte Mitochondrien aus $\Delta leu5$ -Zellen können $\alpha$ -Isopropylmalat synthetisieren	102
3.5.3.3 Leu5p ist für die Akkumulation von CoA in den Mitochondrien verantwortlich	104
3.5.3.4 Inaktivierung der peroxisomalen Citratsynthase in $\Delta leu5$ -Zellen erniedrigt die Citratkonzentration in der Zelle	105
3.5.4 Das "human Graves` disease protein" kann Leu5p funktionell ersetzen	107
<b>4. Diskussion</b>	110
4.1 Die Mitochondrien sind der Ort der Biosynthese von Fe/S-Clustern	110
4.1.1 Mitochondriale Synthese von Fe/S-Clustern	111
4.1.2 bertragung neusynthetisierter Fe/S-Cluster in mitochondriale Apoproteine	112



---

4.1.3 Atm1p und Mdl2p sind für den Transport der Fe/S-Cluster über die mitochondriale Innenmembran ins Cytosol verantwortlich	113
4.1.4 Die Rolle der Bat Proteine bei der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine	115
4.1.5 Der eukaryontische Fe/S-Cluster Biosyntheseapparat entspricht dem in Prokaryonten	116
4.2 Das Carrierprotein Leu5p transportiert Coenzym A in die Mitochondrien	118
4.2.1 Biochemischer Zusammenhang zwischen Leu5p und Atm1p	119
<b>5. Zusammenfassung</b>	121
<b>6. Literatur</b>	123
<b>Danksagungen</b>	137

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	“ATP-binding-cassette“-Transporter
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
C-Terminus	carboxyterminal
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$\Delta\Psi$	Membranpotential
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fe/S	Eisen-Schwefel
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
min	Minuten
NADH	Nikotinamidadenosindinukleotid, reduziert
NADPH	Nikotinamidadenosindinukleotidphosphat, reduziert
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-Terminus	aminoterminal
Nykodenz	5-(N-2, 3-Dihydroxypropylacetamido)-2, 4, 6-tri-iodo-N, N'-bis(2, 3 dihydroxypropyl)isophthalamid
OD	Optische Dichte

PCR	Polymerasekettenreaktion ('Polymerase chain reaction')
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PK	Proteinase K
<i>R. prowazekii</i>	<i>Rickettsia prowazekii</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunden
Su9	Untereinheit 9 des F <sub>0</sub> -Teils der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WT	Wildtyp

## **1. Einleitung**

### **1.1 Mitochondrien: Organellen mit komplexen biologischen Aufgaben**

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryontischer Zellen. Das Mitochondrium wird durch zwei Membranen in vier Subkompartimente unterteilt: die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix. In der Innenmembran sind die Komponenten der Elektronentransportkette und die ATP-Synthase lokalisiert. Die bekannteste Funktion der Mitochondrien ist sicher die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung. In der Matrix befinden sich die Enzyme des Citronensäurezyklus und der oxidativen Decarboxylierung. Zusätzlich sind diese Organellen Ort des Harnstoffzyklus, des Fettsäureabbaus über  $\beta$ -Oxidation und der Biosynthese einiger Aminosäuren (Isoleucin, Leucin u.a.) sowie einiger Enzymcofaktoren. Aus diesen vielen Aufgaben erklärt sich die geschätzte Menge von 800 Proteinen in den Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae*. Etwa die Hälfte davon wurde bisher identifiziert (Scharfe et al., 1999; Grivell et al., 1999). Eine große Anzahl der Proteine nimmt an den metabolischen Prozessen teil als Enzym oder als Transporter, um Metabolite zwischen dem Cytosol und der mitochondrialen Matrix auszutauschen (De Winde and Grivell, 1993; El Moualij et al., 1997). Mehr als 100 mitochondriale Proteine sind an der Biosynthese der Organelle beteiligt. Einige dieser Proteine wirken am Import, der Prozessierung, Membraninsertion oder Faltung von Präproteinen, die von nukleären Genen codiert und im Cytosol translatiert werden, mit (Lill et al., 1996; Schatz and Dobberstein, 1996; Neupert, 1997; Pfanner et al., 1997). Eine andere Gruppe von mitochondrialen Proteinen ist für die Synthese, Erhaltung und Transkription der mitochondrialen DNA (mtDNA) verantwortlich. Zur Synthese der in der mtDNA codierten Proteine besitzen die Mitochondrien einen Proteinsyntheseapparat, der dem von Bakterien ähnelt. Schließlich haben einige mitochondriale Proteine eine Funktion im Zusammenbau von makromolekularen Komplexen und in der Integration verschiedener Cofaktoren in die jeweiligen Apoproteine. Das Mitochondrium stellt sich damit als ein komplexes zelluläres Organell dar, in dem zahlreiche wichtige Prozesse ablaufen. Es ist deshalb nicht überraschend, daß Mitochondrien essentiell für die eukaryontische Zelle sind.

Im folgenden soll auf den Transport von Proteinen und Metaboliten in die Mitochondrien eingegangen werden.

### **1.1.1 Proteintransport in die Mitochondrien**

Die mtDNA der Hefe *S. cerevisiae* codiert nur für 8 Proteine. Die mtDNA des Menschen codiert für 13, die der Pflanzen für mehr als 100 Proteine. Der Hauptteil der mitochondrialen Proteine (99%) wird in den meisten Eukaryonten von nukleären Genen codiert. Sie müssen nach der Synthese an cytosolischen Ribosomen als Präproteine in die Mitochondrien importiert werden. Viele mitochondriale Vorstufenproteine besitzen eine aminoterminaler Präsequenz, die als Sortierungssignal für die Translokation in die Matrix dient. Die Präsequenzen zeichnen sich durch einen hohen Anteil positiv geladener und hydroxylierter Aminosäurereste aus. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, eine amphipathische Helix auszubilden. Bei einigen Proteinen befindet sich dieses Importsignal jedoch nicht am N-Terminus, sondern innerhalb des Polypeptids. Dies ist z.B. bei den sog. Carrierproteinen der Fall, die weiter unten besprochen werden (1.1.2.1). Bei den Cytochrom-Hämlyasen wurde ein internes Signal identifiziert, das diese Proteine in den Intermembranraum der Mitochondrien dirigiert. Dieses Signal konnte auf 60 Aminosäuren im dritten Viertel der Polypeptidkette eingegrenzt werden (Diekert et al., 1999).

Die Translokation und Membraninsertion von Präproteinen wird von Proteinkomplexen in der Außenmembran (TOM-Komplex) und der Innenmembran (TIM22- und TIM23-Komplexe) bewerkstelligt (Voos et al., 1999). Der TOM-Komplex ist für die Erkennung und Translokation der Präproteine verantwortlich (Kiebler et al., 1990; Söllner et al., 1992). Die Komponenten des TOM-Komplexes können nach ihrer strukturellen Anordnung in der Außenmembran in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Proteine der ersten Gruppe (Tom20p, Tom22p, Tom37p, und Tom70p) besitzen große cytosolische Domänen und dienen als Rezeptoren für die Erkennung der Präproteine. Dabei erkennen Tom70p und Tom37p spezifisch das interne Signal von sog. mitochondrialen Carrierproteinen und leiten das Protein weiter an Tom20p und Tom22p. Die zweite Gruppe enthält Proteine, die überwiegend in der Lipiddoppelschicht lokalisiert sind. Dazu gehören Tom40p und die kleinen Proteine Tom5p, Tom6p und Tom7p. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Komponenten des Importkanals über die Außenmembran (Künkele et al., 1998).

Nach der Translokation über die Außenmembran gelangt die Polypeptidkette an die Innenmembran zu einem der zwei TIM-Komplexe. Präproteine mit N-terminaler Präsequenz gelangen über den TIM23-Komplex, der aus drei essentiellen Proteinen besteht, in die Matrix. Die integralen Proteine Tim17p und Tim23p bilden dabei die Importpore, durch die das Protein zu Tim44p, einem peripheren Protein, das zur Matrix weist, gelangt (Pfanner et al., 1994).

Carrierproteine benutzen demgegenüber einen anderen, für sie spezifischen Komplex, den sog. TIM22-Komplex. Dieser Translokationsweg wird in Kap. 1.1.2.1 besprochen.

### **1.1.2 Transport von Metaboliten in die und aus den Mitochondrien**

Metabolite wie z.B. ADP, Phosphat, verschiedene Aminosäuren und Di- und Tricarboxylate werden durch die Innenmembran mit Hilfe spezifischer Transportsysteme in die Mitochondrien transportiert. Eine der wichtigsten Klassen von Transportern ist die sog. mitochondriale Carrierfamilie, deren Eigenschaften im folgenden dargestellt werden sollen. Darüberhinaus sollen noch die sog. ABC-Transporter ("ATP-binding cassette") charakterisiert werden, die eine zweite wichtige Transporterfamilie darstellen.

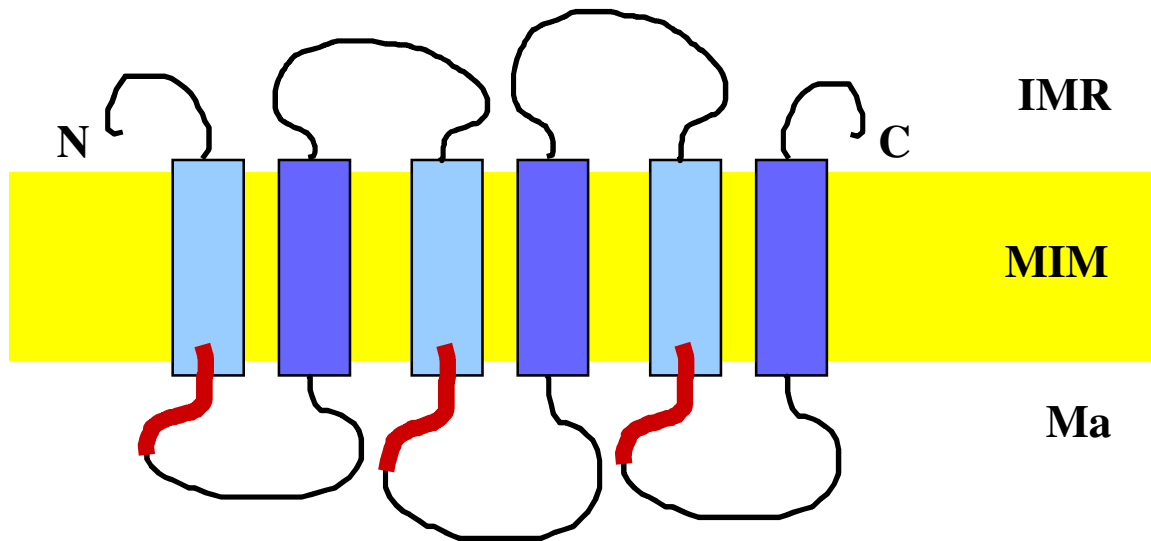
#### 1.1.2.1 Carrierproteine

Im Genom von *S. cerevisiae* wurden 35 Mitglieder der Carrierfamilie aufgrund ihrer charakteristischen Besonderheiten in der Primärstruktur identifiziert (El Moulidj et al., 1997; Nelson et al., 1998). Bekannt sind Carrierproteine, die den Austausch von ADP und ATP (AAC) bewerkstelligen und solche, die für den Transport von z.B. Phosphat, Di- und Tricarboxylaten, Aminosäuren, FAD, Citrat oder Protonen (s. z.B. Kakhniashvili et al., 1997; Palmieri et al., 1999a; Palmieri et al., 1999b; Palmieri et al., 1997a; Palmieri et al., 1997b; Tzagoloff et al., 1996; Kaplan et al., 1995) verantwortlich sind. Das Substrat der meisten Carrier der Hefemitochondrien ist jedoch bis jetzt unbekannt.

Die Biogenese der Carrierproteine unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von der anderer mitochondrialer Proteine. Sie besitzen ein internes Importsignal und verfolgen einen speziellen Importweg über spezifische Komponenten der Außenmembran (Tom37p und Tom70p; (Söllner et al., 1990; Hines et al., 1990)), des Intermembranraums (Tim9p, Tim10p und Tim12p; (Sirrenberg et al., 1998; Koehler et al., 1998)) und der Innenmembran (Tim18p, Tim22p und Tim54p; (Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996; Kerscher et al., 1997)). Die spezielle Biogenese der Carrierproteine könnte darin begründet sein, daß diese Proteine einen großen Anteil des Proteingehalts der Innenmembran ausmachen.

In ihrer transportkompetenten Form bilden Carrierproteine Dimere (Schroers et al., 1998). Jedes Monomer ist aufgebaut aus drei homologen Modulen, die je zwei Transmembransegmente enthalten (Abb. 1). Amino- und Carboxylende zeigen zum Intermembranraum. Die einzelnen Mitglieder der Carrier sind zu 20 bis 40% identisch in ihrer Aminosäuresequenz. Sie weisen ein charakteristisches Sequenzmotiv, das sog. "carrier signature motif", auf, und zwar je eines pro Modul. Diese Motive sind erforderlich für die

Funktion der Carrier (siehe z.B. Muller et al., 1997) und spielen vermutlich auch bei ihrer Insertion in die Innenmembran eine Rolle (Sirrenberg et al., 1998).

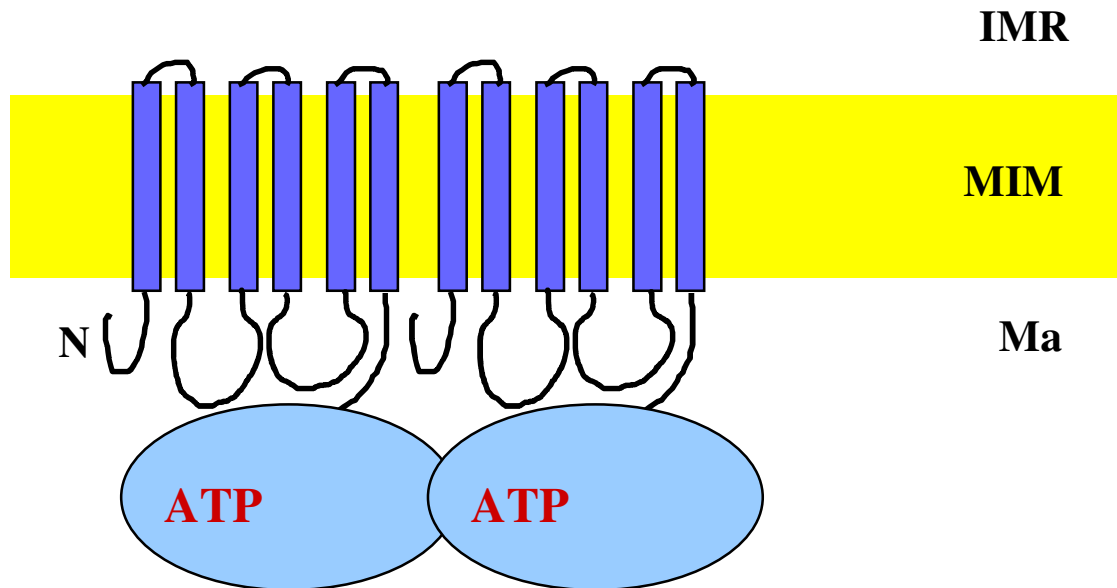


**Abb. 1. Struktur eines Carrierproteins.** Das Protein setzt sich aus drei Einheiten mit je zwei Transmembrandomänen zusammen, wobei C- und N-Terminus zum Intermembranraum (IMR) weisen. Als dicke Linie sind die drei Carriersignalmotive hervorgehoben. MIM, mitochondriale Innenmembran; Ma, Matrix.

#### 1.1.2.2 Der mitochondriale ABC-Transporter Atm1p

Die Familie der ABC-Transporter gehört zu einer großen Gruppe von ATP-abhängigen Transmembranproteinen, die spezifisch Substrate über die Membran transportieren (Higgins, 1992; Bauer et al., 1999). Der Aufbau eines ABC-Transporters ist hochkonserviert. Die Proteine sind üblicherweise aus zwei membranverankerten Domänen und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (ATP-Bindungskassette) zusammengesetzt (Abb. 2). Jede Membrandomäne besteht in der Regel aus sechs trans-Membransegmenten, die vermutlich die Poren für den Durchtritt des Substrats bilden. Der Transport von Substraten über die Membran erfolgt stets in einer Richtung (in der Regel von der Seite der ABC Domäne zur anderen Seite der Membran) und benötigt die Hydrolyse von ATP in beiden Nukleotid-Bindungsdomänen.

Atm1p stellt einen "Halbtransporter" dar, der aus einer Transmembrandomäne (mit 6 trans-Membranhelices) und einer ABC Domäne besteht, die in der mitochondrialen Matrix exponiert ist (Abb. 2). Die funktionelle Form von Atm1p ist ein Dimer. Aus dieser Membranorientierung kann eine Funktion des Atm1p als mitochondrialer Exporter vorhergesagt werden.



**Abb. 2. Struktur des ABC-Transporters Atm1p.** Funktionell in der Zelle ist Atm1p als Dimer. Die ATP-Bindungskassette (ATP) ist am C-Terminus jedes Monomers und weist zur Matrix (Ma). IMR, Intermembranraum; MIM, mitochondriale Innenmembran.

Atm1p war das erste Protein, das als ABC-Transporter der Mitochondrien identifiziert wurde. Homologe zu Atm1p aus *S. cerevisiae* sind bekannt in *Schizosaccharomyces pombe*, Maus, Mensch (hABC7), der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und dem intrazellulären Bakterium *Rickettsia prowazekii*. Bisher konnte gezeigt werden, daß das humane Protein hABC7 die gleiche Funktion ausübt wie Atm1p, da die Expression dieses Proteins in *ATM1*-defizienten Hefezellen deren Wachstumsphänotyp komplementiert (Csere et al., 1998). Mutationen in hABC7 sind die Ursache für den Defekt einer seltenen Eisenspeichererkrankung, der X-Chromosomen-verknüpften sideroblastischen Anämie mit cerebellarer Ataxie XLSA/A (Allikmets et al., 1999).

*ATM1*-defiziente Hefezellen ( $\Delta atm1$ -Zellen) zeigen mehrere charakteristische Phänotypen (Kispal et al., 1997; Leighton and Schatz, 1995; Kispal et al., 1999). Die Mutation führt zum Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerin) und zu einem stark reduzierten Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glukose. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des Atm1p für die gesamte Zelle hin, die über die Biogenese respiratorisch kompetenter Mitochondrien hinausgeht. Die Inaktivierung von Atm1p führt zu einem weitgehenden Verlust von Cytochromen und extra-mitochondrialen Hämproteinen (z.B. der peroxisomalen Katalase). Die Biosynthese dieser Proteine ist jedoch funktionell, was ausschließt, daß Atm1p eine Rolle bei der Synthese dieser Hämproteine zukommt. Zellen ohne Atm1p enthalten erhöhte Mengen an Glutathion, ein genereller Indikator für oxidativen Streß in Hefe. Das auffälligste phänotypische Merkmal



von  $\Delta atm1$ -Zellen oder Zellen mit mutiertem hABC7 ist jedoch die starke Anreicherung von "freiem" Eisen (d.h. Eisen, das nicht in Häm oder Fe/S-Clustern gebunden ist) in Mitochondrien (Kispal et al., 1997; Allikmets et al., 1999). Zur Erklärung all dieser phänotypischen Merkmale wurde vorgeschlagen, daß die erhöhte Menge an Eisen einen oxidativen Streß auslösen könnte, der sekundär zur Bildung von Glutathion und der Zerstörung der Hämproteine führt.

## **1.2 Eisenstoffwechsel**

Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* - wie auch für andere Organismen - ist Eisen ein essentielles Spurenelement. Bei erhöhten Konzentrationen ist Eisen jedoch toxisch, da es die Bildung freier Radikale stimuliert. Um die Zelle mit einer ausgewogenen Menge an Eisen zu versorgen, muß Eisen reguliert aufgenommen werden.

### **1.2.1 Transport von Eisen in die Hefezelle**

In der Hefe wird Eisen in reduzierter Form ( $Fe^{2+}$ ) über die Zellmembran transportiert. Die  $Fe^{3+}$ -Oberflächenreduktasen Fre1p und Fre2p reduzieren das unlösliche  $Fe^{3+}$  und leiten es als  $Fe^{2+}$  an Eisentransporter in der Plasmamembran der Zelle weiter. Zwei verschiedene Eisentransportsysteme werden unterschieden, die je nach Verfügbarkeit von Eisen im Medium verwendet werden. In eisenreichem Medium wird das sog. "low-affinity"-Transportsystem, in eisenlimitiertem Medium das sog. "high-affinity"-Transportsystem induziert. Genetische Studien haben die Gene der beiden Eisentransportsysteme identifiziert (Askwith, 1996). Ein nicht-ATP-abhängiger Transmembrantransporter (Fet4p) wurde als Hauptkomponente des "low-affinity"-Transportsystems beschrieben (Dix et al., 1994). Der "high-affinity"-Transporter setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der Kupfer-haltigen Eisenoxidase Fet3p und dem Eisentransporter Ftr1p (Askwith and Kaplan, 1998). Der Transkriptionsfaktor Aft1p reguliert die Synthese dieser Gene, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind. So besitzen *FRE1*, *FRE2*, *FET3* und *FET4* je ein Bindemotiv für Aft1p (Yamaguchi-Iwai et al., 1996).

Das in höheren Eukaryonten vorkommende Eisentransportmolekül Transferrin und das Eisenspeichermolekül Ferritin kommen in der Hefe nicht vor.

Das meiste zelluläre Eisen wird in den Mitochondrien gebraucht. Dort wird es für die Hämbildung durch die Ferrochelatase und für viele Eisen-Schwefel(Fe/S)-Proteine benötigt. Wie das Eisen in die Mitochondrien gelangt, ist erst wenig aufgeklärt, vor allem deshalb, weil

das Transporterprotein noch unbekannt ist. Durch *in vitro* Studien konnte der Import von reduziertem Eisen über die Innenmembran zur Ferrochelatase in der mitochondrialen Matrix verfolgt werden (Lange et al., 1999). Ferrochelatase baut Eisen in Protoporphyrin zur Synthese von Häm ein. Eisen wird nur in reduzierter Form über die mitochondriale Innenmembran transportiert und benötigt für den Import als Energiequelle ein Membranpotential. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Hämsynthese simultan zum Eisentransport über die Innenmembran erfolgt. Man muß daher annehmen, daß der Eisentransporter und die Ferrochelatase zur Koordination des Eisentransports miteinander kooperieren. Die Innenmembranproteine Mmt1p und Mmt2p wurden ursprünglich zwar als Eisentransporter beschrieben (Li and Kaplan, 1997). Diese Funktion scheint jedoch fraglich, da in Abwesenheit dieser Proteine ein normaler Eisentransport zur Ferrochelatase beobachtet wurde (Lange et al., 1999) und auch mitochondriale Fe/S-Proteine in unveränderter Konzentration vorhanden waren.

### **1.2.2 Das Frataxinhomolog ist wichtig für die Eisen-Homöostase der Zelle**

Neben dem ABC-Transporter Atm1p wurde das mitochondriale, lösliche Protein Yfh1p als wichtiges Glied für die Eisenhomöostase der Hefezelle bestimmt (Foury and Cazzalini, 1997; Wilson and Roof, 1997). Yfh1p ist ein Homologes zu Frataxin aus Säugetierzellen. Das Fehlen von Frataxin wurde als Ursache der neurodegenerativen Erkrankung Friedreich's Ataxia identifiziert (Campuzano et al., 1996). Eine Depletion des humanen Frataxins bzw. die Deletion des Hefegens *YFHI* führen zu einer starken Anreicherung von freiem Eisen in den Mitochondrien. Weiterhin führt die *YFHI* Deletion zur Schädigung der mtDNA und dadurch zur Zerstörung der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien.

### **1.2.3 Funktion von Fe/S-Proteinen in der Zelle**

Eisen kommt in der Zelle in drei verschiedenen Zuständen vor:

a) als Metallzentrum in Hämproteinen, wie z.B. dem Cytochrom c, b) in Fe/S-Proteinen, wie z.B. in Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Tab.1) und c) als "freies" Eisen, das vermutlich an niedermolekulare Chelatoren gebunden ist. Die Funktion von Fe/S-Proteinen soll näher besprochen werden.

Proteine mit Fe/S-Clustern als Cofaktoren sind an einer Reihe von metabolischen Prozessen beteiligt, und sie dienen als Elektronenüberträger in vielen Redoxreaktionen (Cammack, 1992; Johnson, 1998). Die Struktur und Funktion dieser Cluster und der assoziierten Proteine wurden in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv untersucht (Beinert et al., 1997). Am

häufigsten enthalten diese Proteine [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster. Diese Cluster besitzen Elektronentransferfunktion, können als katalytische Zentren arbeiten oder als Sensor für Eisen und Sauerstoff dienen (Beinert et al., 1997). Über den chemischen Einbau eines Fe/S-Clusters in Apoproteine ist einiges bekannt. So konnte *in vitro* die Bildung verschiedener Fe/S-Cluster aus Fe(II)- und Sulfidionen mit gereinigten Apoproteinen nachvollzogen werden (Beinert et al., 1997).

Die meisten bekannten Fe/S-Proteine der eukaryontischen Zelle sind in den Mitochondrien lokalisiert. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die löslichen Enzyme Aconitase, Dihydroxysäure-Dehydratase und Biotinsynthase, ebenso wie die Atmungskettenproteine Succinat-Dehydrogenase, das Rieske-Fe/S-Protein und das Ferredoxin (Tab. 1).

In letzter Zeit wurden auch einige Fe/S-Proteine identifiziert, die außerhalb der Mitochondrien lokalisiert sind. Eines der bestcharakterisierten Beispiele ist das "Eisen-Regulator-Protein 1" (IRP1), welches eine entscheidende Komponente bei der Regulation der Eisenaufnahme in höhere eukaryontische Zellen darstellt (Hentze and Kuhn, 1996; Rouault and Klausner, 1996). In Hefe übt die Isopropylmalat-Isomerase Leu1p (Kohlhaw, 1988), ein Homolog zu IRP1, eine Funktion bei der Biosynthese der Aminosäure Leucin aus. Andere bekannte extra-mitochondriale Fe/S-Proteine sind am DNA/RNA-Metabolismus (z.B. Endonuklease III und ein "Inhibitor von RNase L") beteiligt (Tab. 1). Es ist sehr wahrscheinlich, daß zahlreiche extra-mitochondriale Fe/S-Proteine noch unbekannt sind. Zum einen mag dies daran liegen, daß man nur wenige verlässliche Konsensussequenzen für die Bindung von Fe/S-Clustern kennt. Zum anderen ist es analytisch sehr anspruchsvoll, Fe/S-Cluster in Proteinen zu detektieren, da eine verhältnismäßig große Menge des Proteins benötigt wird.

**Tab.1. Eisen-Schwefel-Proteine in der Hefezelle und ihre Lokalisierung**

Mitochondrien	Cytosol	Nucleus
Aconitase (Aco1p, Aco2p)	Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p)	Endonuklease III (Ntg2p)
Homoaconitase (Lys4p)	Sulfitreduktase (Ecm17p)	
Dihydroxysäure-Dehydratase (Ilv3p)	Glutamatsynthase (Glt1p)	
Biotinsynthase (Bio2p)	Inhibitor der RNase L (Rli1p)	
Succinat-Dehydrogenase- Untereinheit 2 (Sdh2p)		
Rieske-Fe/S-Protein		
Ferredoxin (Yah1p)		
Liponsäuresynthase (Lip5p)		

Wie werden nun Fe/S-Cluster in einer lebenden Zelle gebildet und in Apoproteine eingebaut? Erst kürzlich begann man Antworten auf diese wichtigen biochemischen Fragen zu erhalten. Über die Komponenten und Mechanismen, die an der Fe/S-Proteinbiosynthese in der lebenden Zelle beteiligt sind, lagen zu Beginn dieser Arbeit nur Informationen aus Prokaryonten vor. Die ersten Erkenntnisse zur Bildung von Fe/S-Clustern wurden im Rahmen von Untersuchungen zum Zusammenbau der Nitrogenase erhalten, einem Enzym in Stickstoff-fixierenden Bakterien (z.B. *A. vinelandii*).

#### 1.2.4 Das bakterielle *nif*-Operon codiert Komponenten für die Biogenese der Nitrogenase

Die Nitrogenase katalysiert die ATP-abhängige Reduktion von Stickstoff zu Ammonium. Das Enzym ist aus zwei Komponenten aufgebaut, dem Eisen- und dem Molybdän-Eisen-Protein. Beide Komponenten enthalten Metallcluster. Die Eisen-Komponente stellt ein Homodimer dar, das ein einzelnes [4Fe-4S]-Cluster enthält (Hausinger and Howard, 1983; Georgiadis et al., 1992). Das Molybdän-Eisen-Protein ist ein Heterotetramer, das mehrere [4Fe-4S]- und FeMo-Cofaktoren enthält (Kim and Rees, 1992).

Defekte in der Bildung der Nitrogenase führten zur Identifikation einer Anzahl an Genen (als *nif* Gene bezeichnet; *nif* = "nitrogen fixation") (Cannon et al., 1977; Dean et al., 1993; Peters et al., 1995). Dabei handelt es sich um 15 Gene, die in dem sog. *nif*-Operon geclustert vorliegen (Jacobson et al., 1989). Die Gene des Clusters codieren für Proteine, die die

Synthese und die Reifung der Nitrogenase bestimmen. Darunter sind auch Proteine, die an der Biogenese der Fe/S-Cluster der Nitrogenase beteiligt sind. NifS als Cysteindesulfurase gehört beispielsweise dazu sowie NifU als eisenbindendes Protein.

### 1.2.5 Das bakterielle *isc*-Operon

Kürzlich wurde bekannt, daß alle bekannten prokaryontischen Genome Gene enthalten, die homolog zu denen des *nif*-Operons sind. Die entsprechenden Gene sind im sog. *isc*-Operon gesammelt (*isc* = "iron sulfur cluster assembly"). Die codierten Proteine üben eine wichtige Funktion bei der Biosynthese von Fe/S-Proteinen aus (Zheng et al., 1998). Im *isc*-Operon von *A. vinelandii* liegen die Gene *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* und *fdx* in einem Cluster vor (Zheng et al., 1998). Für einige Genprodukte des *isc*-Operons weiß man schon die Funktion bzw. kann ihre zelluläre Rolle anhand von Homologien zu anderen Proteinen vorhersagen. IscS fungiert als L-Cysteindesulfurase und ist homolog zum NifS (Zheng et al., 1998). *IscU* codiert für ein Homolog zur N-terminalen Region von NifU. NifU wurde als eisenbindendes Protein in *A. vinelandii* beschrieben (Yuvaniyama et al., 2000). IscA ist homolog zum nifORF6 Polypeptid. Zusätzlich zu diesen Nif-ähnlichen Proteinen codiert die *isc*-Genregion für die Hsc66 (HscA)- und Hsc20 (HscB)-Chaperone und ein [2Fe-2S]-Cluster enthaltendes Ferredoxin (Vickery et al., 1997; Ta et al., 1992; Zheng et al., 1998). Während das *nif*-Operon spezifisch für die Biogenese der Nitrogenase in Stickstoff-fixierenden Organismen verantwortlich ist, scheint das *isc*-Operon eine generelle Rolle bei Bildung und Reparatur von Fe/S-Proteinen in der Zelle zu haben (Zheng et al., 1998). Das *isc*-Operon liefert die Grundausstattung an Fe/S-Cofaktoren für Apoproteine und ist wahrscheinlich in allen Bakterien mit dieser Funktion behaftet.

Homologien zum *isc*-Operon von *A. vinelandii* findet man nicht nur in Bakterien, sondern auch im Genom der Hefe oder des Menschen. Dies bedeutet, daß dieses System der Fe/S-Cluster-Biogenese von Prokaryonten bis zu höheren Eukaryonten konserviert ist. Die Homologien von Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* zu *nif* und *isc* Operon-codierten Proteinen hat man erst in den letzten zwei Jahren erkannt (Strain et al., 1998; Kispal et al., 1999). Die Proteine der Hefe werden nun mit Nfs1p, Isu1p, Isu2p, Isa1p, Isa2p, Nfu1p, Yah1p, Ssq1p und Jac1p bezeichnet. Ein zentrales Thema dieser Arbeit war, den Prozeß der Fe/S-Cluster Biosynthese in *S. cerevisiae* besser zu verstehen.

### 1.3 Proteine, die in Wechselwirkung mit Atm1p stehen

Der ABC-Transporter Atm1p stellt den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Zu Beginn der Arbeit war die Funktion des Proteins in der Zelle noch nicht bekannt. Um die Funktion aufzuklären, sollten unter anderem Proteine untersucht werden, für die eine Wechselwirkung mit Atm1p beschrieben war. Aus einer genetischen Interaktion mit Atm1p wurden die Proteine Leu5p und Bat1p identifiziert. Bisherige Erkenntnisse zu diesen Proteinen sollen im folgenden dargestellt werden.

#### 1.3.1 Die Transaminasen Bat1p und Bat2p

Bat1p wurde auf zwei verschiedenen Wegen identifiziert. Zum einen wurde Bat1p als “high copy suppressor“ einer temperatursensitiven *ATM1*-Mutante gefunden. Temperatursensitive *ATM1*-Mutanten sind bei erhöhten Temperaturen in ihrem Wachstum gestört, da das mutierte Atm1p abgebaut wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Zellen bei Überexpression von Bat1p vor diesem Wachstumsdefekt bewahrt werden.

Zum anderen wurde Bat1p aufgrund seiner großen Homologie zu ECA39 aus der Maus identifiziert (Schuldiner et al., 1996). ECA39 wird in der frühen Embryogenese und in einigen Tumorzellen einschließlich Mauseratocarcinomazellen stark exprimiert (Niwa et al., 1990; Benvenisty et al., 1992). Es wurde angenommen, daß die Expression von ECA39 durch das c-myc-Protein reguliert wird (Benvenisty et al., 1992). Nähere Untersuchungen in einer Vielzahl von Tumorzellen deuteten jedoch an, daß die Kontrolle der ECA39 Expression viel komplexer ist und die Proteinmenge nicht unter direkter Kontrolle des c-Myc-Oncoproteins steht (Ben-Yosef et al., 1998).

Bat1p ist in der Aminosäuresequenz zu 77% identisch zu einem homologen Protein der Hefe, dem sog. Bat2p. Eine schwache Sequenzidentität (24%) besteht zwischen den beiden Bat Proteinen und IlvE aus *E. coli*. Eine größere Homologie (50% Aminosäureidentität) existiert zwischen den Bat Proteinen und den ECA39 Proteinen aus Mensch, Maus, Ratte und der Pflanze *Arabidopsis thaliana*.

Die Bat Proteine fungieren als Transaminasen der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin in der Zelle (Abb. 3). Sie katalysieren damit den letzten Schritt der Biosynthese dieser Aminosäuren. Die beiden Proteine sind in zwei unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert, Bat1p in der mitochondrialen Matrix, Bat2p im Cytosol (Kispal et al., 1996) (Abb. 3). In den Mitochondrien finden die irreversiblen Anfangsschritte der Aminosäuresynthese bis zu den  $\alpha$ -Ketosäuren statt. Die  $\alpha$ -Ketosäuren



### 1.3.2 Bisherige Erkenntnisse über Leu5p

Leu5p ist ein weiterer Interaktionspartner von Atm1p. Die Deletion von *LEU5* in einer  $\Delta$ atm1-Zelle führt bei erhöhten Temperaturen zu einer synthetischen Letalität. Leu5p wurde 1983 im Zusammenhang mit der Analyse der Leucinbiosynthese identifiziert und mit dieser auch funktionell in Verbindung gebracht (Baichwal et al., 1983). Daher soll im folgenden auf den Leucinbiosyntheseweg eingegangen werden.

Der erste spezifische Schritt der Leucinbiosynthese kann in der Matrix oder im Cytosol erfolgen, während die beiden abschließenden Schritte ausschließlich im Cytosol durchgeführt werden (Abb. 3). Die  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (Leu4p) katalysiert die Synthese von  $\alpha$ -Isopropylmalat, und zwar ausgehend von  $\alpha$ -Ketoisovalerat (Abb. 3) (Beltzer et al., 1988; Ryan et al., 1973).  $\alpha$ -Ketoisovalerat wird auch für die Synthese von Valin verwendet.  $\alpha$ -Isopropylmalat wird durch die Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) und die  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2p) im Cytosol zu  $\alpha$ -Ketoisocaproat umgesetzt (Satyanarayana et al., 1968). Leu5p wurde aufgrund von Defekten in der Leucinbiosynthese identifiziert. Hefezellen mit Deletionen in *LEU4* und *LEU5* ( $\Delta$ leu4 $\Delta$ leu5-Zellen) sind nicht in der Lage, auf Medium ohne Leucin zu wachsen (Chang et al., 1984). Bei Einzeldelation in *LEU4* oder *LEU5* wurde keine Leucinauxotrophie gefunden. Daher wurde zunächst vermutet, daß Leu5p ein Isoenzym zu Leu4p ist und als  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (IPMS) funktioniert. Diese Hypothese wurde jedoch durch die Sequenzierung von *LEU5* recht unwahrscheinlich, da das Gen ein Membranprotein codiert. Kürzlich wurde Leu9p als zweite mitochondriale IPMS identifiziert (Pelzer and Lill, unveröffentlicht). Leu9p ist für die IPMS Aktivität (ca. 20% relativ zu Wildtyp-Zellen) eines  $\Delta$ leu4-Stammes verantwortlich.

## 1.4 Aufgabenstellung

Eine zentrale Frage zu Beginn der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des mitochondrialen ABC-Transporters Atm1p zu bestimmen. Da Atm1p-defiziente Zellen auxotroph für Leucin sind, sollte zunächst der Grund dieses Wachstumsphänotyps bestimmt werden, indem die spezifischen Schritte der Leucinbiosynthese untersucht werden. Es soll schon vorweggenommen werden, daß über diese Messungen gefunden wurde, daß Atm1p in der Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine eine Rolle spielt. Die in den Mitochondrien synthetisierten Fe/S-Cluster werden über Atm1p den extra-mitochondrialen Apoproteinen zur Verfügung gestellt. Dieser wichtige Prozeß der mitochondrialen Fe/S-



Cluster Biogenese wirft viele Fragen auf, zu denen im Rahmen dieser Arbeit Antworten gesucht werden sollten. Daher wurden noch andere Proteine untersucht, die an der Reifung von Fe/S-Proteinen beteiligt sind bzw. die in Wechselwirkung mit Atm1p stehen.

#### a) Analyse der zweiten Funktion der Bat Proteine

Für die Proteine Bat1p und Bat2p wurde die Funktion als Transaminase verzweigt-kettiger Aminosäuren in der Literatur beschrieben (s. 1.3.1). Da Bat Protein-depletierte Zellen ein vermindertes Wachstum auf Glukose-haltigen Medien zeigen (Kispal et al., 1996), obwohl den Zellen genügend verzweigt-kettige Aminosäuren im Wachstumsmedium zur Verfügung stehen, wurde eine zweite Funktion der Bat Proteine in der Zelle postuliert. Dies sollte mit weiteren Untersuchungen gefestigt werden. Zusätzlich sollte getestet werden, ob das Bat Homologe IlvE aus *E. coli* auch zwei Funktionen in der Zelle ausübt. Für die Bat Proteine sollte weiterhin untersucht werden, ob die zweite Funktion in Zusammenhang mit der Reifung von Fe/S-Proteinen stehen könnte. Diese Vermutung ergibt sich aus der Beobachtung, daß *BATI* über eine genetische Interaktion mit *ATMI* identifiziert wurde (siehe 1.3.1).

#### b) Die Bedeutung der Isu Proteine für die Biosynthese zellulärer Fe/S-Proteine

Es konnte gezeigt werden, daß das Protein Nfs1p als essentielles Protein der Mitochondrien an der Fe/S-Cluster-Bildung beteiligt ist (Kispal et al., 1999). Nfs1p liefert als Cysteindesulfurase den Schwefel für die Bildung der Fe/S-Cluster. Daraus erwächst die Frage, welches mitochondriale Protein Eisen transient binden kann, um es für die Fe/S-Cluster Biogenese verfügbar zu machen. Da die bakteriellen Proteine NifU/IscU starke Ähnlichkeiten zu den Hefeproteinen Isu1p und Isu2p aufweisen, wurde vermutet, daß auch diese Proteine eine eisenbindende Funktion im Prozeß der Fe/S-Cluster Biogenese übernehmen könnten. Genauso wie NifU enthalten auch Isu1p und Isu2p drei konservierte Cysteine, die Eisen binden könnten. Daher sollten die Isu Proteine zunächst in der Zelle lokalisiert werden, und anschließend sollte untersucht werden, ob die beiden Proteine an der Fe/S-Cluster Biogenese beteiligt sind. Hier sollte zwischen der Reifung mitochondrialer und extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine unterschieden werden.

#### c) Die Lokalisierung und Rolle der ABC-Transporter Mdl1p und Mdl2p

Bei der Entschlüsselung der Funktion von Atm1p stellte sich die Frage nach der Existenz weiterer mitochondrialer ABC-Transporter. Ein Sequenzvergleich von Atm1p mit homologen ABC-Transportern der Hefe lieferte die Sequenzen zweier Proteine mit mitochondrialer Präsenz. Dabei handelt es sich um die Proteine Mdl1p und Mdl2p (Dean et al., 1994). Da Atm1p nicht essentiell für die Hefezelle ist, obwohl extra-mitochondrial essentielle Fe/S-Proteine existieren, wird vermutet, daß die Mdl Proteine eine ähnliche Funktion wie Atm1p

haben und damit den nicht-essentiellen Charakter von Atm1p erklären können. Die Lokalisierung und die Funktion der Mdl Proteine sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

d) Die Lokalisierung und funktionelle Rolle des Leu5p

Da zwischen *LEU5* und *ATM1* eine genetische Interaktion besteht, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, das Protein Leu5p funktionell zu charakterisieren. Ein Sequenzvergleich konnte zeigen, daß Leu5p in die Proteinklasse der Carrier einzuordnen ist. Mit diesem Ansatz sollte Leu5p als Membranprotein in der Zelle lokalisiert werden. Um die genaue Funktion von Leu5p zu bestimmen, wurde bei den Untersuchungen an den in der Literatur beschriebenen Zusammenhang von Leu5p und Leu4p angeknüpft und diese Verbindung auf biochemischer Ebene untersucht.

Zusätzlich zu Carrierproteinen der Hefe ist Leu5p homolog zu dem 'Graves` disease protein' (hGP) des Menschen. Dieser Befund machte es interessant zu untersuchen, ob in der Hefezelle exprimiertes hGP die Funktion von Leu5p ersetzen kann.

## 2. Methoden

### 2.1 Methoden der Molekularbiologie

#### 2.1.1 Präparation von DNA

##### 2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinen Mengen ("Mini-Präparation") erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) in einer modifizierten Form. Bei der Präparation größerer Plasmid-Mengen ("Midi-Präparation") wurde die DNA zusätzlich über eine Anionenaustausch-Säule gereinigt (Firma Genomed).

##### a) Mini-Präparation

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden Bakterien aus 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp für 30 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 150 µl GTE-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150 µl 0,2 M NaOH, 1% SDS wurden die Zellen lysiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde mit 200 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,0, neutralisiert, und nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 Upm der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wurde 1 ml 100% Ethanol zugegeben und 2 min zur Fällung der DNA bei RT inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 13 000 Upm, RT, Tischzentrifuge) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 min, 13 000 Upm, RT). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

##### b) Midi-Präparation

Die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des "JETSTAR Plasmid Kit" der Firma Genomed. Eine Anionen-Austausch-Säule wurde mit 10 ml Lösung E4 äquilibriert. Die Bakterien aus 50 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp wurden durch Zentrifugation geerntet (5 min, 5000 Upm, RT, Beckman-JA10-Rotor). Die Zellen wurden in 4 ml Lösung E1 resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 und 5 min Inkubation bei RT lysiert. Das Zellysate wurde durch Zugabe von 4,4 ml Lösung E3 neutralisiert. Die ausgefällte chromosomale DNA und die Zellproteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 15 000 Upm, RT) sedimentiert und der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die so präparierte Säule wurde zweimal mit je 10 ml Lösung E5 gewaschen

und anschließend mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol (-20°C) und Zentrifugation (30 min, 15 000 Upm, 4°C, Tischzentrifuge) aus dem Eluat gefällt, anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.1.1.2 Isolierung von DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Präparation von genomischer Hefe-DNA erfolgte nach einem in der Literatur beschriebenen Protokoll in abgeänderter Form (Rose et al., 1993). 10 ml Übernachtskultur (in YPD) wurden abzentrifugiert und in 0,9 ml Sorbitol-Lösung resuspendiert. Nach einer 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge 20 sec bei 13 000 Upm zentrifugiert, das Pellet in 0,5 ml Lysepuffer aufgenommen und 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 80 µl 5 M Kaliumacetat und einer Inkubation von einer Stunde auf Eis wurde die Probe für 15 min bei 13 000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltene DNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol gefällt und die Suspension anschließend für 20 sec zentrifugiert. Dann wurde die DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung weiter gereinigt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 0,5 ml TE mit 25 µg RNase resuspendiert, für 30 min bei 37°C inkubiert und bei -20°C eingefroren.

## **2.1.2 Reinigung und Analyse von DNA**

### **2.1.2.1 Phenolextraktion und Ethanol-fällung**

Durch Phenolextraktion wurden Proteine, die sich an der Phenol-Chloroform-Phasengrenze anreichern, aus der DNA-haltigen Lösung entfernt. Dazu wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt (Sambrook et al., 1989). Durch Präzipitation mit Ethanol wurde die DNA konzentriert und von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNA-Lösung auf 0,3 M Natriumacetat (pH 5,8) eingestellt. Anschließend wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol für 15 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 13 000 Upm zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% (v/v) Ethanol und Trocknen wurde die DNA in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.1.2.2 Agarosegelelektrophorese von DNA**

Diese Methode kann sowohl zur Analyse als auch zur präparativen Reinigung von DNA genutzt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden die Agarosegele mit 0,5 bis 2,0% (w/v) Agarosegehalt in 1x TAE-Puffer hergestellt. Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer in der Mikrowelle gekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) versetzt und die Gellösung in eine mit Probenaschenkamm versehene Flachbettkammer gegossen. Nachdem die Gellösung erstarrt war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben wurden in 10x Agarosegel Probenpuffer aufgenommen und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen von Spannungen zwischen 90 bis 150 Volt. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht (265 nm oder 366 nm) sichtbar gemacht.

### **2.1.2.3 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Puffer und Lösungen sind im Kit enthalten.

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und mit drei Volumen QG-Puffer (siehe QIAquick Gel Extraction Kit) versetzt. Das Gelstück wurde bei 50°C gelöst und auf eine QIAquick Säule geladen. Diese Säule wurde in einem Reaktionsgefäß für eine Minute bei 13 000 Upm zentrifugiert. Die erste Fraktion wurde verworfen. Zum Waschen wurden 750 µl PE-Puffer hinzugegeben und erneut eine Minute zentrifugiert. Diese Fraktion wurde wieder verworfen. Um alle Rückstände zu entfernen, wurde nochmals zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die DNA mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

## **2.1.3 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.1.3.1 Restriktionsspaltung von DNA**

DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firmen Gibco/BRL, Appligene, New England Biolabs und Boehringer Mannheim gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern bei einer Enzymkonzentration von ca. 2-3 U pro µg DNA für 1,5 h gespalten.

### **2.1.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase**

Zur Dephosphorylierung der Enden der Vektor-DNA vor Ligationsreaktionen wurde Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm verwendet (Calf Intestine Phosphatase, CIP). Es wurden 5-10 µg DNA in 50 µl CIP-Puffer mit 1 U Enzym bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde abermals 1 U Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 35 µl H<sub>2</sub>Odd, 5 µl 10% SDS und 10 µl 10x STE-Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei 65°C wurde zweimal mit Phenol extrahiert (2.1.2.1).

### **2.1.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma Gibco/BRL mit dem mitgelieferten 5x Ligationspuffer verwendet. Es wurden 5 Weiss-Units Enzym für maximal 100 ng DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Das zu inserierende DNA-Stück lag in der Regel in einem zwei- bis dreifachen molaren Überschuß zum Vektor vor. Es wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

## **2.1.4 Transformation von Mikroorganismen mit rekombinanter DNA**

### **2.1.4.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde durch Elektroporation mit einem Bio-Rad "Gene Pulser" nach Angaben des Herstellers transformiert (Pulse Controller Instruction Manual, BioRad). 500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5-0,8 kultiviert. Dann wurde die Kultur auf Eis gekühlt, und alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, Beckman-JA10-Rotor) geerntet, dreimal mit 10% (v/v) Glycerin gewaschen, in 0,5 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Portionen bei -70°C gelagert.

40 µl Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit der DNA (1-2 µl oder 1 ng Plasmid-DNA) in eine Elektroporations-Küvette (0,2 cm) gegeben. Zur Transformation der Bakterien wurde die Suspension mit einem Stromstoß behandelt (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms). Daraufhin wurden die Bakterien für 30-60 min bei 37°C unter Schütteln in SOC-Medium inkubiert, durch eine kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge gesammelt, in 200 µl Medium resuspendiert, auf eine LB-Amp-Platte ausplattiert und über

Nacht bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in 50% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

### **2.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur exponentiellen Vervielfältigung definierter Bereiche doppelsträngiger DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion werden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, die komplementär zu den beiden 5'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Stückes sind, sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B. die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al., 1985). Zuerst wird die zu amplifizierende DNA denaturiert, so daß die Oligonukleotide in der Lage sind, an ihre komplementären Gegenstücke zu hybridisieren. Durch die Taq-Polymerase werden die beiden Einzelstränge zu Doppelsträngen aufgefüllt. Folgende Komponenten werden für eine PCR zusammengegeben:

200 ng Plasmid

je 1 µl Primer 1 und 2 (0,1 nM)

10 µl 10x Standard Reaktions-Puffer mit Mg<sup>2+</sup>

1 µl dNTP Mix (je 10 mM der Tetranatriumsalze von dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

5 U Taq-Polymerase

Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt.

Die Probe wurde in den Thermocycler gegeben und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Schritt: 3 min bei 94°C

2. Schritt: 1 min bei 94°C (Denaturierung)

(30 Zyklen) 1 min bei 45-60°C (Annealing) (je nach Basenzusammensetzung der DNA)

0,5-1 min bei 72°C (Elongation) (je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments)

3. Schritt: 5 min bei 72°C

Nach der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert und das PCR-Produkt mittels Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (s. 2.1.2.1).

**2.1.4.3 Automatisches Sequenzieren von DNA**

Die Sequenzierung von DNA wurde mit dem "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" und dem ABI PRISM 377 DNA-Sequenzierapparat von Perkin Elmer durchgeführt. Dafür wurde ein 5%iges Polyacrylamid-7M Harnstoff-Gel verwendet, dessen Lauflänge 36 cm, Dicke 0,2 mm und Laufzeit 10 Stunden betrug. Die Proben wurden in die Taschen eines Haifischzahn-Kammes (36 Taschen) aufgetragen.

Das Prinzip dieser Sequenziermethode beruht auf der Markierung der zu sequenzierenden DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen. Jedes der vier Nukleotide ist mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die modifizierten Nukleotide werden für eine PCR verwendet, in der die zu sequenzierende DNA als Matrize dient. Die DNA muß in möglichst reiner Form vorliegen. Für die Sequenzierung von Vektor-DNA wird die DNA daher mit Hilfe des "QIAprep Spin Miniprep Kit" gereinigt.

Das PCR-Produkt wird nach Ethanol-fällung auf das Sequenziergel aufgetragen. Nach Auftrennung der DNA-Stücke werden die verschiedenen Fluorophore durch einen Laserstrahl im Sequenziergerät angeregt und die Signale aufgezeichnet.

**PCR-Ansatz:**

4 µl "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Ampli Taq DNA Polymerase FS" (Perkin Elmer)

1 µg DNA

1 µl 10 pmol Primer

ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

25 Zyklen      30 sec bei 96°C

                 15 sec bei 55°C

                 4 min bei 60°C

Zur Fällung der DNA wurden 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 10 µl 3 M NaAcetat pH 5,2 und 250 µl 100% Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde 15 min bei 13 000 Upm und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals 15 min bei 13 000 Upm und RT zentrifugiert. Danach wurde das Pellet bei RT getrocknet und schließlich in 4 µl Sequenzierungs-Auftragspuffer für automatische Sequenzierungen aufgenommen. Vor dem Auftragen wurde die Probe 2 min bei 95°C denaturiert und dann 2 µl auf das 5%ige Polyacrylamid-7M Harnstoff-Gel geladen.



## 2.2 Methoden der Hefegenetik

### 2.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte wie von (Rose et al., 1993; Guthrie and Fink, 1991) beschrieben. Das Standard-Medium war YPD (2.5.5). Um die Expression von Genen zu induzieren, die unter Kontrolle eines Gal-Promotor waren, wurde YPGal-Medium (2.5.5) verwendet. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurde SD-Medium (2.5.5) verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend mit 200 mg/l Adenin, Uracil, Tryptophan, Histidin, Leucin und/oder Lysin ergänzt war. Für die Isolierung von Mitochondrien für Enzymmessungen wurde Hefe in Laktat-Medium (2.5.5) kultiviert. Die Standard-Temperatur für die Kultivierung von *S. cerevisiae* war 30°C. Die Hefestämme wurden bis zu 2 Monate auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Für längere Lagerung wurden sie in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C eingefroren.

### 2.2.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden mit der sogenannten Lithiumacetat-Methode transformiert (Gietz et al., 1992). Eine 50 ml Hefe-Kultur in YPD-Medium wurde unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 5000 Upm, RT, Tischzentrifuge) gesammelt, mit 0,1 molarem Lithiumacetat gewaschen, erneut zentrifugiert, in 1 ml 0,1 molarem Lithiumacetat resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 50 µl dieser Suspension wurden mit 1 µg einer zu transformierenden DNA (Vektor-DNA oder lineares DNA-Stück), 5 µg denaturierter Lachs-Spermien-DNA (zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert), 36 µl 1 M Lithiumacetat und 240 µl 50% (w/v) PEG (Polyethylenglycol)4000-Lösung zusammengegeben und für 45 min bei 30°C geschüttelt. Nach einem anschließenden Hitzeschock von 30 min bei 42°C wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation gesammelt, in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und mindestens eine Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation gesammelt, vom Überstand 800 µl entfernt, die Zellen in den verbleibenden 200 µl resuspendiert und auf Agarplatten mit selektivem Medium ausplattiert.

Nach drei Tagen wurden zwei große Kolonien auf Selektivmedium nochmals ausgestrichen und ihr Wachstum entsprechend der auxotrophen Marker oder Resistenzmarker überprüft. Die Zellen wurden anschließend aufgeschlossen und ein Extrakt gewonnen (s. 2.3.5). Über SDS-

PAGE (s. 2.3.7.2) und Immundekorations-Analyse (s. 2.4.1) mit einem spezifischen Antikörper wurde die erfolgreiche Transformation überprüft, alternativ konnte sie auch über PCR getestet werden (z.B. zum Nachweis der erfolgreichen Deletion eines Gens im Hefegenom, s. 2.2.5).

### **2.2.3 Sporulation diploider Hefestämme**

Um diploide Stämme zur Sporulation zu induzieren, wurde Minimal-Sporulations-Medium (2.5.5) verwendet, das mit  $\frac{1}{4}$  der für SD-Medium angegebenen Menge von Aminosäuren supplementiert war. Die Zellen wurden auf diesem Medium ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Mikroskopisch konnte das Ausmaß der Ascibildung verfolgt werden.

### **2.2.4 Tetradenanalyse**

Die Tetradenanalyse ermöglicht eine Trennung der vier Tochtersporen nach Meiose einer diploiden Hefezelle. Wurde zuvor ein Gen mit einem Auxotrophiemarker ersetzt (s. 2.2.5), so können über die Tetradenanalyse Zellen erhalten werden, die entweder ein Wildtyp- oder ein mutiertes Allel enthalten. Diploide Hefestämme wurden auf Agarplatten mit Minimal-Sporulations-Medium inkubiert, bis sich nach einigen Tagen aus 10-50% der Zellen Ascii gebildet hatten. Um die Zellwand der Ascii abzubauen, ohne dabei die Sporen freizusetzen, wurden die Zellen in H<sub>2</sub>O aufgenommen, so daß die Suspension eine optische Dichte zwischen 0,5 und 1 erreichte, für 10 min mit 250 µg/ml Zymolyase bei RT inkubiert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und mit einer Impföse im oberen Viertel einer YPD-Agarplatte aufgetragen. Mit einer durch Mikromanipulator bewegten Glasnadel wurden die Wände einer Ascusspore zerstört. Die einzelnen Sporen wurden auf einer YPD-Agarplatte innerhalb eines Koordinatensystems geordnet abgelegt. Nachdem die Sporen Kolonien gebildet hatten (2-4 Tage Inkubation bei 30°C), wurde der Phänotyp und die Aufspaltung von Auxotrophie-Markern auf selektiven Medien untersucht.

### 2.2.5 Deletion eines Gens im Hefegenom

Bei der Deletion eines Hefegens wird die entsprechende DNA-Region durch ein DNA-Stück ersetzt, welches einen Resistenzmarker (kanMX4 Kanamycin, nach Wach et al., 1994) oder einen Auxotrophiemarker (*HIS3* Gen aus *S. pombe*) besitzt. Dieses DNA-Stück ist flankiert von zwei Bereichen, die zu dem zu deletierenden Bereich homolog sind, und wurde mittels PCR hergestellt. Die Transformation mit diesem DNA-Stück führt in einigen wenigen Zellen zu dessen Integration ins Hefegenom durch homologe Rekombination. Dadurch wird das zu disruptierende Gen durch ein Markergen ersetzt, das zur Selektion dieser Zellen durch Wachstum auf Selektivmedien verwendet werden kann.

## 2.3 Methoden der Biochemie

### 2.3.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

#### 2.3.1.1 *In vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde das Plasmid pGEM4 verwendet, in das die codierende Sequenz für das entsprechende Vorstufenprotein inseriert wurde. Die Transkription wurde durch einen SP6-Promotor gesteuert (Söllner et al., 1991).

Ein Transkriptionsansatz setzte sich zusammen aus: 10 µl 5x Transkriptions-Puffer, 10 µl rNTP Mix 2,5 mM, 13,9 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl DTT 0,1 M, 5 µg DNA, 2,6 µl m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (Pharmacia), 2 µl RNasin und 1,5 µl SP6-Polymerase. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde nach Zugabe von 5 µl 10 M LiCl und 150 µl 100% Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt, zentrifugiert (20 000 Upm, 4°C, 10 min, Beckman OPTIMA TL Ultrazentrifuge) und mit 70% (w/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet, 40 U RNasin zugegeben, die RNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in Aliquots bei -80°C gelagert.

#### 2.3.1.2 *In vitro*-Translation von mitochondrialen Vorstufenproteinen

Ein Standard-Translationsansatz setzte sich zusammen aus: 100 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 40 U RNasin, 25 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin (10 mCi/ml), 25 µl RNA und 20 µl H<sub>2</sub>O. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Der Einbau radioaktiven Methionins wurde anschließend durch Zugabe von 17 µl 0,2 M nicht-radioaktivem Methionin gestoppt. Das

gesamte Reaktionsgemisch wurde zu 28,3  $\mu$ l 1,5 M Sucrose gegeben und 30 min bei 45 000 Upm und 4°C zur Entfernung der Polysomen zentrifugiert. Der Ansatz wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.3.2 Isolierung von Mitochondrien und postmitochondrialem Überstand (PMS) aus *Saccharomyces cerevisiae***

Eine Aufreinigung der Mitochondrien erfolgte in modifizierter Form nach einer in der Literatur beschriebenen Methode (Daum et al., 1982 Diekert et al., 2000). Die Anzucht der Zellen erfolgte in YPGal- oder Laktat-Medium bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 1,0 bis 1,5. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 Upm, RT, Beckman-JA10-Rotor) geerntet und mit  $H_2O_{dd}$  gewaschen. Das Pellet wurde gewogen und in Tris-Puffer resuspendiert. Es wurde nochmals zentrifugiert und zweimal mit SOH-Puffer (4 ml pro g Zellen) gewaschen. Um die Zellwand der Hefen zu zerstören (Bildung von Sphäroblasten), wurden die Hefen in SOH-Puffer mit Zymolyase T100 (1,5 mg pro g Zellen) resuspendiert und für 20-45 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz der Zymolyasebehandlung wurde überprüft, indem 20  $\mu$ l Zellsuspension in 1 ml  $H_2O_{dd}$  gegeben und kurz gemischt wurde. Die Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, mit gekühlten Geräten und Lösungen. Die Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, 4°C, Beckman-JA 10-Rotor) gesammelt und zweimal mit SOH-Puffer gewaschen. Um die Sphäroblasten aufzubrechen, wurden sie in 1x BB mit 1 mM PMSF (3 ml pro g Zellen) resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisierer geöffnet (20 Stempelhübe, L-Stempel). Anschließend wurde die Suspension zweimal zentrifugiert (4000 Upm, 5 min, 4°C, Beckman-JA20-Rotor) und der Überstand jeweils in ein neues Reagenzgefäß überführt. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (10 000 Upm, 10 min, 4°C, Beckman-JA20-Rotor) gesammelt. Ein Teil des Überstandes wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und als postmitochondrialer Überstand (PMS) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet wurde vorsichtig in 1x BB resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 000 Upm, 10 min, 4°C, Beckmann-JA20-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 0,25-1,0 ml 1x BB resuspendiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Reinigung von Mitochondrien durch Dichtegradientenzentrifugation

Um die isolierten Mitochondrien von kontaminierten Membranen zu trennen, wurden die Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben geöffnet. Nach dem Zentrifugationsschritt bei 10 000 Upm zum Pelletieren der Mitochondrien wurde eine Dichtegradientenzentrifugation angeschlossen (Diekert et al., 2000). Dazu wurde eine 50%ige Nykodenzenstocklösung in Wasser angesetzt (bei -20°C haltbar). Der systematische Name von Nykodenzen lautet 5-(N-2, 3-Dihydroxypropylacetamido)-2, 4, 6-tri-iodo-N, N'-bis(2, 3 dihydroxypropyl)isophthalamid. Kurz vor Gebrauch wurde ein Dichtegradient aus einer 18%igen Nykodenzenlösung (3,6 ml 50% Nykodenzenstocklösung, 5 ml 2xBB (s. 2.3.3), 1,3 ml Wasser) und einer 14,5%igen Nykodenzenlösung (2,9 ml 50% Nykodenzenstocklösung, 5 ml 2xBB, 2,1 ml Wasser) in einem Zentrifugenröhrchen (14x89 mm Ultra-Clear-Röhrchen, Beckman) hergestellt. Der Stufengradient wurde mit den isolierten Mitochondrien überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 45 min bei 30 000 Upm bei 4°C in einem SW41-Rotor (Beckman). Die gereinigten Mitochondrien sammeln sich zwischen den beiden Phasen des Nykodenzengradienten an. Die Organellen wurden vorsichtig abgenommen, in fünffachem Volumen von 1xBB resuspendiert und für 10 min bei 10 000 Upm zentrifugiert. Die pelletierten Mitochondrien wurden in etwa 250 µl 1xBB resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.3.4 Import von Proteinen in Mitochondrien

Der Import von Proteinen in die Mitochondrien wurde nach einer publizierten Methode durchgeführt (Steiner et al., 1995; Diekert et al., 1999). Der Import von [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien (50 µg) wurde in je 82 µl Importpuffer in Gegenwart von 3 mM NADH und 1 mM ATP durchgeführt. Um zu überprüfen, ob für den Import ein Membranpotential  $\Delta\psi$  an der inneren Mitochondrienmembran erforderlich ist, wurde dieses durch die Zugabe von 40 µM CCCP (Carbonyl-cyanid-p-chlorophenylhydrazon) entkoppelt.

Nach einer Inkubation von 3 min bei 25°C wurde 4 µl Reticulozyten-Lysat zugegeben und 10 min bei 25°C stengelassen. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (6 min, 7000 Upm, 4°C). Die Überstände wurden abgesaugt und die Pellets in je 10 µl 1x BB gelöst und für die weiteren Experimente verwendet.

Der Import wurde nun unter verschiedenen Pufferbedingungen überprüft. Die Inkubation der Mitochondrien unter isotonischen Pufferbedingungen (Puffer BB) erhält die Intaktheit der mitochondrialen Außen- und Innenmembranen, so daß Proteinase K (100 µg/µl) nur Proteine abbauen kann, welche auf der äußeren Membran verankert sind. Die Inkubation der Mitochondrien in einem hypotonischen Milieu bewirkt, daß die Mitochondrien anschwellen und die äußere Membran zerstört wird. Proteine, die im Intermembranraum exponiert sind, können daher durch Proteinase K abgebaut werden. Die Inkubation der Mitochondrien in einer Detergentien-Lösung (0,1% Triton X-100) bewirkt die Solubilisierung der Mitochondrienmembranen, so daß Proteinase K auch die Proteine in der Matrix erreichen kann (Diekert et al., 2000).

Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert, die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl 200 mM PMSF gestoppt und sofort mit TCA gefällt (siehe 2.3.7.3). Die Pellets wurden in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden in einem 14% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Erfolg der unterschiedlichen Behandlung der Mitochondrien wurde durch Immundekoration von Kontrollproteinen auf der Nitrozellulose überprüft (Tom70p: Außenmembran der Mitochondrien; CC<sub>1</sub>HL: Intermembranraum, Tim44p: Innenmembran; Mge1p: Matrix).

### **2.3.5 Gewinnung eines Zellextrakts bzw. kleiner Mengen an Mitochondrien aus *S. cerevisiae***

Zur Gewinnung eines Zellextrakts bzw. kleiner Mengen an Mitochondrien wurden Hefezellen durch Glasperlen nach einer in der Literatur beschriebenen abgewandelten Methode aufgeschlossen (Woonter and Jaehning, 1990). Eine 50 ml Hefekultur wurde in Medium über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und zum Zellpellet 1 ml Puffer (Tris pH 7,4-Puffer bei der Präparation von Zellextrakten bzw. SOH-Hepes-Puffer bei der Präparation von Mitochondrien) gegeben. Die Zell-Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml Puffer gewaschen und dann in 300 µl Puffer mit 2 mM PMSF resuspendiert. Etwa 30 mg Glasperlen (Durchmesser 0,7 mm) wurden zugegeben, der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 3x je 1 min zum Aufbrechen der Zellen auf dem Vortexer auf größter Stufe geschüttelt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert. Zur Gewinnung eines Zellextrakts wurde für 5 min bei 2500 Upm, zum Pelletieren der Mitochondrien für 5 min bei 15 000 Upm

zentrifugiert. Der Zellextrakt und die Mitochondrien wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, und der Zellextrakt wurde zu Enzymaktivitätsbestimmungen verwendet.

### **2.3.6 Bestimmung des mitochondrialen Eisengehalts**

Mit einer in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethode kann das mitochondriale "freie" Eisen abgeschätzt werden, d. h. Eisen, das nicht in Häm oder Fe/S-Clustern gebunden ist (Tangeras et al., 1980). Die Messung beruht auf der Bindung von Fe(II) an einen Chelator in osmotisch geschwollenen Mitochondrien. Unter diesen Bedingungen liegen die Fe/S-Zentren stabil vor. Das gebildete Eisenchelat wird spektrophotometrisch detektiert.

1 mg Mitochondrien wurden in 1 ml Hepes-KOH pH 7,4 gelöst und eine Spatelspitze Natriumdithionit zugegeben. Diese Menge wurde auf zwei Reaktionsgefäße verteilt, wobei zu dem einen Gefäß 1 µl 10 mM Bathophenanthrolindisulfonsäure als Eisenchelator hinzugefügt wurde. Im Photometer wurde ein Spektrum dieser Probe gegen die Referenzprobe ohne Chelator zwischen 450 und 600 nm aufgenommen. Die Menge an Eisen wurde mittels einer Standardkurve mit bekannten Eisenkonzentrationen quantifiziert. Dabei wurden die Werte bei 530 nm (höchste Absorption) miteinander verglichen ( $\epsilon_{530\text{nm}} = 20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **2.3.7 Proteinanalytische Methoden**

#### **2.3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinbestimmungen wurden nach der von Bradford beschriebenen Methode mit einem Proteinbestimmungsreagens von BioRad durchgeführt (Bradford, 1976).

#### **2.3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (Lämmli, 1970). Die Größe der verwendeten Gelplatten betrug 167 x 144 x 3 mm. Die seitlich verwendeten Abstandhalter wiesen eine Dicke von 1 mm auf. Die Gel-Lösungen hatten folgende Zusammensetzung: Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,033% Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (v/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED; Trenngel: 14% (w/v) Acrylamid, 0,075-0,1% (w/v) Bisacrylamid, 385 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (v/v) APS, 0,035% (v/v) TEMED. Die Proben wurden in 2x Lämmli gelöst und 3-5 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrophorese-Puffer bei konstanter Stromstärke (30 mA, 2,5 h). Die Proteine wurden

anschließend entweder auf Nitrozellulose transferiert (siehe 2.4.1) oder mit 0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R-250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure angefärbt und mit 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

### **2.3.7.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Zu 60 µl Proteinlösung wurden 20 µl 72% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gegeben und 10 min im Eisbad inkubiert. Der Niederschlag wurde sedimentiert (20 min, 20 000 Upm, 4°C, Sigmazentrifuge), einmal mit Aceton gewaschen, bei RT getrocknet und im SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **2.3.7.4 Cytochromspektrum**

400 µg Mitochondrien wurden in 1 ml Triton-Puffer gelöst und auf zwei Glasküvetten verteilt.

10 µl einer 200 mM Natriumdithionit-Lösung wurde in eine Küvette zugegeben und die beiden Küvetten ins Photometer gestellt, so daß ein Differenzspektrum zwischen oxidiert und reduzierter Form (mit Dithionit) der Cytochrome erstellt werden konnte. Eine Unterscheidung ist möglich, da die reduzierten Cytochrome stärker absorbieren als die oxidierten Formen. Um die Extinktion aller Cytochrome zu bestimmen, wurde ein Spektrum zwischen 500 und 650 nm aufgenommen.

### **2.3.8 Reinigung von rekombinantem Protein (Bat1p) aus *E. coli* und Analyse**

Die hier angewandte Reinigung des Proteins Bat1p erfolgte nach einer publizierten Methode (Prohl et al., 1999).

#### **a) Bakterielle Expression von Bat1p**

Die codierende Information für die Aminosäuren 17-393 des Hefeproteins Bat1p wurde in den bakteriellen Vektor pQE30 kloniert, und zwar in C-terminaler Fusion zu einer Hexa-Histidiny-Sequenz in dem Plasmid. Das resultierende Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert. Die *E. coli*-Kultur wurde über Nacht in LB-Amp-Medium bei 37°C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Amp-Medium auf eine OD<sub>578nm</sub> von 0,05 angeimpft. Nach Wachstum dieser Kultur bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 - 0,8 erfolgte die Induktion der Expression des Fusionsproteins (Bat1p<sup>His6</sup>) mit 2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) für 3 h bei 37°C. Die Zellen wurden bei 7 000 Upm für 20 min bei RT im JA10-Rotor (Beckman) geerntet.



**b) Aufschluß der Bakterien**

Die pelletierten Zellen wurden in 0,4 ml Sucrose-Puffer resuspendiert. Die Zellyse wurde durch die Zugabe von Lysozym (10 mg/ml) und Inkubation für 30 min auf Eis vermittelt. 5 ml Sucrose-Puffer (zusätzlich mit 1% Triton X-100 und 4 mM PMSF) wurde zugegeben und das Gemisch zum Öffnen der Zellen beschallt (8 Mal 10 sec, "duty cycle" 5 %, 30 W). Schließlich wurden die Zelltrümmer durch 30 minütige Zentrifugation bei 13 000 Upm bei 4°C entfernt und der Überstand für die Reinigung von Bat1p<sup>His6</sup> eingesetzt.

**c) Reinigung von Bat1p<sup>His6</sup> über Ni-NTA Affinitätschromatographie**

Die Reinigung erfolgte über eine Affinitäts-Chromatographie mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) als Matrix (Qiagen). Die Matrix wurde mit Puffer A äquilibriert. Der Bakterienextrakt (40 mg Protein/ml Säulenvolumen) wurde auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde einmal mit 2 ml Puffer B, dann dreimal mit Puffer C gewaschen. Das an die Säule gebundene Bat1p<sup>His6</sup> wurde mit Puffer C, der 150 mM EDTA enthielt, eluiert. 0,1 ml Fraktionen wurden gesammelt und auf Proteingehalt (s. 2.3.7.1) und Transaminaseaktivität getestet (s. 2.3.10.9). Die Menge an gereinigtem Bat1p<sup>His6</sup> Protein lag bei 2-10% relativ zu der eingesetzten Proteinmenge.

**2.3.9 Quervernetzung von interagierenden Proteinen**

Eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung nativer Proteininteraktionen spielen chemische Quervernetzer, die eine kovalente Verknüpfung der Proteinpartner erlauben. Für die vorliegende Arbeit wurde DSS (Disuccinimidylsuberat; Pierce) verwendet, das durch intakte biologische Membranen diffundieren kann und eine kovalente Vernetzung benachbarter Proteine über die freien Aminogruppen von Lysinresten erlaubt.

Isolierte Mitochondrien wurden für 30 min bei 0°C in MOPS-Puffer mit und zum Vergleich ohne DSS inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Tris-HCl, pH 7,2 gestoppt. Die Proben wurden bei 15 000 Upm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet im MOPS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Derselbe Versuch wurde mit gereinigtem Protein (siehe 2.3.8) durchgeführt, wobei nach der Inkubation mit Quervernetzer eine TCA-Fällung (siehe 2.3.7.3) folgte.

### 2.3.10 Messung von Enzymaktivitäten

#### 2.3.10.1 Isopropylmalat-Isomerase

Die Aktivität der Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) wurde sofort nach Zellextraktion (siehe 2.3.5) bestimmt, da das cytosolische Protein sehr instabil ist und schnell an Aktivität verliert. Deshalb wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradfordreagens erst nach den Aktivitätsmessungen durchgeführt.

Leu1p Protein katalysiert die reversible Reaktion von  $\alpha$ -Isopropylmalat über das Intermediärprodukt Dimethylcitraconat zu  $\beta$ -Isopropylmalat. Die in der Literatur beschriebene Methode macht bei der Messung der Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität Gebrauch von der Absorption von Dimethylcitraconat (Kohlhaw, 1988a). Die Doppelbindung dieser Verbindung führt zu einer Absorption im UV-Bereich (235 nm). Die Extinktionszunahme bei der Synthese von Dimethylcitraconat aus  $\beta$ -Isopropylmalat wird durch photometrische Messung detektiert.

#### 2.3.10.2 $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase

Um die Aktivität der  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2p) in den Wildtyp- bzw. Mutantenzellen zu messen, wurden die Zellen mit einem multi-copy Plasmid pRS426, der ein *LEU2* Gen trug, transformiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen (s. 2.3.5).

Zur Aktivitätsmessung wurden in einer Küvette 0,03 ml 1 M Kaliumphosphat (pH 8), 0,01 ml 0,01 M Manganchlorid, 0,01 ml 1 M Kaliumchlorid, 7,2  $\mu$ l 0,01 M NAD<sup>+</sup>, 0,04 ml 0,02 M Pyrazol, 0,06 ml Wasser und 0,02 ml Enzymlösung (100  $\mu$ g Cytosol) zusammengegeben (Kohlhaw, 1988b). Für eine Minute wurde die Extinktion bei 340 nm verfolgt, bis das Signal konstant blieb. Zum Start der Reaktion wurde 0,01 ml einer 0,02 M  $\beta$ -Isopropylmalat-Lösung zugegeben. Die Umsetzung von NAD<sup>+</sup> zu NADH wurde als Absorptionzunahme bei 340 nm verfolgt.

#### 2.3.10.3 $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase

a) Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach einer in der Literatur beschriebenen Methode nach Kohlhaw, 1988c. Zu 1 ml Enzymgemisch (Zellextrakt bzw. Cytosol bzw. Mitochondrien) wurde 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Das saure Gemisch wurde mit 5 ml Diethylether durch einminütiges starkes Mischen unter dem Abzug extrahiert. 1 ml der Etherphase wurde anschließend in ein neues Glasröhrchen überführt und der Ether durch einen Luftstrom abgedampft. Zu dem getrockneten Etherextrakt wurde 0,4 ml konz. Schwefelsäure gegeben und die Röhrchen für 15 min stehengelassen.

Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gestellt, 0,25 ml kalte, frisch präparierte, wäßrige 1,84 M Resorcinollösung zugegeben und gemischt. Um die Bildung des fluoreszierenden Umbelliferonderivats von  $\alpha$ -Isopropylmalat (IPM) zu stimulieren, wurde das Gemisch für 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde mit 5 ml Wasser aufgefüllt und 0,1 ml des Reaktionsgemischs zu 0,9 ml Borat-carbonat-Puffer gegeben. Bei diesem Reaktionsschritt ist es wichtig, daß der pH bei 10 liegt. Gegebenenfalls wird er durch die Zugabe von NaOH erneut eingestellt. Die Fluoreszenz wurde in einem Aminco Mikrofluorometer, ausgestattet mit einem Corning 7-60 Primärfilter (Anregung bei 360 nm) und einem Wratten 2A Sekundärfilter (Emission bei 415 nm), gemessen.

Das Instrument wurde mit 0,1N Schwefelsäure auf Null justiert, und mit unterschiedlichen Mengen an Quininsulfat (zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{g}$  pro ml) wurde eine Standardkurve aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität steigt bis zu einer Umbelliferonkonzentration von 4  $\mu\text{M}$  linear an.

**b)** Als alternative Methode zur Bestimmung der Aktivität der  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase wurde auch ein in der Literatur beschriebener Nachweis nach Kohlhaw gewählt (Kohlhaw, 1988). In diesem Test wird das in dieser Reaktion gebildete freie Coenzym A über die Reduktion des zugegebenen Ellmans Reagens' 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) photometrisch bestimmt.

#### **2.3.10.4 Citratsynthase**

Die Citratsynthase katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat.

Die Aktivität dieses Enzyms wird anhand der Freisetzung von Coenzym A verfolgt, die über die Reaktion mit Dithionitrobenzoat (DTNB) bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen werden kann (vgl. 2.3.10.3 b)) (Srere et al., 1963).

#### **2.3.10.5 Aconitase**

Aconitase katalysiert die reversible Isomerisierung von Citrat über einen Übergangszustand (cis-Aconitat) zu Isocitrat. Die Umwandlung des Aconitats zu Isocitrat kann bei 240 nm gemessen werden, da die Doppelbindung des Aconitats bei 240 nm Licht absorbiert (Kispal et al., 1997).

### 2.3.10.6 Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenase katalysiert eine Reaktion des Citronensäurezyklus, und zwar die Regeneration von Oxalacetat. Die Reaktion wird anhand des Verbrauchs von NADH bei der Bildung von Malat aus Oxalacetat gemessen. Die Aktivität wird bei 340 nm verfolgt, da NADH im Gegensatz zu  $\text{NAD}^+$  bei dieser Wellenlänge Licht absorbiert (Kispal et al., 1997).

### 2.3.10.7 Succinat-Dehydrogenase

Die Succinatdehydrogenase ist ein Enzym des Citratzyklus und Bestandteil der Atmungskette (Komplex II). Komplex II überträgt Elektronen von Succinat auf Coenzym Q. Die Elektronen fließen über den Komplex III weiter zum Cytochrom c. Cytochrome enthalten eine Häm-Gruppe, deren Eisenatome durch die Aufnahme eines Elektrons aus dem Ferri-(FeIII) in den Ferro-(FeII) Zustand übergehen. Im Falle der Reduktion des Cytochroms c werden die Elektronen durch die Reaktion der Succinat-Dehydrogenase geliefert.

Cytochrom c absorbiert sichtbares Licht und ändert seine Farbe, wenn es oxidiert bzw. reduziert wird. Das reduzierte Cytochrom c zeigt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 550 nm. Dieses Absorptionsmaximum wird für die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase ausgenutzt und im Vergleich zu einer Referenzprobe mit Malonat als Enzyminhibitor gemessen (Robinson et al., 1991; Robinson and Lemire, 1995).

### 2.3.10.8 Alkoholdehydrogenase

Die Alkoholdehydrogenase katalysiert die NADH-abhängige Reaktion von Ethanol zu Acetaldehyd. Über die Zunahme der Extinktion durch die NADH-Bildung kann diese Reaktion bei 340 nm verfolgt werden (Boehringer Mannheim, Kat.Nr. 15428/20, S. 25-26).

### 2.3.10.9 Transaminase verzweigtkettiger Aminosäuren

Die Transaminierungsreaktion der verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketosäuren ( $\alpha$ -Ketoisocaproat,  $\alpha$ -Ketoisovalerat,  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerat) zu den entsprechenden Aminosäuren (Leucin, Valin und Isoleucin) ist reversibel und läßt sich in beiden Richtungen verfolgen (Prohl et al., 1999).

a) Umsetzung der verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketosäuren in die Aminosäuren ("Hinreaktion")

Die Reaktion kann durch Kopplung an die NAD(P)H-abhängige Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion verfolgt werden (Collier and Kohlhaw, 1972). Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Somit wird die Bildung der verzweigtkettigen Aminosäuren durch die Abnahme der NAD(P)H Konzentration verfolgt.

Ein 0,5 ml Versuchsansatz enthielt 0,25 ml TA-Puffer, 0,04 ml 0,5 M Glutaminsäure, 0,01 ml 10 mM NADH, 2 U/ml Glutamat-Dehydrogenase, 0,04 ml Probe und wurde mit H<sub>2</sub>O gefüllt in einer Quartzküvette aufgefüllt. Als Probe wurde entweder 30-50 µg Protein eines Hefezellextrakts oder Cytosol, 10-30 µg isolierte Mitochondrien oder 1 µg gereinigtes Enzym eingesetzt. Nach Erreichen eines stabilen Signals bei 340 nm wurde die Transaminasereaktion durch Zugabe von 0,02 ml der benötigten α-Ketosäure (200 mM) gestartet. Die Abnahme der Absorption wurde einige Minuten verfolgt und angegeben als Units pro mg Protein. Ein Unit wurde definiert als die Oxidation von 1 µmol NADH pro Minute (Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**b) Umsetzung der verzweigt-kettigen Aminosäuren in die α-Ketosäuren ("Rückreaktion")**

Zur Verfolgung dieser Reaktion wird die Bildung eines Hydrazons mit den verzweigt-kettigen α-Ketosäuren bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen (Ichihara and Koyama, 1966). Die irreversible Bildung dieses Produkts erlaubt eine quantitative Bestimmung von verzweigt-kettigen α-Ketosäuren und bietet somit ein Mittel, die Aktivität der Transaminase zu messen.

Die Reaktion wurde in einem Versuchsansatz von 1 ml durchgeführt, der 0,5 ml rTA-Puffer, 10 µl 6,7 mM Isoleucin, Leucin oder Valin, 3,4 µl 20 mM Pyridoxalphosphat und die Probe enthielt. Die Probe bestand typischerweise aus 300-500 µg Gesamtzellextrakt oder Cytosol, 100-300 µg isolierten Mitochondrien oder 10 µg gereinigtem Enzym. Die Lösung wurde für 5 min bei 37°C vorinkubiert, und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 6,7 mM α-Ketoglutarat gestartet. Nach 10 min bei 37°C wurde die Transaminasereaktion durch die Zugabe von 100 µl 60% Trichloressigsäure beendet. Die Proben wurden abzentrifugiert und der klare Überstand in ein 10 ml Glasröhrchen übertragen. Der Inkubation für 5 min bei 25°C im Wasserbad folgte die Zugabe von 2 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,5% (w/v) in 2 N HCl) und die erneute Inkubation für 5 min. Das Gemisch wurde überschichtet mit 5 ml Toluol, und anschließend wurde für 2 min stark geschüttelt. Die untere wäßrige Phase wurde mit einer Kapillarpipette abgesaugt, und zur oberen organischen Phase wurde 5 ml 0,5 N HCl hinzugefügt. Nach einminütigem Schütteln wurde das aus α-Ketoglutarat gebildete unlösliche Hydrazon durch kurze Zentrifugation entfernt. 2 ml der Toluolschicht wurde zusammen mit 2 ml 10% (w/v) Natriumcarbonat in ein frisches Glasröhrchen überführt. Nach kurzem Schütteln und der Phasentrennung wurde 1 ml der wäßrigen Phase mit 1 ml 1,5 N NaOH vermischt und die Absorption bei 440 nm verfolgt. Die Hydrazone der drei verzweigt-kettigen α-Ketosäuren zeigen ähnliche Absorptionswerte bei 440 nm ( $\epsilon_{440} = 1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Zur

Quantifizierung der Enzymaktivität mußte die Hintergrundsabsorption (hauptsächlich aufgrund des zugefügten 2,4-Dinitrophenylhydrazins) abgezogen werden. Daher muß die Reaktion parallel auch mit Puffer anstelle der Proteinprobe durchgeführt werden.

### **2.3.11 Metabolitbestimmung**

#### **2.3.11.1 Quantitative Bestimmung von Coenzym A**

Die Probe (0,5 mg Cytosol oder 0,5 mg Mitochondrien) wurde durch Zugabe von 4% Perchlorsäure de-proteiniert. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurde 150 mM Kaliumphosphat (pH 7) hinzugefügt und der pH auf 7 mit KOH eingestellt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, aufgetaut und für 10 min bei 13 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung von Coenzym A (CoA) eingesetzt.

Die CoA-Menge wird mit der Phosphotransacetylase über eine kinetische Methode bestimmt (Michal et al.). Die Phosphotransacetylase ist dabei gekoppelt an zwei enzymatische Reaktionen. CoA wird über die Phosphotransacetylase acetyliert. Acetyl-CoA wird mit Oxalacetat über die Citratsynthase in Citrat umgewandelt, wobei CoA regeneriert wird und erneut in den Zyklus eintreten kann. Die Transformationsrate und damit die Menge von CoA wird durch die NAD-abhängige Bildung von Oxalacetat über die Malatdehydrogenase gemessen.

In eine Küvette wurden jeweils 0,025 ml Probe und 0,15 ml Wasser gegeben und das Gemisch für 10 min inkubiert. 0,75 ml Triethanolamin-malat-Lösung und 0,46 mM Dithiothreitol wurden hinzugegeben und für 15 min inkubiert. 0,1 ml NAD/Acetylphosphatlösung (1,4 mM NAD, 4,6 mM Acetylphosphat), Malatdehydrogenaselösung (9,8 U/ml; Sigma) und Phosphotransacetylaselösung (7 U/ml; Sigma) wurden hinzugefügt und etwa 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde in eine Küvette 0,01 ml Citratsynthasesuspension (1,3 U/ml; Sigma) gegeben und der Extinktionsanstieg für etwa 1 min relativ zu einem Reaktionsansatz ohne Probenzugabe verfolgt. Zur quantitativen Bestimmung des CoA wurde die Acetylierung mit einer Standard-CoA-Lösung (1,25 µg CoA) anstelle von Probe gemessen. Die CoA-Konzentration in der Probe wurde berechnet nach der Formel:

$$c(\text{Probe}) = c(\text{St.}) \times [(\Delta E/\text{min})_{\text{Probe}} / (\Delta E/\text{min})_{\text{St.}}]$$

Die Konzentration (c) wird in nmol/ml angegeben. St., Standard.

**2.3.11.2 Quantitative Bestimmung von Citrat**

Um die zelluläre Citratkonzentration zu messen, wurden die Zellen aufgeschlossen (s. 2.3.5) und wie unter 2.3.11.1 angegeben de-proteiniert. Anschließend wurde die Citratkonzentration über eine Aneinanderreihung von drei enzymatischen Reaktionen bestimmt (Moellering and Gruber, 1966). Die Citratlyase katalysiert das Gleichgewicht zwischen Citrat, Acetat und Oxalacetat. Oxalacetat wird spontan zu Pyruvat decarboxyliert. Um sowohl Oxalacetat als auch Pyruvat vollständig zu erfassen, verwendet man als Indikator-Enzyme Malat-Dehydrogenase und Laktat-Dehydrogenase. Die Abnahme der NADH-Konzentration, gemessen an der Abnahme der Extinktion bei 340 nm, ist ein Maß für die umgesetzte Citrat-Menge.

**2.3.11.3 ATP-Bildung in Abhängigkeit vom Membranpotential**

Mit diesem Versuch wurde die Membranpotential-getriebene Bildung von ATP gemessen. Mitochondrien (10 µg) wurden isoliert und in ADP-Puffer bei 25°C inkubiert. Ein Membranpotential wurde durch Zugabe von 2 mM NADH aufgebaut. Die Bildung von ATP wurde anhand der Abnahme von freiem anorganischen Phosphat angezeigt, welches durch den Malachit-Grün-Test (Lill et al., 1990; Nargang et al., 1995) bestimmt wurde. Als Kontrolle wurde bei einer Probe NADH weggelassen und in eine andere Probe 50 nM Carboxyatractylosid (CAT) zusätzlich zugegeben, um den ADP/ATP Carrier zu blockieren, so daß kein Phosphat in ADP eingebaut werden konnte.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und anschließende Immundekoration

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden elektrophoretisch mit dem sogenannten "Semidry" Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979). Der Transfer der Proteine erfolgte für eine Stunde bei 250 mA und wurde durch kurze Färbung mit Ponceau S Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% TCA, 3% Sulfosalicylsäure) überprüft.

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf übertragenen Proteinen wurde für 30 min mit 5% Magermilchpulver in TBS geschüttelt. Die Immundekoration erfolgte für 1 h mit spezifischen Antiseren, die je nach Titer 1:200 bis 1:5000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran je 5 min mit TBS, TBS mit 0,05% Triton X-100 und wieder mit TBS gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch Inkubation für 1 h mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase (Bio-Rad), das 1:5000 in Milchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran - wie oben beschrieben - gewaschen und mit Luminol-Reagens benetzt. Durch die dabei ablaufende Chemilumineszenz-Reaktion konnten die vom Erstantikörper erkannten Proteine auf einem Röntgenfilm (Fuji NewRX) sichtbar gemacht werden.

#### 2.4.1.1 Erneute Immundekoration

Auf Nitrozellulose vorgebundene Antikörper kann man durch Erhitzen der Membran im Wasserbad ablösen und nach Waschen mit einem neuen Antiserum dekorieren.

Die Nitrozellulosemembran wurde im SDS-Puffer 30 min bei 60°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 10 min in TBS-Tween bei Raumtemperatur erfolgte die erneute Immundekoration.



### 2.4.2 Bestimmung des Einbaus von radioaktivem Eisen in Eisen-Schwefel-Proteine über Immunfällung

#### a) Kopplung des Antiserums an Protein-A-Sepharose

0,5 ml Serum wurden in 1 ml TNETG-Puffer aufgenommen und mit 0,5-10 mg PAS (Protein-A-Sepharose) für 45 min bei 4°C geschüttelt. Zwei Waschschrirte mit TNETG-Puffer entfernten die Serumproteine, die nicht an PAS adsorbiert waren.

#### b) Einbau von radioaktivem Eisen

Der Einbau von radioaktivem [<sup>55</sup>Fe] Eisen in Fe/S-Proteine wurde nach einer in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode bestimmt (Kispal et al., 1999). Die zu testenden Hefezellen wurden über 3 Tage in Eisen-freiem Minimalmedium (mit Glukose und den zum Wachstum der Zellen benötigten Aminosäuren; siehe 2.5.5) bis OD 1,0 (0,5-1 g Zellen) kultiviert. Die Zell-Suspension wurde zentrifugiert (4000 Upm, 5 min, RT, Tischzentrifuge), das Pellet (0,5 g feuchte Zellen) in 10 ml Eisen-freiem Medium mit 10 µCi [<sup>55</sup>Fe]-Eisen und 10 µM Ascorbat resuspendiert und 30 min bei 30°C inkubiert. Die radioaktive Markierung der Zellen wurde durch Zugabe von 0,1 mM nicht-radioaktivem Fe<sup>2+</sup> (FeSO<sub>4</sub>) beendet und der Reaktionsansatz zentrifugiert (s. oben). Das Pellet wurde zum Waschen in 10 ml Citrat-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (siehe oben). Anschließend wurde das Pellet in 0,5 ml 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 resuspendiert und die Suspension zentrifugiert (siehe oben). Das Pellet wurde in 0,5 ml TNETG-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert und Glasperlen (ca. 0,5 ml) zugegeben. Die Suspension wurde dann 3 x je 1 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (3000 Upm, 5 min, RT, Tischzentrifuge). Vom Überstand wurde 5 µl entnommen und die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität mittels Szintillationszählung gemessen. Der Rest wurde zentrifugiert (15 000 Upm, 10 min, RT, Sigmazentrifuge). Zu je 200 µl des Überstandes wurde 25 µl einer Protein A Sepharose Suspension (50% Gelmatrixanteil) zugegeben. An die Sepharosematrix waren entweder Antikörper gegen das zu bestimmende Fe/S-Protein gebunden oder Antikörper aus einem nicht-immunreaktiven Antiserum (Negativkontrolle). Nach Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die Affinitätsmatrix-Sepharosekügelchen 3 mal mit TNETG-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

## 2.5 Materialien

### 2.5.1 Oligonukleotide

**IlvE 11 (zur Klonierung; BamHI)**

5'-GCC GGA TCC ATG ACC ACG AAG AAA GC-3'

**IlvE 21 (rILVE; EcoRI)**

5'-CGC GAA TTC TTA TTG ATT AAC TTG ATC-3'

**Bat1 11 (zur Klonierung; BamHI)**

5'-GAG GGA TCC ATG CTC GCT ACT GGT GCC-3'

**Bat1 21 (rBAT1; PstI)**

5'-GAG CTG CAG TTA GTT CAA GTC GGC AAC-3'

**Isu1 11 (Disruption) (Sequenzhomologie zu dem Vektor pFA6a-HisMX4)**

5'-TAT AAC GAG ATT TGC AAG GCC TGC TCT GAT GGC CAT CAG ACC TCG TAC  
GCT GCA GGT CGA C-3'

**Isu1 21 (rDisruption) (Sequenzhomologie zu Vektor pFA6a-HisMX4)**

5'-GTA GTC CTT AAT AGC TGC CTT GAT CGC ATC TTC CGC TAA CAT CGA TGA  
ATT CGA GCT CG-3'

**Isu1 12 (Klonierung in den Vektor Yep51; BamHI)**

5'-AAA GGA TCC CTGATGCTTCCTGTTATAACG-3'

**Isu1 22 (rISU1; HindIII)**

5'-ATA AAG CTT TTG ATC TTG TTC TTG TCC CG-3'

**Isu1 13 (Galaktose-induzierbarer *ISU1* Promotoraustausch; HindIII)**

5'-ATA AAG CTT ACT CCC TAT GCT TGC TTT GGT-3'

**Isu1 23 (rPromotoraustausch; HpaI)**

5'-AAA GTT AAC TTT TCG TTA TGC TGG ACG CT-3'

**Isu2 11 (Disruption) (Sequenzhomologie zu pFA6a-HisMX4)**

5'-CAC GGG CTC CCA CAT AAC AAG AGC TGC CAA AAG ACT TTA CCA CGT  
ACG CTG CAG GTC GAC-3'

**Isu2 21 (rDisruption)** (Sequenzhomologie zu pFA6a-HisMX4)

5'-GTA GTC CTT GAT TGC CGC CTT GAT AGC GTC TTC TGC AAG CAT ATC GAT  
GAA TTC GAG CTC G-3'

**Isu2 12 (Klonierung in den Vektor Yep51; BamHI)**

5'-AAA GGA TCC CAC CAA CAA ACA TAG CAC AGC-3'

**Isu2 22 (rISU2; HindIII)**

5'-ATA AAG CTT CTT TCA ATG CAA AAC GGA GG-3'

**Isu2 13 (Galaktose-induzierbarer ISU2 Promotoraustausch; HindIII)**

5'-ATA AAC GTT ATG TGG CAA CTG CAA CCA AA-3'

**Isu2 23 (rPromotoraustausch; HpaI)**

5'-AAA GTT AAC TGC TGT GCT ATG TTT GTT GG-3'

**Leu211 (Promotoraustauschkontrolle über die Leu1 Region in Vektor Yep51)**

5'-GAT GCT GTC GCC GAA G-3'

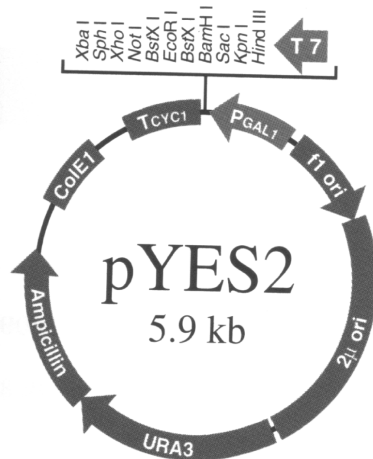
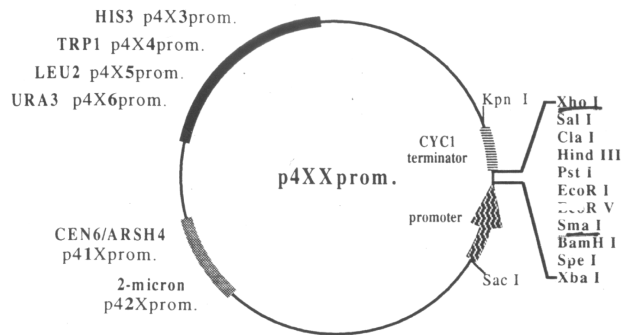
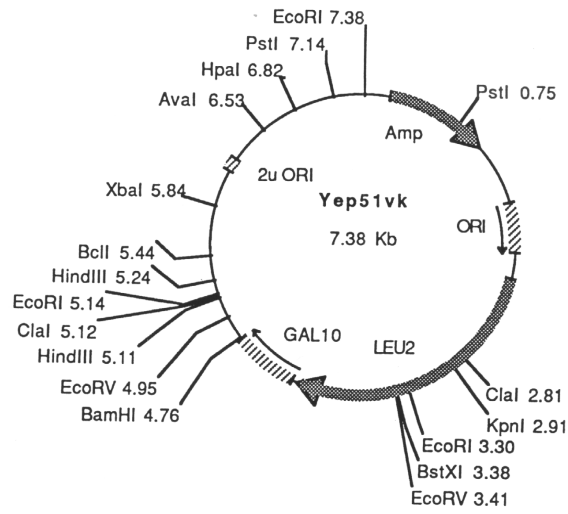
**Mdl2 (Klonierung; BamHI)**

5'-AAA GGA TCC ATG AAA ACT TAC GTA CTT TTA-3'

**Mdl2 (rMDL2; XhoI)**

5'-AAA CTC GAG TCA CGG TTG TGG TGT GAT CTT-3'

2.5.2 Plasmide



## 2.5.3 Verzeichnis der Plasmide

Tab. 2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Klonierung	Referenz
pYES2.0	keine inserierte DNA	Invitrogen
pYES2.0- <i>Su9HisDnaK</i>	Hilfskonstrukt zur Expression von <i>DnaK</i> mit N-terminalem His8tag. Gal1Promotor, 2 $\mu$ , <i>URA3</i> : HindIII/SacI Fragment aus pGEM3- <i>Su9DnaK</i> in pYES2.0 kloniert	B.Westermann, Universität München
pYES2.0- <i>Su9ilvE</i>	pYES2.0 <i>Su9HisDnaK</i> ( <i>DnaK</i> mit BamHI und EcoRI aus dem Vektor entfernt) mit amplifiziertem <i>ilvE</i> Gen; Oligonukleotide IlvE 11 (BamHI) und IlvE 21 (EcoRI)	diese Arbeit
pRS425GPD- <i>Su9ilvE</i>	Insert aus pYES2.0 <i>Su9ilvE</i> in pRS425GPD: HindIII und EcoRI	diese Arbeit
pRS423GPD- <i>ilvE</i>	pRS423GPD mit amplifiziertem <i>ilvE</i> Gen; Oligonukleotide IlvE 11 (BamHI) und IlvE 21 (EcoRI)	diese Arbeit
pGEM4		Promega
pGem4-(p) <i>BAT1</i>	durch PCR amplifiziertes <i>BAT1</i> Gen ohne Präsequenz (=p) <i>BAT1</i> ) unter Kontrolle eines Sp6-Promotors; Oligonukleotide Bat1 11 (BamHI) und Bat1 21 (PstI)	diese Arbeit
pYES2.0- <i>Su9(p)BAT1</i>	pYES2.0- <i>Su9HisDnaK</i> + pGEM4-(p) <i>BAT1</i> : BamHI + SphI	diese Arbeit
pRS423GPD- <i>Su9(p)BAT1</i>	pYES2.0- <i>Su9(p)BAT1</i> + pRS423GPD: BamHI + XhoI	diese Arbeit
pFA6a-His3	enthält codierende Sequenz einer Aminoglycosid Phosphotransferase und den His3-Marker aus <i>S. pombe</i>	Wach et al., 1994
pRS426GPD pRS425GPD pRS423GPD	keine inserierte DNA	Funk et al., Nucleic Acid Research, 1994
pRS423GPD- <i>MDL2</i>	<i>MDL2</i> Gen über PCR amplifiziert (Oligonukleotide: Mdl2 11 und Mdl2 12) und in pRS423GPD kloniert	diese Arbeit
pYep51+ <i>ISU1</i>	BamHI/HindIII WT <i>ISU1</i> inserierte DNA (Oligonukleotide: Isu1 12 und Isu1 22)	diese Arbeit
pYep51+ <i>ISU2</i>	BamHI/HindIII WT <i>ISU2</i> inserierte DNA (Oligonukleotide: Isu2 12 und Isu2 22)	diese Arbeit

Plasmid	Klonierung	Referenz
pYep51+ GalISU1	pYep51- <i>ISU1</i> HpaI/HindIII; Oligonukleotide: Isu1 12 und Isu1 22 + Gal-Promotor-Insert HindIII; Oligonukleotide: Isu1 13 und Isu1 23	diese Arbeit
pYep51+ GalISU2	pYep51- <i>ISU2</i> HpaI/HindIII; Oligonukleotide: Isu2 12 und 22 + Gal-Promotor-Insert HindIII; Oligonukleotide: Isu2 13 und Isu2 23	diese Arbeit
pRS426GPD- <i>RLIHA</i>	<i>RLIHA</i> (mit eigenem Promotor amplifiziert) in pRS426GPD: SacI und XhoI	G.Kispal, unveröffentlicht
pRS423GPD- <i>RLIHA</i>	pRS423GPD + pRS426GPD- <i>RLIHA</i> : SacI + XhoI	diese Arbeit
pRS416MET25- Su9 <i>NFS</i>		G.Kispal, unveröffentlicht
pRS416MET25- Su9 <i>iscU</i>	pRS416MET25-Su9 <i>NFS</i> + <i>IscU</i> <sub>PCR</sub> : BamHI + XhoI	diese Arbeit
pYES2.0-hGP	hGP (human Graves` disease protein)-Gen wurde aus einer cDNA Bibliothek einer Jurkat Lymphom-Zelllinie durch PCR gewonnen: 1.3 kbp DNA Fragment in pYES2.0	G.Kispal, unveröffentlicht

### 2.5.4 Verzeichnis der Bakterien- und Hefestämme

Tab. 3a. Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Name im Text	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	DH5α	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-,mK+) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169	Promega

Tab. 3b. Verwendete Hefestämme

Hefestamm	Name im Text	Genotyp	Referenz
YPH501	Wildtyp YPH501	MAT $\alpha$ ade2-101 his3-200,15 leu 2-1, 112 trp1-63 ura3-52 lys2-801	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
YPH501 <i>bat1::URA3</i>	$\Delta$ bat1		Kispal et al., 1996
YPH501 <i>bat2::TRP1</i>	$\Delta$ bat2		Kispal et al., 1996
YPH501 <i>bat1::URA3</i> , <i>bat2::TRP1</i>	$\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2		Kispal et al., 1996
W303 $\alpha$ haploid	Wildtyp W303 $\alpha$	MAT $\alpha$ ade2-1 his3-11,15 leu 2-3, 112 trp1-1 ura 3-1	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
W303-1A, <i>leu5::HIS3</i>	$\Delta$ leu5		Prohl, unveröffentlicht
W303 $\alpha$ /a diploid	Wildtyp W303 $\alpha$ /a	MAT $\alpha$ /a ade2-1 his3-11,15 leu 2-3, 112 trp1-1 ura 3-1	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
W303 $\alpha$ /a, <i>isu1::HIS3</i>	W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu1		diese Arbeit
W303 $\alpha$ /a, <i>isu2::HIS3</i>	W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu2		diese Arbeit
W303-1A, <i>isu1::HIS3</i>	$\Delta$ isu1		diese Arbeit
W303-1A, <i>isu2::HIS3</i>	$\Delta$ isu2		diese Arbeit
W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu2 <i>ISU1</i> -Gal-Promotoraustausch	$\Delta$ isu2-Gal <i>ISU1</i>		diese Arbeit
W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu1 <i>ISU2</i> -Gal-Promotoraustausch	$\Delta$ isu1-Gal <i>ISU2</i>		diese Arbeit

Hefestamm	Name im Text	Genotyp	Referenz
W303-A, <i>atm1::LEU2</i>	$\Delta atm1$		Kispal, 1996
W303-1A, <i>mdl1::HIS3</i>	$\Delta mdl1$		Tampe, Universität Marburg
W303-1A, <i>mdl2::KAN<sup>r</sup></i>	$\Delta mdl2$		Tampe, Universität Marburg
W303-1A, <i>mdl1::HIS3</i> <i>mdl2::KAN<sup>r</sup></i>	$\Delta mdl1\Delta mdl2$		Tampe, Universität Marburg
W303-1A, <i>cit2::URA3</i>	$\Delta cit2$		Prohl, unpublished
W303-1A, <i>leu5::HIS3</i> , <i>cit2::URA3</i>	$\Delta cit2\Delta leu5$		Prohl, unpublished

### 2.5.5 Häufig verwendete Medien und Puffer

#### Medien:

(für die jeweiligen Platten: zusätzlich 2% (w/v) Bacto-Agar)

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

*LB-Amp-Medium*: zusätzlich 100 mg/l Ampicillin (sterilfiltriert).

*YPD-Medium*: 1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 2% (w/v) g/l Bacto-Pepton, 2% (w/v) Glukose.

*YPGal-Medium*: wie YPD-Medium, aber mit 2% Galaktose als Kohlenstoff-Quelle.

*SD-Medium*: 0,67% (w/v) Stickstoffbasis für Hefe (ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glukose.

*Laktat-Medium*: 3 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 1 g/l  $KH_2PO_4$ , 1 g/l  $NH_4Cl$ , 0,5 g/l  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  
0,5 g/l NaCl, 0,6 g/l  $MgSO_4 \cdot xH_2O$ , 3 mg/l  $FeCl_3$ , 0,5 g/l Glukose, 2% (v/v)

Laktat pH 5,5 mit NaOH.

*Eisen-freies Minimalmedium*: 50 ml 20x Salze, 1 ml 1000x Spurenelemente, 5 ml 200x

Vitamine, 100 ml 20% Glukose, 4 ml 200x Aminosäuren (je nach Selektionsmarkern), ad 1000 ml  $H_2O$ dd.

a) 20x Salze: 8,5g  $KH_2P$ , 1,5g  $K_2HP$ , 1,0g NaCl, 50g  $NH_4SO_4$ ,  
5g  $MgSO_4$ , 1g  $CaCl_2$ .



- b) 1000x Spurenelemente: 50 mg Borat, 4 mg Kupfer, 10 mg KJ, 50 mg  $\text{MnCl}_2$ , 20 mg Molybdat, 20 mg  $\text{ZnCl}_2$ .
- c) 200x Vitamine: 40 mg Pantothenat, 40 mg Thiamin, 40 mg Pyridoxin, 0,4 mg Biotin, 400 mg Inositol.
- d) 200x Aminosäuren: je 200 mg/ml Adenin, Lysin, Histidin, Tryptophan, Leucin, Uracil.

*Minimal-Sporulationsplatten:* 1% (w/v) Kaliumacetat, 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,05% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Bacto-Agar,  $\frac{1}{4}$  der für SD-Medium angegebenen Menge von Aminosäuren.

### **Puffer:**

*ADP-Puffer :* 20 mM MOPS-KOH pH 7,2, 0,25 M Sucrose, 0,3 mM Kaliumphosphat, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mg/ml fettsäurefreies BSA und 1 mM ADP.

*10x Agarosegel Probenpuffer:* 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol, 95% (v/v) Formamid.

*1x BB:* 0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes-KOH pH 7,4.

*Borat-Carbonat-Puffer:* 0,1 M Borsäure, 0,4 M Natriumcarbonat, pH 10.

*CIP-Puffer:* 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 10 mM Spermidin.

*Citrat-Puffer :* 50 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0 (KOH)

*GTE-Lösung:* 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0.

*E1-Lösung:* 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 5  $\mu\text{g/ml}$  Rnase.

*E2-Lösung:* 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS.

*E3-Lösung.* 3,1 M Kaliumacetat pH 5,5.

*E4-Lösung:* 600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15% (w/v) Triton X-100 pH 5,5

*E5-Lösung:* 800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat pH 5,0.

*E6-Lösung:* 1250 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,5.

*Elektrophorese-Puffer :* 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS.

*Importpuffer:* 0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes-KOH pH 7,4, 50 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 mM EDTA, 1 mg/ml Fettsäure-freies BSA.

*5x Ligationspuffer:* 0,25 M Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG-8000.

*Lysepuffer:* 0,4 ml TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA; und 90  $\mu\text{l}$  TE + 1% SDS.

*MOPS-Puffer:* 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 15 mM MOPS-KOH, pH 7,2.

*Puffer A:* 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,2 mM Pyridoxalphosphat, 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 0,2 mM EDTA, 5 mM frisch hinzugefügtes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,1% (v/v) Triton X-100.

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

*SDS-Puffer:* 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

*SEM-Puffer:* 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 15 mM MOPS, pH 7,2

*Sequenzierungs-Auftragspuffer:* 8 ml deionisiertes Formamid, 2 ml 25 mM EDTA pH 8,0, 100 mg Dextran Blau, Formamid:EDTA/Dextran Blau = 5:1, ad 10 ml mit H<sub>2</sub>O add.

*10x Standard Reaktionspuffer:* 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) Triton X-100.

*10x STE-Puffer:* 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA.

*SOC-Medium:* 2g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose.

*SOH-Puffer:* 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4.

*SOH-Hepes-Puffer :* 0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes-KOH, pH 7,4.

*Sorbitol-Lösung:* 0,9 M Sorbitol, 0,01 M Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 M EDTA pH 7,5, 0,2  $\mu$ g Zymolyase, 1,0  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol.

*Sucrose-Puffer :* 10% Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 8.

*TA-Puffer:* 200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 mM Pyridoxalphosphat, und 2 mM NaN<sub>3</sub>.

*rTA-Puffer :* 75 mM Natriumpyrophosphat, pH 9,2.

*TAE-Puffer:* 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetat, pH 7,5.

*TBS-Puffer:* 0,9% (w/v) NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4.

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

*TNETG-Puffer:* 20 mM Tris-HCl pH 7,1, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,5% (w/v) Triton X-100, 10% (v/v) Glycerin.

*Triethanolamin-malat-Lösung:* 140 mM Triethanolamin, 10,5 mM Malat.

*Tris pH 7,4-Puffer:* 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl.

*Tris-Puffer:* 100 mM Tris-SO<sub>4</sub> pH 9,4, 10 mM DTT; 3 ml pro g Hefezellen.

*Triton-Puffer :* 100 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,5% Triton X-100.

### 2.5.6 Chemikalien und Feinchemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Disuccinimidylsuberat (DSS), *Pierce*
- $\beta$ -Isopropylmalat, *Wako*
- Desoxynucleotid Triphosphate (dNTPs), *Clontech*
- m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, Protein A Sepharose CL-4B, *Pharmacia*
- Malatdehydrogenase, Phosphotransacetylase, Citratsynthase, *Sigma*
- Bathophenanthrolindisulfonsäure, *Sigma*
- Nykodenz, *Immuno GmbH*
- Ni-NTA, Säulchen und Qiaquick Gel extraction Kit, *Qiagen*
- Phenol, *ICN*
- RNase A, *Calbiochem*
- RNasin, T4 DNA Ligase, *Promega*
- Zymolyase 100 T, *Seikau*
- SP6 Polymerase, *Biozym*
- (Taq) Panscript/Truescript DNA Polymerase, *Pansystems/Truescript*
- 1 kb Marker, Lachssperma DNA-Lösung, Hefe-Nitrogen-Base, *Gibco*
- Anti-Rabbit-Peroxidase, Protein Konzentrationsbestimmung, *Bio Rad*
- Acrylamid (2x kristallisiert), DTT, Hepes, MOPS, NADH, *Gebro*
- Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer, *Gibco/Boehringer Mannheim*
- Expand High Fidelity PCR System, Proteinase K, *Boehringer Mannheim*

Nicht aufgeführte Substanzen wurden von den Firmen *Sigma* (München), *Merck* (Darmstadt), *Serva* (Heidelberg) und *Roth* (Karlsruhe) bezogen.

### 2.5.7 Radiochemikalien

[<sup>35</sup>S]-Methionin 1000 Ci/mmol von der Firma *ICN Pharmacia*

[<sup>55</sup>Fe]-Eisen 3,66 Ci/mmol von der Firma *Amersham Pharmacia Biotech*

[<sup>3</sup>H]-Coenzym A Ci/mmol von der Firma *Hofmann (Göttingen)*

## 2.5.8 Laborgeräte

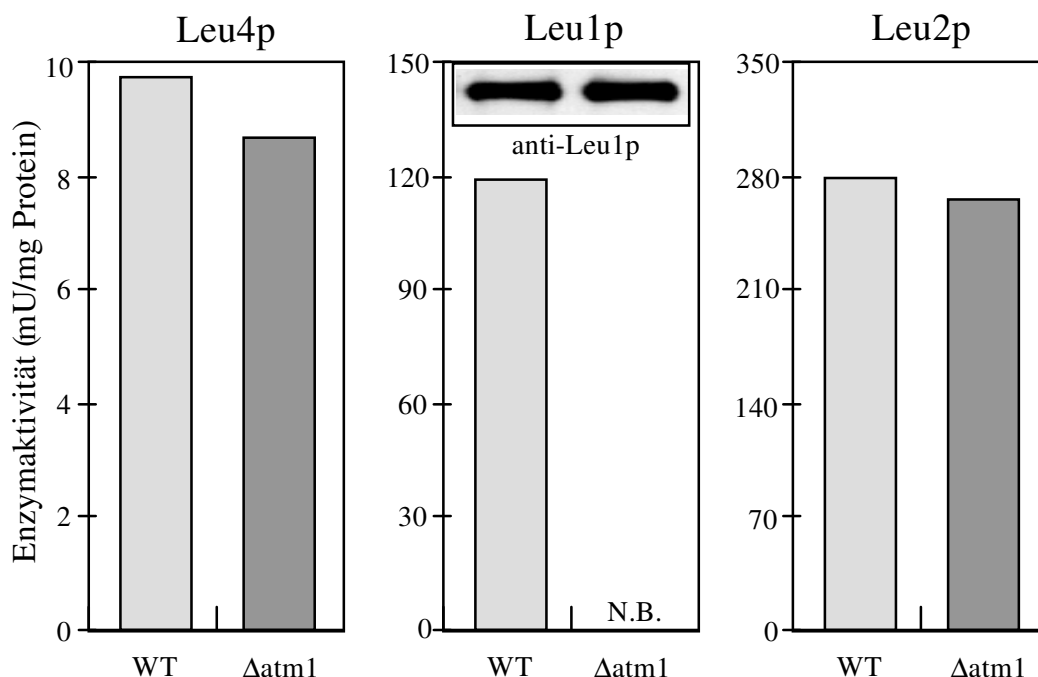
<b>Geräte</b>	<b>Modell; Herstellerfirma</b>
Agarosegelkammer	B2; AGSAutoklav GVA570; <i>Gössner</i>
Feinwaage	1212MP; <i>Sartorius</i>
Fluoreszenzmikroskop	Diaplan; <i>Leitz</i>
Fluoreszenzphotometer	PMQII; <i>Zeiss</i>
Inkubatoren	Funtion line; <i>Heraeus</i>
Kamera	CN6 1.4; <i>Raytest</i>
Mikromanipulator	<i>Leika</i>
Mikrowaage	4501MICRO; <i>Sartorius</i>
Mikrowelle	MWS 1720 Rapid; <i>Bauknecht</i>
Probenschüttler	Mixer5432; <i>Eppendorf</i>
Netzgerät	EPS600; <i>Pharmacia</i>
Photometer	UVKON922; <i>Kontron</i>
Rotoren	JA20 / JA10; <i>Beckman</i>
Schüttelinkubator	Multitron; <i>INFORS</i>
Sequenziergerät	ABI PRISM 377 DNA-Sequencer; <i>Perkin Elmer</i>
Sterilbank	NU-425-200; <i>NUAIRE</i>
Sterilisator	<i>Memmert</i>
Sigmazentrifuge	3K30; <i>Sigma</i>
Szintillationszähler	<i>Phillips</i>
Thermocycler	UNO Thermoblock; <i>Biometra</i>
Thermomixer	Thermomixer 5436; <i>Eppendorf</i>
Thermostatierbarer Probenschüttler	Thermostat 5320; <i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge	Biofuge pico; <i>Heraeus</i>
UV-Transilluminator	Raytest; <i>Isotopenmeßgeräte GmbH</i>
Ultrazentrifuge (UZ)	OPTIMA TI; <i>Beckman</i>
UZ Rotoren	TLA45 / TLA120.1 / TLA120.2; <i>Beckman</i>
Vortexer	Vortex-genie2; <i>Scientific industries</i>
Wasserbad	RM6; <i>LAUDA</i>
Zentrifuge	J2-HS; <i>Beckman</i>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Atm1p besitzt eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine

##### 3.1.1 Die Deletion des *ATM1* Gens führt zu einem Defekt in der Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p)

Atm1p ist ein ABC-Transporter, der in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist (Kispal et al., 1997). Um die Funktion von Atm1p aufzuklären, untersuchten wir einen charakteristischen Wachstumsphänotyp von Hefezellen, in denen das *ATM1* Gen deletiert war, und zwar die Leucinauxotrophie dieser Zellen. In der Hefe werden zur Synthese von Leucin drei enzymatische Schritte benutzt (Abb. 3). Diese werden von den Enzymen  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (Leu4p; Beltzer et al., 1988) (Leu9p; Pelzer and Lill, unveröffentlicht), Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) und  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2p) katalysiert. In diesen drei Reaktionen der Leucinbiosynthese wird  $\alpha$ -Ketoisovalerat in  $\alpha$ -Ketoisocaproat umgewandelt. Die Enzyme sind im Cytosol lokalisiert, wobei Leu4p auch in den Mitochondrien vorliegt. Wir testeten die Aktivität der drei Enzyme in Zellextrakten von Wildtyp- und  $\Delta atm1$ -Zellen (Abb. 4).

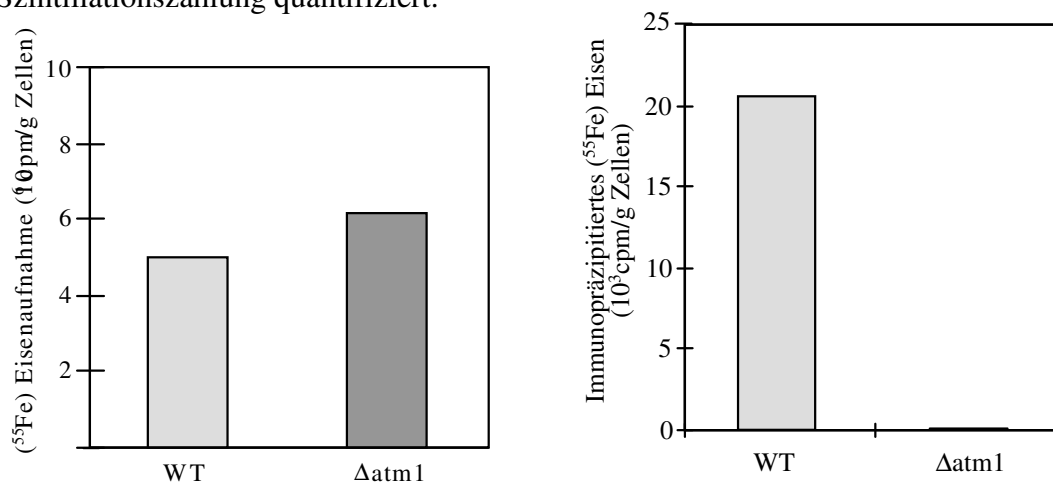


**Abb. 4. Die starke Reduktion der Aktivität der Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) ist verantwortlich für die Leucinauxotrophie von  $\Delta atm1$ -Zellen.** Gemessen wurden die Enzymaktivitäten der drei spezifischen Schritte der Leucinbiogenese in Zellextrakten von Wildtyp- und  $\Delta atm1$ -Zellen nach Wachstum auf Glukose-haltigem Minimalmedium in Anwesenheit von Leucin. Der Einschub zeigt das in den Zellextrakten vorhandene Leu1p durch Immunfärbung. Leu2p,  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase; Leu4p,  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase. N.B., nicht bestimmbar, d.h. weniger als 2,5 mU/mg Protein.

In  $\Delta atm1$ -Zellen wurden Wildtyp-Aktivitäten für  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase und  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase beobachtet (Abb. 4). Im Gegensatz dazu enthielten die Zellextrakte von  $\Delta atm1$ -Zellen keine meßbare Enzymaktivität der Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p). Durch Immunanfärbung konnten in  $\Delta atm1$ -Zellen Wildtyp-Mengen des Leu1p Proteins detektiert werden (Abb. 4, Einschub). Somit wird der enzymatische Defekt nicht durch eine gestörte Synthese der Leu1p Polypeptidkette hervorgerufen. Diese Ergebnisse legen nahe, daß Atm1p eine Rolle bei der Bildung von funktionellem Leu1p im Cytosol spielt.

### 3.1.2 Atm1p wird für den Einbau eines Fe/S-Clusters in ein cytosolisches Fe/S-Protein benötigt

Leu1p enthält einen Eisen-Schwefel (Fe/S)-Cluster und zeigt hohe Sequenzhomologie zu den Fe/S-Proteinen Aconitase und IRP1 ("iron regulatory protein"). Anhand unserer Ergebnisse wurde es wahrscheinlich, daß der Defekt in Leu1p in  $\Delta atm1$ -Zellen durch eine gestörte Bildung des Fe/S-Clusters dieses Proteins hervorgerufen wird. Um die Biogenese des Fe/S-Clusters von Leu1p zu verfolgen, wurde der Einbau von radioaktiv markiertem  $^{55}\text{Fe}$  in Leu1p *in vivo* gemessen (Abb. 5). Hefezellen wurden mit  $^{55}\text{Fe}$  für 1 h radioaktiv markiert und Zellysate präpariert. Leu1p wurde unter nativen Bedingungen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. Die Leu1p-assoziierte  $^{55}\text{Fe}$ -Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung quantifiziert.



**Abb. 5. Die Deletion von *ATM1* bewirkt einen Defekt in der Fe/S-Cluster-Biogenese von cytosolischem Leu1p.**  $\Delta atm1$ -Zellen weisen einen spezifischen Defekt in der *in vivo* Biogenese des Fe/S-Clusters von cytosolischem Leu1p auf. Wildtyp- und  $\Delta atm1$ -Zellen wurden mit  $^{55}\text{Fe}$  radioaktiv markiert, Zellysate wurden präpariert, und die  $^{55}\text{Fe}$ -Aufnahme durch Szintillationszählung quantifiziert. Immunpräzipitation mit einem anti-Leu1p-Antikörper wurde durchgeführt und co-präzipitiertes  $^{55}\text{Fe}$  durch Szintillationszählung quantifiziert. Als Hintergrundsignal wurde der Wert, der bei Immunpräzipitation mit Präimmenserum erhalten wurde, abgezogen. Der Standardfehler bei der Detektion von Leu1p-assoziiertem  $^{55}\text{Fe}$  im Zellysate lag bei 10%, die zelluläre Aufnahme von  $^{55}\text{Fe}$  variierte um 20% in unabhängigen Experimenten.

In Wildtyp-Zellen wurden signifikante Mengen an  $^{55}\text{Fe}$  mit dem Leu1p spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 5 rechts). Der Wert für die unspezifische Fällung mit Antikörpern, die aus Präimmunserum gewonnen wurden, war vernachlässigbar ( $\leq 2 \times 10^3$  cpm) und wurde abgezogen. Dieses Verfahren wurde auch bei den später folgenden Messungen dieser Art beibehalten. In Zellextrakten von  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen war keine spezifische Leu1p-Markierung mit radioaktivem  $^{55}\text{Fe}$  zu beobachten, obwohl die Aufnahme von radioaktivem  $^{55}\text{Fe}$  in  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen vergleichbar zu der in Wildtyp-Zellen war (Abb. 5 links).

Zusammenfassend zeigen unsere *in vivo* und *in vitro* Daten, daß die Biogenese des Fe/S-Clusters von cytosolischem Leu1p in Zellen gestört ist, in denen der mitochondriale ABC-Transporter Atm1p fehlt. Dies weist auf eine entscheidende Funktion von Atm1p bei der Biosynthese von cytosolischen Fe/S-Proteinen hin.

Weitergehende Untersuchungen von G. Kispal zeigen, daß die defekte Biosynthese des Fe/S-Clusters von Leu1p in Abwesenheit von funktionellem Atm1p eine primäre Ursache des Fehlens von Atm1p ist und nicht etwa auf den pleiotropen Phänotyp (Akkumulation von Eisen in Mitochondrien, stark geschwächtes Wachstum (Kispal et al., 1997)) von  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen zurückzuführen ist. Für diese Untersuchungen wurde eine Mutante konstruiert, in der das *ATM1* Gen unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors exprimiert wird (Kispal et al., 1999). Diese Mutante zeigt im Gegensatz zu  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen keinen merklichen Phänotyp nach 40 h Wachstum auf Glukose. Mit den Zellen wurden nach Depletion des Atm1p vergleichbare Leu1p-Defekte wie in  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen gemessen. Somit ist die gestörte Biosynthese des Fe/S-Clusters von cytosolischem Leu1p eine direkte Konsequenz des Defekts des mitochondrialen ABC-Transporters Atm1p.

## 3.2 Bat1p und Bat2p haben eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine

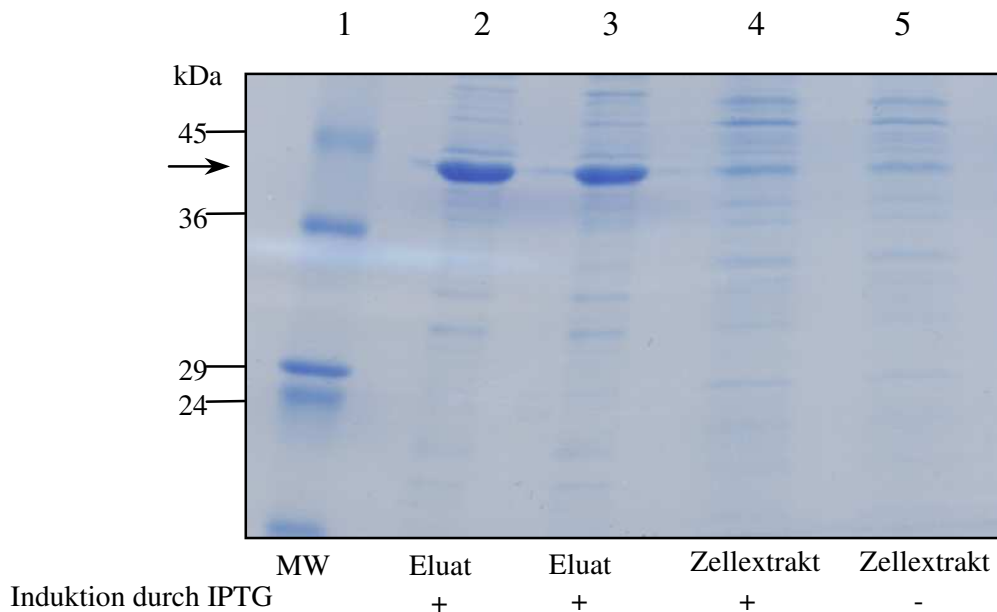
### 3.2.1 Die Bat Proteine besitzen eine Transaminase-Funktion

Bat1p wurde bei der Suche nach Interaktionspartnern von Atm1p identifiziert. *BAT1* ist ein "high copy suppressor" von temperatursensitiven *atm1*-Zellen und steht offensichtlich in funktionellem Zusammenhang mit Atm1p. In Hefe wurde ein zu Bat1p homologes Protein identifiziert. Dieses Protein Bat2p ist im Gegensatz zu Bat1p jedoch im Cytosol lokalisiert (Kispal et al., 1996). Beide Proteine wurden als Transaminasen verzweigtkettiger Aminosäuren charakterisiert. Um diese an Zellextrakten erhaltenen Ergebnisse zu erhärten, wurde Bat1p gereinigt und die Transaminaseaktivität bestimmt.

#### 3.2.1.1 Reinigung von Bat1p

Die Reinigung von Bat1p erfolgte nach Expression des Proteins in *E. coli*. Dazu wurde das *BAT1*-Gen im Leserahmen an die codierende Sequenz eines Hexahistidinyl-Restes (His6) im bakteriellen Vektor pQE30 fusioniert (*BAT1<sup>His6</sup>*), *E. coli* mit diesem Vektor transformiert und die Expression von Bat1p<sup>His6</sup> durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) induziert. Nach Lyse der Zellen konnte Bat1p<sup>His6</sup> durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Bat1p<sup>His6</sup> wurde in einer Reinheit von 60% erhalten (Abb. 6, Spur 2 und 3), obwohl der *E. coli* Proteinextrakt keine sichtbare Bande enthielt, d.h. nur eine relativ schwache Expression in *E. coli* erfolgte (Abb. 6, Spur 4).





**Abb. 6. Reinigung des Fusionsproteins Bat1p<sup>His6</sup>.** Das mit einer Hexahistidinyl-Sequenz fusionierte Bat1p (Bat1p<sup>His6</sup>) wurde aus Zellextrakten affinitätsgereinigt. Dies wurde mit *E. coli*-Zellen durchgeführt, die das Plasmid mit dem Fusionsgen *BAT1<sup>His6</sup>* enthielten. In den Zellen wurde die Expression von *BAT1<sup>His6</sup>* 3 h durch IPTG-Zugabe induziert, anschließend ein Zellextrakt hergestellt und dieser auf eine Affinitätsäule aufgetragen. Das Bat1p<sup>His6</sup> wurde über die Wechselwirkung der Histidinreste mit den Nickel-Ionen der Säule abgefangen. Das gebundene Fusionsprotein konnte durch Zugabe von 0,15 M EDTA im Puffer eluiert werden. Zwei proteinhaltige Fraktionen (Spur 2, 3) wurden im Vergleich zum Zellextrakt (Spur 4) auf ein 14%iges SDS-Gel aufgetragen und das Proteinmuster anschließend durch Anfärbung mit Coomassie-Brillantblau sichtbar gemacht. Der Pfeil zeigt die Bat1p Bande bei 42 kDa an. Zum Vergleich wurde parallel dasselbe Reinigungsverfahren mit Zellen durchgeführt, die ohne IPTG gewachsen waren. Das Proteinmuster dieser Zellextrakte (Spur 5) und der entsprechenden Fraktionen der Affinitätschromatographie (nicht dargestellt) wiesen keine auffällige Bande bei 42 kDa auf. MW, Molekulargewichtsmarker (Spur1).

### 3.2.1.2 Gereinigtes Bat1p ist als Transaminase aktiv

Die Aktivität des gereinigten Bat1p<sup>His6</sup> wurde in einem Transaminase-Enzymtest gemessen. Die Reaktion kann durch Kopplung mit der NAD(P)H-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion verfolgt werden. Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Somit kann die Bildung der verzweigt-kettigen Aminosäuren durch die Abnahme der NAD(P)H Konzentration bestimmt werden.

**Tab. 4. Messung der Transaminaseaktivität des gereinigten Bat1p<sup>His6</sup> im Vergleich zum Zellextrakt**

	<b>IPTG- Induktion</b>	<b>Protein- menge [mg]</b>	<b>Transaminase- aktivität [U<sub>gesamt</sub>]</b>	<b>Spezifische Transaminase- aktivität [U/mg]</b>
Zellextrakt	+	10	1	0.1
	-	10	0.15	0.015
Summe der Bat1p <sup>His6</sup> enthaltenden Fraktionen	+	0,12	0,5	4,2
	-	n.b.	<0,005	n.b.
Fraktion mit der höchsten Transaminase-Aktivität	+	0,005	0,12	24
	-	n.b.	<0,005	n.b.

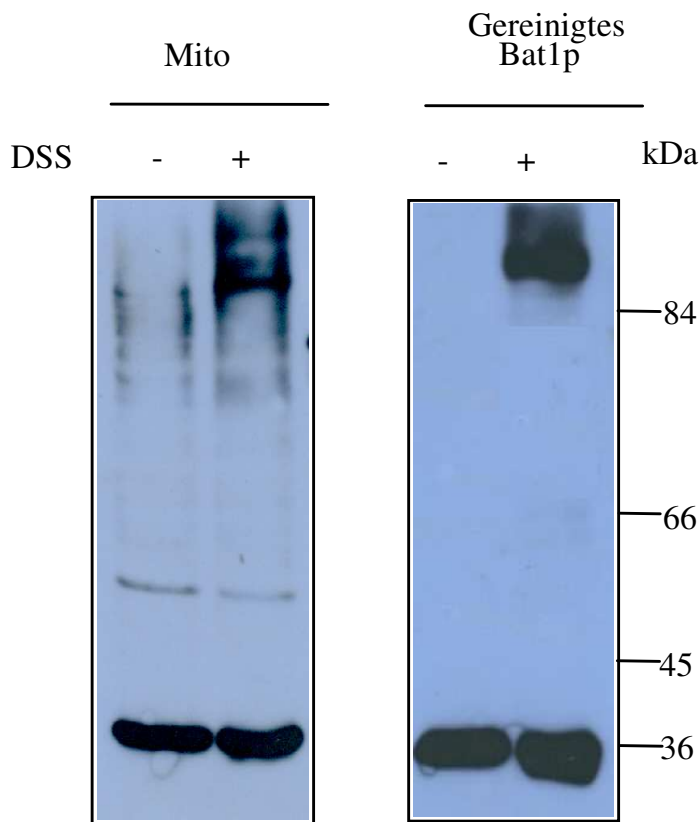
n.b., nicht bestimmbar, d.h. weniger als 0,001 mg.

Nach Induktion der Bat1p Expression durch IPTG wurde eine 6fach höhere Transaminaseaktivität im Zellextrakt gemessen (Tab. 4). Durch Reinigung von Bat1p erhöhte sich die spezifische Transaminaseaktivität um den Faktor 40 gegenüber dem Zellextrakt. Die spezifische Aktivität der Fraktion mit der höchsten Proteinmenge an Bat1p war sogar um das 200fache erhöht. Diese Fraktion enthielt mehr als 60% des gesamten Bat1p<sup>His6</sup> Proteins (Abb. 6). Ohne Induktion konnte in keiner eluierten Fraktion Aktivität bestimmt werden. Mit gereinigtem Bat1p<sup>His6</sup> konnte also die Funktion dieses Proteins als Transaminase nachgewiesen werden.

### 3.2.1.3 Bat1p bildet ein Dimer

Das gereinigte Bat1p Protein wurde in einen Quervernetzungsversuch eingesetzt, um zu prüfen, ob Bat1p in der Zelle als Monomer oder als Oligomer vorliegt. Als Quervernetzer wurde Disuccinimidylsuberat (DSS) eingesetzt, ein homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimid-Ester, der eine Quervernetzung von aminhaltigen Proteinen bewirkt. DSS ist wasserunlöslich und nicht spaltbar. Der Versuch zur Quervernetzung wurde sowohl mit gereinigtem Bat1p<sup>His6</sup> als auch mit Bat1p in isolierten Mitochondrien durchgeführt. Nach der Inkubation mit bzw. ohne DSS (Kontrolle) wurden die Mitochondrien gewaschen, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Bat1p Antikörper immungefärbt (Abb. 7). In den Ansätzen mit

gereinigtem Bat1p<sup>His6</sup> mußte das Protein nach der Inkubationsphase mit Trichloressigsäure gefällt werden, bevor es auf das SDS-Gel aufgetragen werden konnte (Abb. 7).



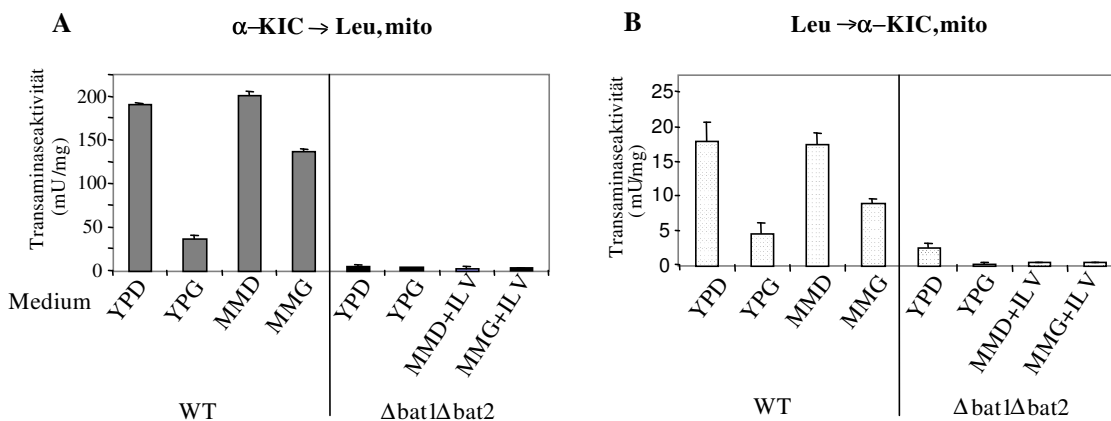
**Abb. 7. Bat1p liegt als Dimer vor.** Isolierte Mitochondrien oder gereinigtes Bat1p wurden für 30 min bei 0°C in SEM-Puffer ohne oder mit homo-bifunktionellem Quervernetzer DSS (Disuccinimidylsuberat) inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und in den Ansätzen mit gereinigtem Bat1p zusätzlich mit Trichloressigsäure gefällt. Anschließend wurden die Proteine dieser Proben über ein 12%iges SDS-Gel getrennt und danach auf Nitrozellulose transferiert. Die Immunfärbung mit Bat1p Antikörper detektierte eine Bande bei 90 kDa zusätzlich zu der monomeren Form von Bat1p bei 36 kDa. Die 90 kDa Bande entspricht der dimeren Form von Bat1p.

Bat1p zeigt im SDS-Gel eine apparente Molekularmasse von 36 kDa. Nach Quervernetzung des Mitochondrienextraktes oder des gereinigten Bat1p wurde eine zusätzliche Bande bei etwa 90 kDa detektiert (Abb. 7). Sehr wahrscheinlich entspricht diese Bande einem Dimeren des Bat1p, da ohne Zugabe des Quervernetzungsreagens' keine Immunreaktivität in diesem Molmassenbereich beobachtet wurde. Damit scheint Bat1p zumindest in dimerer Form vorzuliegen. Diese Ergebnisse passen gut zu den Befunden anderer Transaminasen, die auch als Dimere beschrieben wurden, beispielsweise Transaminasen in humanen Zellen (Davoodi et al., 1998).

### 3.2.2 Bestimmung der zweiten Funktion der Bat Proteine

#### 3.2.2.1 Die zweite Funktion der Bat-Proteine ist Transaminase-unabhängig

Die Bat Proteine sind als Transaminasen für die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren in der Hefe verantwortlich. In Zellen, die auf Medium mit ausreichenden Mengen an Aminosäuren wachsen, sind die für den Aminosäure-Biosyntheseweg spezifischen Enzyme durch das vorhandene Endprodukt gehemmt (Hinnebusch, 1992). Dadurch ist der gesamte Syntheseweg der verzweigtkettigen Aminosäuren und damit auch die Herstellung der  $\alpha$ -Ketosäuren unterbunden. Falls  $\alpha$ -Ketosäuren eine wichtige Funktion in der Zelle ausüben, könnte dies den Wachstumsdefekt von  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen auf Glukose-haltigem Vollmedium erklären. Bat-depletierte Zellen werden bei Wachstum auf Vollmedium zwar über das Medium ausreichend mit Aminosäuren versorgt, jedoch könnten in Abwesenheit der Bat Proteine nicht genügend verzweigtkettige  $\alpha$ -Ketosäuren synthetisiert werden, um die Zellen zu versorgen. Wenn allerdings andere Transaminasen genügend  $\alpha$ -Ketosäuren zur Verfügung stellen sollten, so spräche dies für eine Transaminase-unabhängige zusätzliche Funktion der Bat Proteine. Um diese Fragen zu untersuchen, wurde die Umwandlung von Leucin zur entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäure ( $\alpha$ -Ketoisocaproat) und im Vergleich dazu die entgegengesetzte Reaktion von  $\alpha$ -Ketoisocaproat zu Leucin in Wildtyp- und  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen verfolgt, die auf verschiedenen Medien kultiviert wurden (Abb. 8).

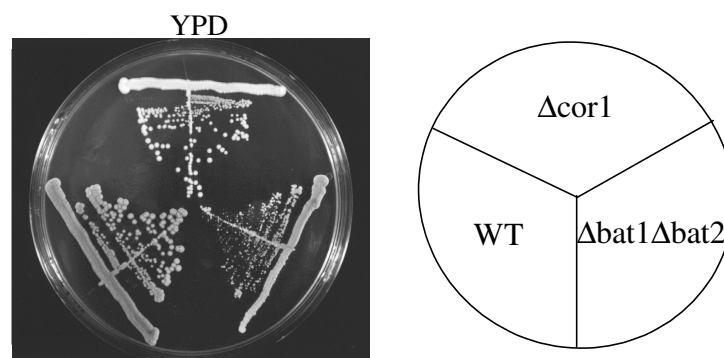


**Abb. 8. Messung der Transaminaseaktivitäten in Mitochondrien.** Aus Wildtyp- und  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen, die auf verschiedenen Medien gewachsen waren, wurden Mitochondrien (mito) isoliert. In den isolierten Mitochondrien wurde die Transaminaseaktivität bestimmt.

**A.** Bestimmung der Transaminaseaktivität unter Benutzung von  $\alpha$ -Ketoisocaproat ( $\alpha$ -KIC) als Substrat. Diese Reaktion wurde *in vitro* über einen an die NADH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion gekoppelten Test gemessen. Die Oxidation von NADH wurde photometrisch bestimmt. Leu, Leucin. **B.** Enzymaktivitäten der Rückreaktion, d.h. der Synthese von  $\alpha$ -KIC aus Leucin. Diese Reaktion wurde über die Bildung eines Hydrazons der  $\alpha$ -Ketosäure verfolgt.

Die Transaminaseaktivität wurde in isolierten Mitochondrien mit Leucin bzw.  $\alpha$ -Ketoisocaproat als Substrat gemessen. Die Organellen wurden aus Wildtyp- und  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen gewonnen, wobei die Zellen auf verschiedenen Medien gewachsen waren. Die gemessene mitochondriale Transaminaseaktivität entspricht der Aktivität von Bat1p, da in Bat1p defizienten Mitochondrien praktisch keine Aktivität mehr beobachtet wurde. Die Werte lagen bei der Aktivitätsmessung mit  $\alpha$ -Ketoisocaproat als Substrat in den Mitochondrien von  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen fast im nicht-meßbaren Bereich (Abb. 8A). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Aktivitätsmessung mit Leucin als Substrat für Mitochondrien aus Zellen erzielt, die auf YPG oder Minimalmedium angezogen waren (Abb. 8B). Eine signifikante Transaminaseaktivität wurde jedoch in den Mitochondrien von  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen, die auf Vollmedium mit Glukose (YPD) gewachsen waren, beobachtet. In diesen Mitochondrien wurde eine Aktivität von 5 mU/mg gemessen, die vergleichbar ist zu der Aktivität in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen, die auf Vollmedium mit Glyzerin (YPG) gewachsen waren. Daraus kann gefolgert werden, daß eine gestörte Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren in Mitochondrien nicht der Grund für das reduzierte Wachstum von  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen auf YPD-Medium sein sollte.

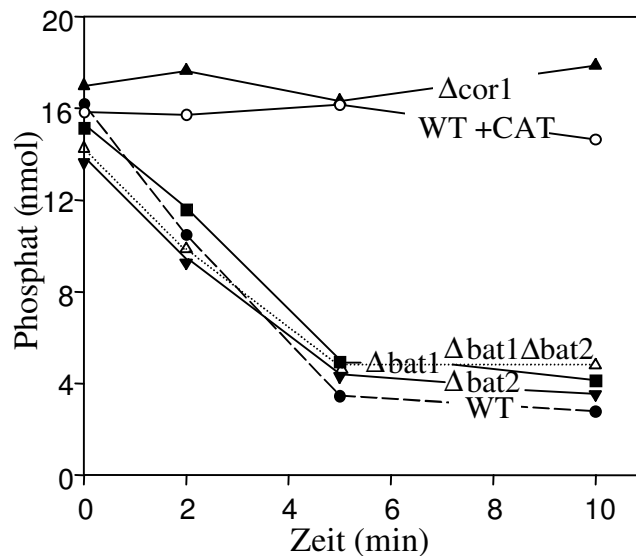
Um in diesem Zusammenhang der Frage nachzugehen, ob das reduzierte Wachstum der Doppelmutante auf Glukose-haltigem Medium auf einen Defekt in der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurde das Wachstum von  $\Delta bat1\Delta bat2$ - und  $\Delta cor1$ -Zellen auf YPD-Medium verglichen (Abb. 9).  $\Delta cor1$ -Zellen sind defizient in einer zentralen Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette, wodurch die Zellen einen Atmungsdefekt aufweisen (Tzagoloff and Dieckmann, 1990).



**Abb. 9. Wachstumsvergleich von  $\Delta bat1\Delta bat2$ - und  $\Delta cor1$ -Zellen bei Kultivierung auf Vollmedium mit Glukose (YPD).** Die Zellen wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert. WT, Wildtyp.

$\Delta cor1$ -Zellen wachsen aufgrund ihres Atmungskettendefekts langsamer auf Vollmedium mit Glukose als Wildtyp-Zellen (Abb. 9). Da auf diesem Medium  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen ein noch viel langsames Wachstum aufweisen, kann die in diesen Zellen vorliegende Störung nicht oder zumindest nicht allein durch einen Atmungsdefekt zu erklären sein. Eine Bestätigung

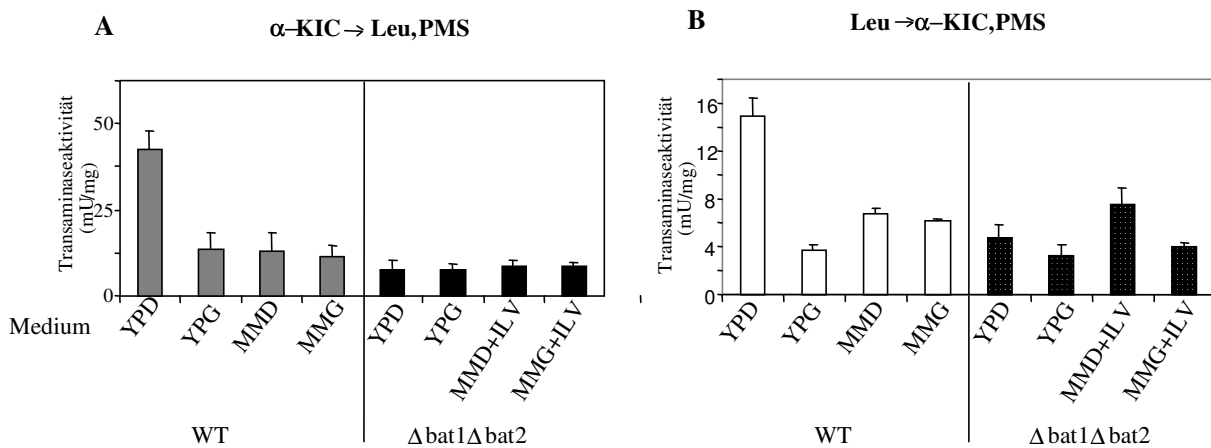
dieses Ergebnisses lieferte die Messung der Membranpotential-getriebenen ATP-Produktion in  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 10). In diesem Versuchsansatz wurde das Membranpotential durch die Zugabe von NADH gebildet, und die Synthese von ATP aus anorganischem Phosphat und ADP durch die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATPase anhand der Abnahme der Phosphatmenge verfolgt (Nargang et al., 1995).



**Abb. 10. Bat Protein-defiziente Zellen sind funktionell in der oxidativen Phosphorylierung.** Für die Messung der Membranpotential-getriebenen ATP-Bildung wurden zuerst Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen und Zellen, die defizient in Bat Protein oder Cor1p waren, isoliert. Die Mitochondrien wurden in Puffer bei 25°C inkubiert. Ein Membranpotential wurde durch Zugabe von NADH gebildet. Die Synthese von ATP aus ADP und freiem Phosphat wurde indirekt an der Abnahme freien anorganischen Phosphats, welches durch den Malachit-Grün-Test gemessen wurde, verfolgt. Kein Einbau von Phosphat in ADP wurde beobachtet, wenn der ADP/ATP-Carrier durch Zugabe von 50 nM Carboxyatractylosid (CAT) blockiert wurde bzw. wenn das Membranpotential durch Weglassen von NADH nicht aufgebaut werden konnte (nicht gezeigt).

Bat Protein-defiziente Zellen sind funktionell in der oxidativen Phosphorylierung und unterscheiden sich hierbei nicht von Wildtyp-Zellen (Abb. 10). Wie zu erwarten wiesen  $\Delta cor1$ -Zellen einen vollständigen Defekt in dieser Reaktion auf. Zusammenfassend belegen diese Daten, daß der Wachstumsdefekt der  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen auf YPD-Medium nicht in einer Störung der Atmungskette begründet ist.

Im folgenden wurde das Interesse auf das cytosolische Bat2p gerichtet. Wie oben für isolierte Mitochondrien beschrieben, wurde die Hin- und Rückreaktion der Transaminierung in postmitochondrialem Überstand (Cytosol und Membranbestandteile) aus Zellen, die auf verschiedenen Medien gewachsen waren, gemessen (Abb. 11).



**Abb. 11. Messung der Transaminaseaktivitäten in postmitochondrialem Überstand.** In postmitochondrialem Überstand (PMS) aus Wildtyp(WT)- und  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen wurde die Transaminaseaktivität mit  $\alpha$ -Ketoisocaproat ( $\alpha$ -KIC) bzw. Leucin (Leu) als Substrat bestimmt. **A.** Enzymaktivitäten der Reaktion von  $\alpha$ -Ketoisocaproat zu Leucin (s. Abb. 8A). **B.** Enzymaktivitäten der Rückreaktion, d.h. der Synthese von  $\alpha$ -KIC aus Leucin (s. Abb. 8B).

Die Transaminaseaktivitäten für die Umsetzung von Leucin zu  $\alpha$ -Ketoisocaproat sind im postmitochondrialen Überstand von  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen vergleichbar mit denen in Wildtyp-Zellen (Abb. 11B). Dies beweist - noch deutlicher als die Beobachtung in Mitochondrien (Abb. 8B) -, daß die Synthese der  $\alpha$ -Ketosäuren aus den verzweigtkettigen Aminosäuren nicht wesentlich gestört ist nach Deletion der *BAT* Gene. Unabhängig vom Wachstumsmedium ist die Reaktion von Leucin zu  $\alpha$ -Ketoisocaproat vergleichbar im postmitochondrialen Überstand aus Wildtyp- und aus  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen. Auf YPD wurde zwar eine 2,5 fache Erniedrigung der Transaminaseaktivität in  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen gemessen, doch diese Aktivität von etwa 4 mU/mg wurde auch für  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen nach Wachstum auf YPG-Medium beobachtet, auf dem die Zellen Wildtyp-Wachstum aufwiesen.

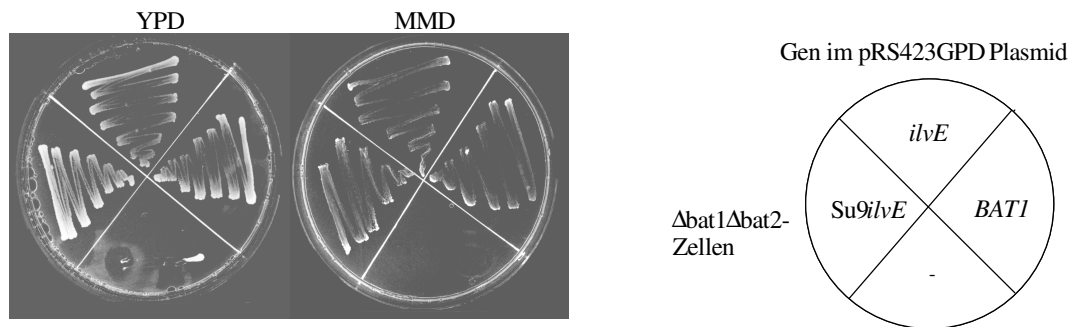
Eine ähnliche Erklärung gilt für die umgekehrte Transaminasereaktion im PMS (Abb. 11A). Auch mit  $\alpha$ -KIC als Substrat ist in  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen eine katalytische Aktivität der Transaminierung wie in Wildtyp-Zellen festzustellen. Offensichtlich übernehmen im Cytosol andere Transaminasen die Funktion von Bat2p, während Bat1p in Mitochondrien den Hauptanteil der Transaminierung bewerkstelligt (s. Abb. 8).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen bei Wachstum auf Glukosehaltigem Vollmedium (YPD) noch ausreichende Transaminaseaktivität zur Synthese der  $\alpha$ -Ketosäuren besitzen. Deshalb kann der Wachstumsdefekt der Bat Protein-defizienten Zellen auf YPD Medium nicht durch die verminderte Transaminaseaktivität erklärt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Bat Proteine eine Transaminase-unabhängige zweite Funktion in der Zelle besitzen.

3.2.2.2 Bakteriellens *ilvE* besitzt ebenfalls eine zweite Funktion

IlvE ist ein zu den Bat Proteinen homologes Protein aus *E. coli*. Die Funktion als Transaminase zur Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren wurde schon beobachtet (Lee-Peng et al., 1979). Es war nun von Interesse zu prüfen, ob ein in Hefezellen exprimiertes IlvE nur die Transaminase-Funktion ausübt oder ob es darüber hinaus auch die zweite, Transaminase-unabhängige Funktion der Bat Proteine ersetzen kann. Für die Untersuchungen wurde das *ilvE* Gen aus dem *E. coli* Genom über PCR gewonnen. Das *ilvE* Gen wurde in einen Hefevektor kloniert, um eine Expression des IlvE Proteins im Cytosol der Hefe zu erreichen. In einen anderen Vektor wurde *ilvE* in Fusion mit dem C-Terminus der mitochondrialen Zielsequenz der F<sub>0</sub>-Untereinheit der ATPase (Su9) aus *Neurospora crassa* kloniert. Nach Transformation dieses Vektors in  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen wurde das IlvE Fusionsprotein in die Mitochondrien transportiert.

A



B

Stamm	Gen in pRS423GPD	mU/mg	
		MMD	YPD
WT	-	380	410
$\Delta bat1\Delta bat2$	-	80	85
$\Delta bat1\Delta bat2$	<i>BAT1</i>	519	615
$\Delta bat1\Delta bat2$	<i>ilvE</i>	418	400
$\Delta bat1\Delta bat2$	<i>Su9ilvE</i>	440	421

**Abb. 12. Der Wachstumsdefekt von  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen wird durch Expression der *E. coli* Transaminase IlvE aufgehoben.** Das über PCR aus der genomischen DNA von *E. coli* gewonnene *ilvE* Gen wurde in den Hefevektor pRS423GPD kloniert. Zur Expression von IlvE in Mitochondrien wurde das Gen an die 3'-Seite der codierenden Information für die mitochondriale Signalsequenz Su9 kloniert.  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen wurden mit diesen beiden *ilvE*-Plasmiden und zum Vergleich mit dem Ausgangsvektor oder einem p423RSGPD-*BAT1* Plasmid transformiert. **A.** Die Zellen wurden auf Voll(YPD)- und Minimalmedium für drei Tage bei 30°C inkubiert. **B.** Messung der Transaminaseaktivitäten. Der Ablauf der Reaktion von  $\alpha$ -Ketoisocaproat zu Leucin wurde in Zellextrakten verfolgt (s. Abb. 8A).



Die Expression des IlvE komplementiert vollständig den Wachstumsphänotyp von  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen, unabhängig von der Lokalisierung des IlvE und vom verwendeten Medium (Abb. 12A). IlvE erhöht die Transaminaseaktivität in  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen auf Werte von Wildtyp-Zellen (Abb. 12B).

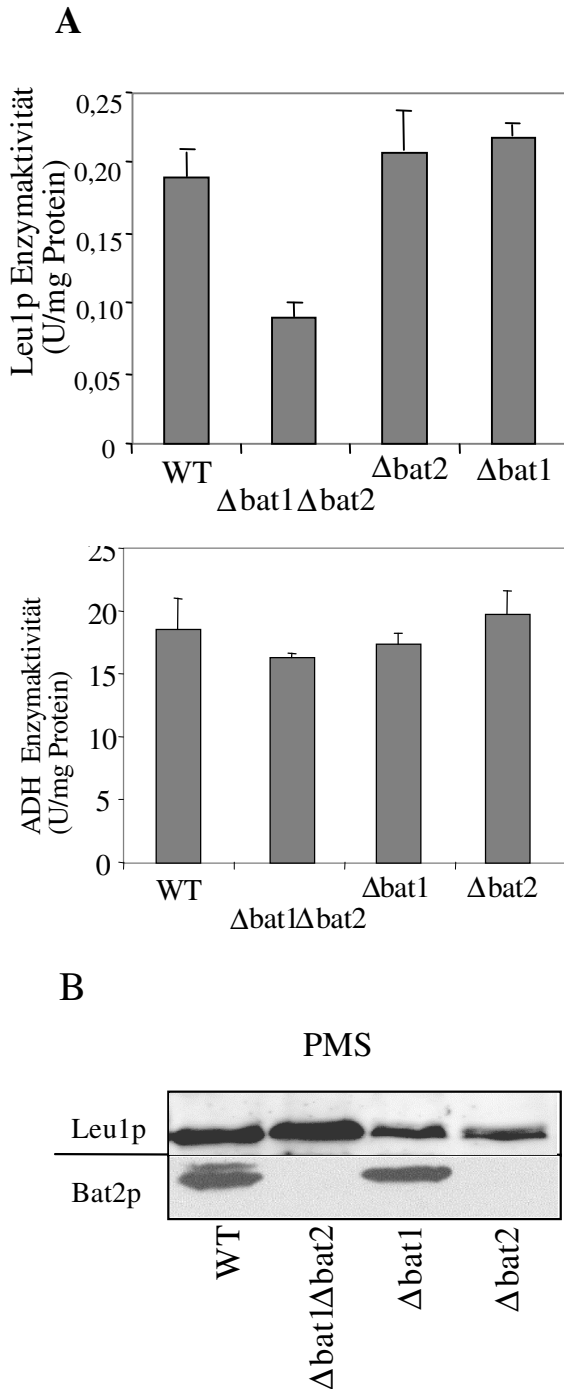
Da IlvE sowohl die fehlende Transaminaseaktivität der  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen ersetzen kann als auch Wildtypwachstum auf YPD-Medium hervorruft, wird durch diese Versuche nahegelegt, daß das bakterielle Protein zusätzlich zur schon beschriebenen Transaminase-Funktion eine zweite Funktion in der Zelle ausübt. IlvE kann damit als Orthologes der Bat Proteine betrachtet werden und scheint beide Funktionen dieser Proteine erfüllen zu können.

### 3.2.2.3 Die Bat Proteine besitzen eine Funktion in der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine

Aus bisherigen Daten bleibt offen, was die zweite Funktion der Bat Proteine sein könnte. Da im Laufe dieser Arbeit eine Beteiligung von Atm1p an der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 3.1, Kispal et al., 1999), lag es wegen der genetischen Wechselwirkung zwischen Atm1p und Bat1p nahe zu prüfen, ob auch die Bat Proteine eine Funktion in der Biogenese von cytosolischen Fe/S-Proteinen ausüben.

#### 3.2.2.3.1 In $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen ist die Aktivität des cytosolischen Fe/S-Proteins Leu1p reduziert

Als Modellprotein für ein Fe/S-Protein im Cytosol wurde Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) gewählt (vgl. Kapitel 3.1). Die Aktivität von Leu1p wurde in Zellextrakten von  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen im Vergleich zu den Aktivitäten in Extrakten aus den Einzelmutanten und aus Wildtyp-Zellen gemessen (Abb. 13).



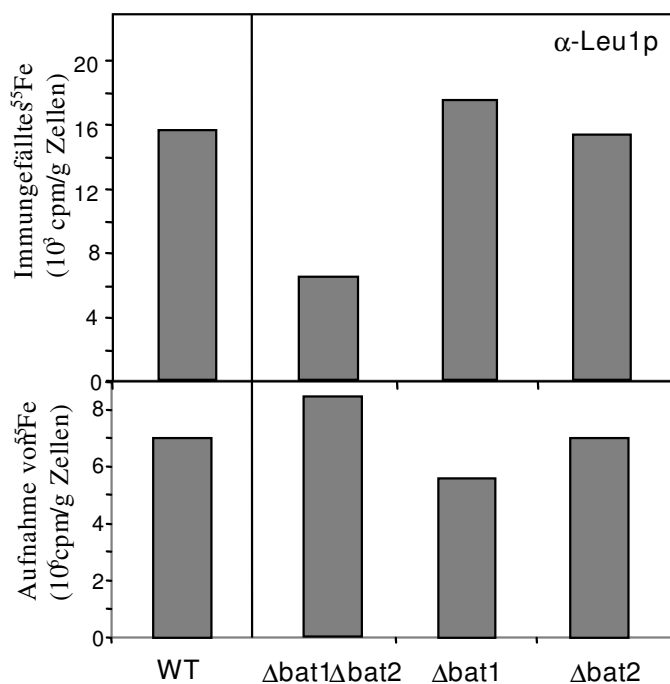
**Abb. 13. Die Aktivität von Leu1p ist in  $\Delta bat1 \Delta bat2$ -Zellen reduziert.** **A.** Wildtyp(WT)-,  $\Delta bat1$ -,  $\Delta bat2$ - und  $\Delta bat1 \Delta bat2$ -Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium mit Glukose kultiviert. Ein Zellysate wurde durch Öffnen der Zellen mit Glasperlen hergestellt. Die Aktivität der Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) und die der Alkoholdehydrogenase (ADH) wurden sogleich bestimmt. Die Aktivität von Leu1p konnte über die Messung der Absorption bei 235 nm von Dimethylcitrat, ein Intermediärprodukt dieser Reaktion, erfolgen. Die Reaktion der Alkoholdehydrogenase wurde über die Zunahme der Extinktion durch die NADH-Bildung bei 340 nm verfolgt. **B.** Die Proteine des postmitochondrialen Überstandes (PMS) wurden mit SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die cytosolischen Proteine Leu1p und Bat2p wurden mit spezifischen Antikörpern durch Immundekoration angefärbt. WT, Wildtyp.

In Zellextrakten von Einfachmutanten und Wildtyp-Zellen wurden vergleichbare Enzymaktivitäten gefunden (Abb. 13A). In Extrakten der Doppelmutante wurde jedoch eine fast dreifache Reduktion der Aktivität der Isopropylmalat-Isomerase gegenüber Wildtyp-Zellen gemessen, obwohl die Expression dieses Proteins in den  $\Delta bat1\Delta bat2$ -Zellen leicht erhöht gegenüber der in anderen Zellen war (Abb. 13B). Die Aktivität des nicht-Fe/S-Clusterhaltigen Enzyms Alkoholdehydrogenase war in allen Zellextrakten vergleichbar.

Aus diesem Ergebnis wird deutlich, daß die Bat Proteine für die normale Aktivität eines cytosolischen Fe/S-Cluster-haltigen-Enzyms wichtig sind. In Analogie zu den Befunden in Atm1p-defizienten Zellen (Kap. 3.1) ist daher zu vermuten, daß die Bat Proteine an der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine beteiligt sind.

### 3.2.2.3.2 Die Bat Proteine sind notwendig für den Einbau der Fe/S-Cluster in cytosolische Apoproteine

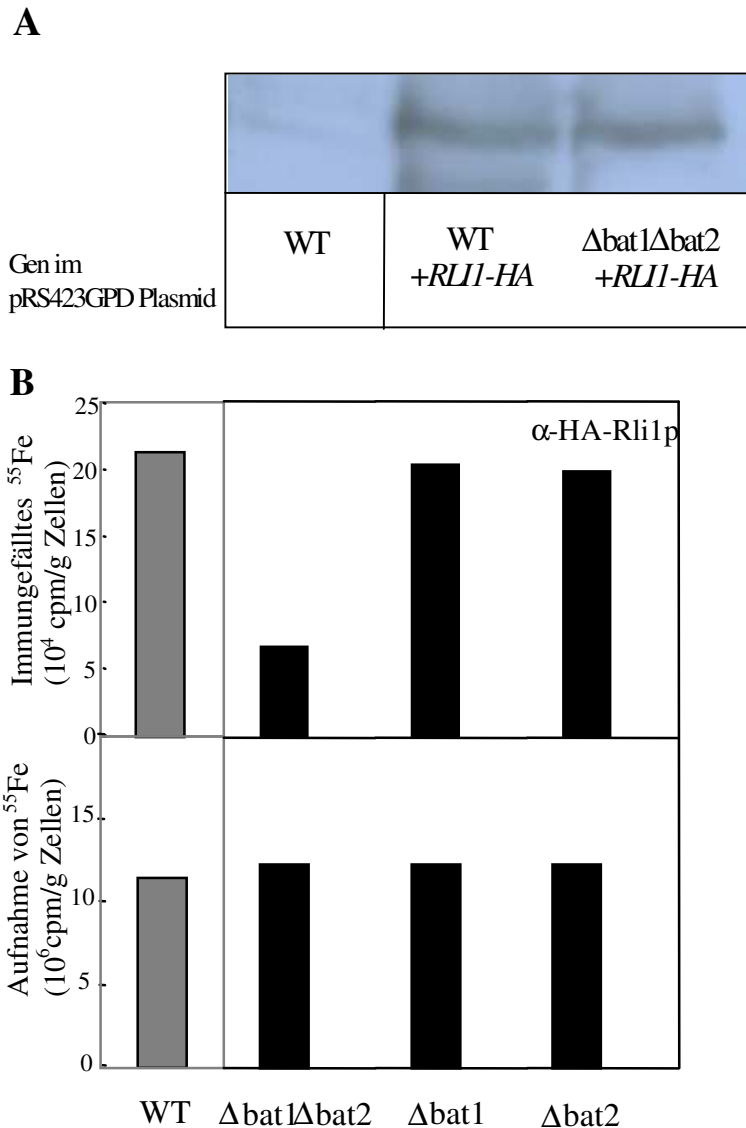
Zur direkten Messung des *de novo* Einbaus des Fe/S-Clusters in die Isopropylmalat-Isomerase wurde der Einbau von  $^{55}\text{Fe}$  in Leu1p durch Immunpräzipitation gemessen (vgl. Kap. 3.1.2) (Abb. 14).



**Abb. 14. Bat1p und Bat2p haben eine Funktion beim Einbau des Fe/S-Clusters in das cytosolische Protein Leu1p.** Die Zellen wurden über Nacht in eisenfreiem Minimalmedium mit Glukose kultiviert. Sie wurden mit [ $^{55}\text{Fe}$ ]-Eisenchlorid unter Anwesenheit von 1 mM Ascorbat für 1 h radioaktiv markiert. Zellysate wurden präpariert und die Aufnahme von  $^{55}\text{Fe}$  über Szintillationszählung quantifiziert (unten). Immunpräzipitation mit anti-Leu1p Antikörper ( $\alpha$ -Leu1p) wurde durchgeführt und co-präzipitiertes  $^{55}\text{Fe}$  wurde über Szintillationszählung bestimmt (oben). WT, Wildtyp.

Coimmunpräzipitiertes  $^{55}\text{Fe}$  dient als Maß für die Insertion eines Fe/S-Clusters in Leu1p. In  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellextrakten wurde zweimal weniger coimmunopräzipitiertes  $^{55}\text{Fe}$  nachgewiesen im Vergleich zu Wildtyp-Zellextrakten (Abb. 14). Dies zeigt, daß in  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen die Biogenese des Fe/S-Clusters für Leu1p gestört ist. Der Defekt im Einbau des Fe/S-Clusters kann damit für den Aktivitätsverlust von Leu1p in  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen verantwortlich gemacht werden (Abb. 13A).

In  $\Delta\text{atm1}$ -Zellen waren die Aktivität des Leu1p und die Neubildung des Fe/S-Clusters von Leu1p sehr stark reduziert (Kap. 3.1). Demgegenüber war der Effekt in  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen relativ gering. Deshalb war es erforderlich, die Ergebnisse mit Leu1p am Beispiel eines weiteren cytosolischen Fe/S-Proteins zu überprüfen. Das Protein RNase L Inhibitor 1 (Rli1p) wurde für diese Untersuchungen gewählt. Rli1p besitzt zwei Domänen, die je einen Fe/S-Cluster binden können, und zwei Domänen, die ATP-Bindedomänen von ABC-Transportern ähnlich sind. Da kein Antikörper gegen Rli1p zur Verfügung stand, wurde das Hämagglutinin(HA)-System verwendet. Dabei macht man sich eine ausgewählte Sequenz von HA zunutze, die von einem monoklonalen Antikörper erkannt wird. Der Expressionsvektor pRS423GPD+*RLI-HA* (von G.Kispal zur Verfügung gestellt) codiert für ein Rli1p Protein, das am C-Terminus diese HA-Markierung trägt. Wildtyp- und  $\Delta\text{bat1}\Delta\text{bat2}$ -Zellen wurden mit diesem Vektor transformiert. Die Expression des Rli1p-HA war in beiden Zellen vergleichbar (Abb. 15A). Der Einbau der Fe/S-Cluster in Rli1p wurde ähnlich wie bei Leu1p anhand der Menge an radioaktivem  $^{55}\text{Fe}$  verfolgt, die durch HA-spezifische Antikörper immunfällbar war (Abb. 15B).



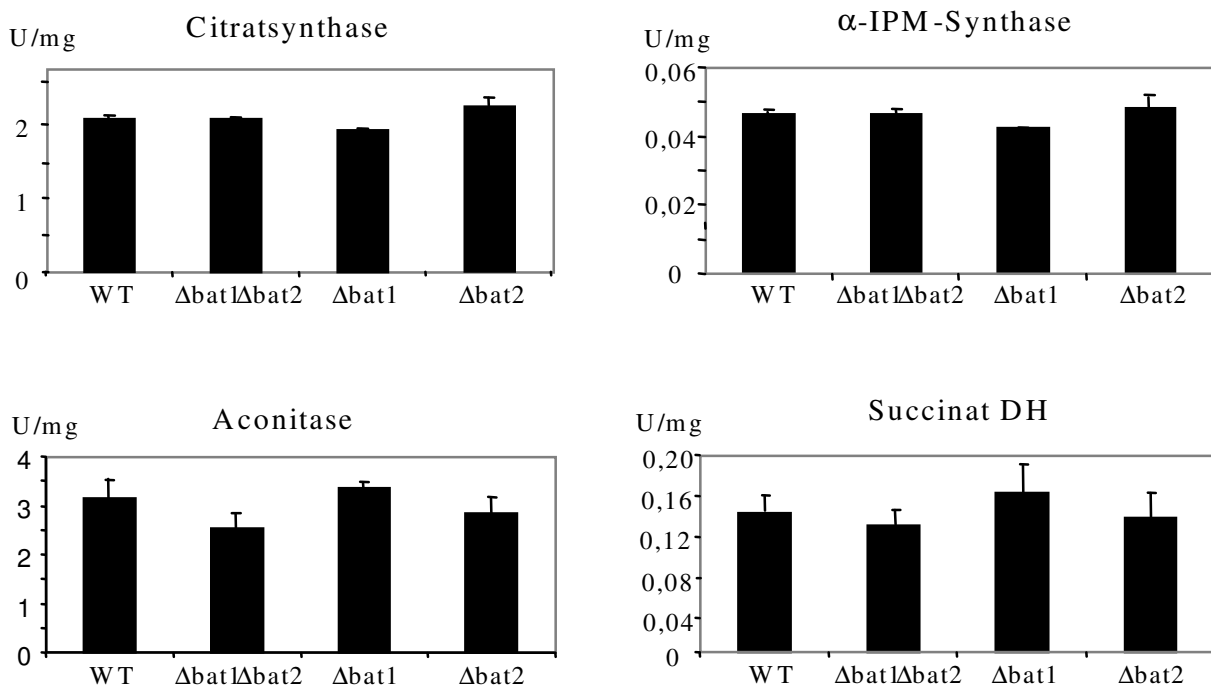
**Abb. 15.  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen zeigen einen Defekt in der Biogenese des Fe/S-Clusters des cytosolischen Proteins Rli1p.** **A.** Immundekorationsanalyse von Zellen, die ein HA-markiertes Rli1p exprimieren. *RLI1* wurde in Fusion mit einer Sequenz des Hämagglutinins (HA) in den Hefevektor pRS423GPD kloniert. Die mit diesem Vektor transformierten Hefezellen wurden aufgeschossen, die Proteine dieser Zellextrakte über SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Mit Hilfe eines HA-Antikörpers konnte Rli1p in Wildtyp(WT)- und  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen detektiert werden. **B.** Der Einbau von Eisen in den Fe/S-Cluster von Rli1p-HA wurde nach radioaktiver Markierung der Wildtyp- und  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen durch Immunpräzipitation mit dem HA-Antikörper verfolgt (vgl. Abb. 14). Alle Zellen waren transformiert mit dem Vektor pRS423GPD-*RLI1-HA*.

Die <sup>55</sup>Fe-Aufnahme in Wildtyp- und Bat Protein-defiziente Zellen war vergleichbar (Abb. 15B unten). Jedoch war die Menge an <sup>55</sup>Fe, die mit Anti HA-Antikörper immungefällt werden konnte, in Extrakten von  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen dreifach erniedrigt im Vergleich zu Wildtyp-Zellextrakten (Abb. 15B oben). Dies zeigt, daß der Einbau von Fe/S-Clustern in Rli1p in

Abwesenheit der Bat Proteine gestört ist. Die Ergebnisse mit Rli1p sind daher vergleichbar zum gestörten Fe/S-Cluster-Einbau in cytosolisches Leu1p (Abb. 14).

#### 3.2.2.4. Die Bat Proteine werden für die Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine nicht benötigt

Es war nun wichtig zu überprüfen, ob die Bat Proteine an der Bildung mitochondrialer Fe/S-Proteine beteiligt sind. Dazu wurde in isolierten Mitochondrien die Aktivität von mitochondrialen Enzymen, die einen Fe/S-Cluster tragen (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase), verfolgt. Zum Vergleich wurde die Aktivität von mitochondrialen Proteinen ohne Fe/S-Cluster (Citratsynthase,  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase) gemessen (Abb. 16).



**Abb. 16. Messung der Aktivität mitochondrialer Enzyme in isolierten Mitochondrien.** Die Aktivität der Citratsynthase wurde anhand der Freisetzung von Coenzym A verfolgt, das über die Reaktion mit Dithionitrobenzoat (DTNB) bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen werden konnte. Die Reaktion der  $\alpha$ -IPM-Synthase ( $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase) konnte gleichermaßen mit Hilfe von DTNB photometrisch bestimmt werden. Aconitase katalysiert die reversible Isomerisierung von Citrat über einen Übergangszustand (cis-Aconitat) zu Isocitrat. Die Umwandlung des Aconitats zu Isocitrat kann bei 240 nm gemessen werden. Die Aktivität der Succinat DH wurde durch Kopplung an die Reaktion des Komplexes III der Atmungskette gemessen. Die durch die Reaktion der Succinat DH (Succinat-Dehydrogenase) gelieferten Elektronen werden vom Komplex III auf Cytochrom c übertragen. Das reduzierte Cytochrom c absorbiert Licht der Wellenlänge 550 nm.

In den Mitochondrien waren in den  $\Delta bat1 \Delta bat2$ -Zellen die Aktivitäten aller gemessenen Enzyme, unabhängig davon ob sie einen Fe/S-Cluster besitzen oder nicht, vergleichbar mit den Aktivitäten in Wildtyp-Zellen und in den Einzelmutanten (Abb. 16). Die Menge dieser Proteine war nicht wesentlich verändert (nicht gezeigt). Die Bat Proteine üben damit keine

Funktion in der Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine aus. Offensichtlich besitzen sie eine spezifische Funktion bei der Bildung von cytosolischen Fe/S-Proteinen. Diese Funktion der Bat Proteine ist vergleichbar mit der von Atm1p, das ebenso für die Bildung cytosolischer, nicht aber mitochondrialer Fe/S-Proteine von Bedeutung ist (vgl. Kap. 3.1.2, Kispal et al., 1999).

Aus den dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß die Bat Proteine neben der Funktion in der Biosynthese von Isoleucin, Leucin und Valin an der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine beteiligt sind. Die genaue molekulare Funktion der Bat Proteine an diesem Prozeß benötigt weitere Untersuchungen.

### 3.3 Isu1p und Isu2p sind funktionell beteiligt an der Biogenese sowohl cytosolischer als auch mitochondrialer Fe/S-Proteine

#### 3.3.1 Die Familie der Isu/IscU Proteine

Nfs1p stellt als Cysteindesulfurase den molekularen Schwefel zur Verfügung, der für die Bildung sowohl mitochondrialer als auch cytosolischer Fe/S-Proteine benötigt wird (Kispal et al., 1999). Nfs1p ist mitochondrial lokalisiert, bei einer Fehllokalisierung im Cytosol ist die Fe/S-Cluster-Biosynthese der Zelle defekt. Demnach erfolgt die Bereitstellung von molekularem Schwefel für die Biogenese von Fe/S-Clustern mitochondrialer und cytosolischer Proteine ausschließlich in den Mitochondrien. Damit stellt sich die Frage, ob auch das Eisen cytosolischer Fe/S-Proteine transient durch die Mitochondrien transportiert wird und welches mitochondriale Protein das Eisen in die Fe/S-Cluster-Synthese einschleust. Vor kurzem wurde NifU aus *Azotobacter vinelandii* als eisenbindendes Protein charakterisiert (Yuvaniyama et al., 2000). Das an NifU gebundene Eisen wurde als Substrat zur Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters durch enzymatische Aktivität des NifS verwendet. Dieser Cluster war nur transient gebunden und dissoziierte nach Zugabe von Reduktionsmitteln ab. Der transient gebundene Cluster wird über drei konservierte Cysteine am N-Terminus von NifU gebunden.

In der Hefe wurden zwei Proteine, Isu1p und Isu2p, identifiziert, die zum N-Terminus des bakteriellen NifU eine starke Ähnlichkeit aufweisen (Schilke et al., 1999; Garland et al., 1999). Die Isu Proteine sind zu 80% in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Abb. 17). Ein Sequenzvergleich zeigte eine erstaunlich hohe Konservierung über den gesamten Aminosäurebereich zwischen den Isu Proteinen der Hefe und den IscU Proteinen anderer Organismen. Die *isc* Gene wurden erstmals in *A. vinelandii* identifiziert und es wurde postuliert, daß sie eine Rolle in der Biogenese von Fe/S-Clustern spielen (Zheng et al., 1998). In allen homologen Proteinen sind konservierte Cysteine (Aminosäurereste 69, 96 und 139 in Isu1p), an die Eisen potentiell binden kann, vorhanden.





**Abb. 17. Sequenzvergleich von Isu1p und Isu2p mit weiteren IscU Proteinen.** Die Aminosäuresequenzen der Isu Proteine aus Hefe wurden mit denen der IscU Proteine aus verschiedenen Organismen mit Hilfe des Computerprogramms "MultiAlin" (Corpet, 1988) verglichen. Grau hinterlegt sind die Aminosäuren, die in allen hier verglichenen Proteinen identisch sind, hellgrau hervorgehoben sind die nur in einigen verglichenen Proteinen identischen Aminosäuren. Die Pfeile zeigen die konservierten Cysteinreste, die in NifU die Bindung von Eisen vermitteln. Sc, *S. cerevisiae*; At, *Arabidopsis thaliana*; Av, *Azotobacter vinelandii*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Hi, *Haemophilus influenza*; Ec, *E. coli*; Rp, *Rickettsia prowazekii*; Hs, *Homo sapiens*.

Gegenüber den bakteriellen Proteinen zeigen die Isu1p und Isu2p Proteine eukaryontischer Herkunft eine N-terminale Verlängerung, die eine hohe Anzahl an positiv geladenen und hydroxylierten Aminosäuren besitzt und daher als mitochondriale Präsequenz fungieren könnte (siehe unten).

### 3.3.2 Deletion der ISU Gene

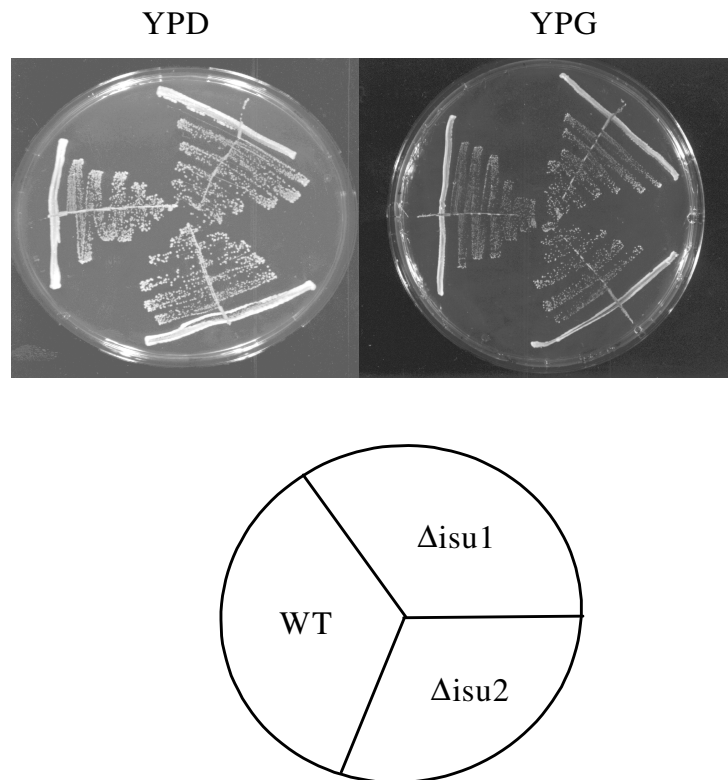
Um eine Lokalisierung und funktionelle Charakterisierung der Isu Proteine zu ermöglichen, wurden Mutanten hergestellt, in denen jeweils ein ISU Gen deletiert war. Zur Herstellung dieser Mutanten wurden ISU1 oder ISU2 im diploiden Hefestamm W303α/a deletiert. Für die Disruption wurde eine Methode verwendet, bei der das jeweilige ISU Gen durch ein DNA Stück mit einem HIS3-Markergen ersetzt wurde. Dieses DNA Stück wurde mit Hilfe der PCR mit dem pFA6a-His-Plasmid (Wach et al., 1994) als Matrize und den Oligonukleotiden Isu111 bzw. Isu211 (enthalten einen homologen Bereich zur 5' Region des ISU1 bzw. ISU2 Gens) und Isu121 bzw. Isu221 (enthalten einen homologen Bereich zur 3' Region des ISU1 bzw. ISU2 Gens) durchgeführt. Nach Transformation des diploiden Hefestammes W303α/a mit dem gereinigten PCR-Produkt kam es in einzelnen Zellen zu einer homologen Rekombination zwischen den terminalen Regionen des PCR-Produkts und den homologen 5'- und 3'-Bereichen

der *ISU1* bzw. *ISU2* Gene. Dabei wurden die codierenden Bereiche der *ISU1* bzw. *ISU2* Gene durch ein *HIS3*-Markergen ersetzt. Die transformierten Zellen wurden auf histidinfreien Agarplatten als Zellrasen ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die prominent gewachsenen Kolonien wurden zur Überprüfung der Histidinauxotrophie nochmals auf demselben Medium ausplattiert. Die Deletion des *ISU1* bzw. *ISU2* Genes wurde durch PCR (Oligonukleotide Isu 112 und Isu 122 bzw. Isu 212 und Isu 222) bestätigt.

Die diploiden Hefezellen W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu1 bzw. W303 $\alpha$ /a $\Delta$ isu2 wurden auf einer Agarplatte mit Sporulationsmedium zur Sporenbildung gebracht. Anschließend wurde eine Tetradendisektion zur Trennung der Ascosporen durchgeführt. Nach vier Tagen Inkubation der Sporen bei 30°C auf Vollmedium mit Glukose waren jeweils vier gleichgroße Kolonien gewachsen (nicht gezeigt). Die so erhaltenen haploiden Hefezellen wurden auf Minimalmedium mit Glukose ohne Histidin ausplattiert, um zu prüfen, bei welchen Kolonien die *ISU* Gene im Hefegenom disruptiert waren. Zur weiteren Überprüfung dieser Zellen wurde eine PCR durchgeführt. Jeweils zwei der Ascosporen wiesen eine Deletion der *ISU* Gene auf (nicht gezeigt).

### 3.3.3 $\Delta$ isu1- und $\Delta$ isu2-Zellen zeigen keinen Wachstumsphänotyp

Um den Wachstumsphänotyp nach Disruption der *ISU* Gene zu bestimmen, wurden Wildtyp-,  $\Delta$ isu1- und  $\Delta$ isu2-Hefezellen auf fermentierbaren (Glukose) und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Glyzerin) ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert (Abb. 18).



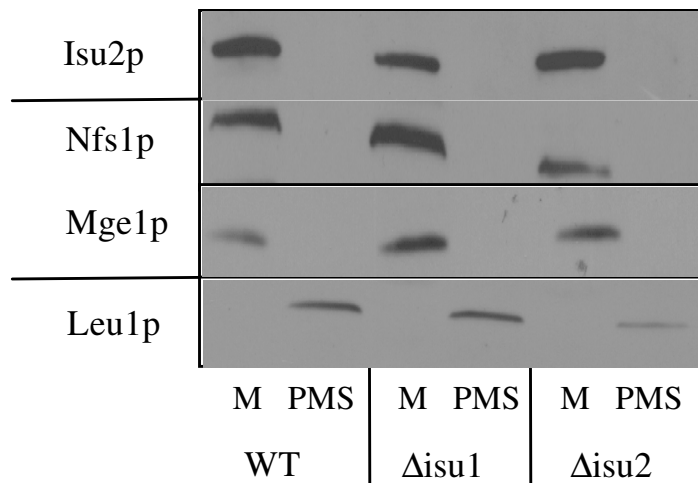
**Abb. 18. Wachstum der Wildtyp-,  $\Delta$ isu1- und  $\Delta$ isu2-Hefezellen auf verschiedenen Medien.**  $\Delta$ isu1- und  $\Delta$ isu2-Hefezellen zeigten auf den verschiedenen Medien im Vergleich zu Wildtyp den gleichen Wachstumsphänotyp. Die Deletion eines einzelnen *ISU* Gens hat keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zelle.

Die  $\Delta$ isu1- und  $\Delta$ isu2-Zellen zeigten auf beiden Medien Wildtyp-Wachstum (Abb. 18). Offensichtlich wirkt sich die Depletion eines Isu Proteins nicht auf das Wachstum von Hefe aus. Es ist daher zu vermuten, daß die Isu Proteine eine überlappende Funktion in der Zelle ausüben und sich gegenseitig ersetzen können. Dies läßt sich aus der äußerst hohen Sequenzidentität der beiden Proteine gut verstehen. Da die Doppeldeletion der *ISU* Gene jedoch letal ist (Schilke et al., 1999), scheinen die Isu Proteine eine zentrale Rolle in der Zelle zu spielen.

### 3.3.4 Subzelluläre Lokalisierung der Isu Proteine

Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisierung der Isu Proteine wurden Wildtyp-,  $\Delta$ isu1- und  $\Delta$ isu2-Zellen verwendet. Dazu wurden Mitochondrien und postmitochondrialer Überstand (PMS) aus diesen Zellen hergestellt, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und über Immundekorationsanalyse mit spezifischen Antikörpern

detektiert. Aufgrund der sehr großen Homologie von Isu1p und Isu2p war es uns nicht möglich, spezifische Antikörper gegen jedes Protein zu produzieren. Der Isu Antikörper detektiert damit sowohl Isu1p als auch Isu2p.

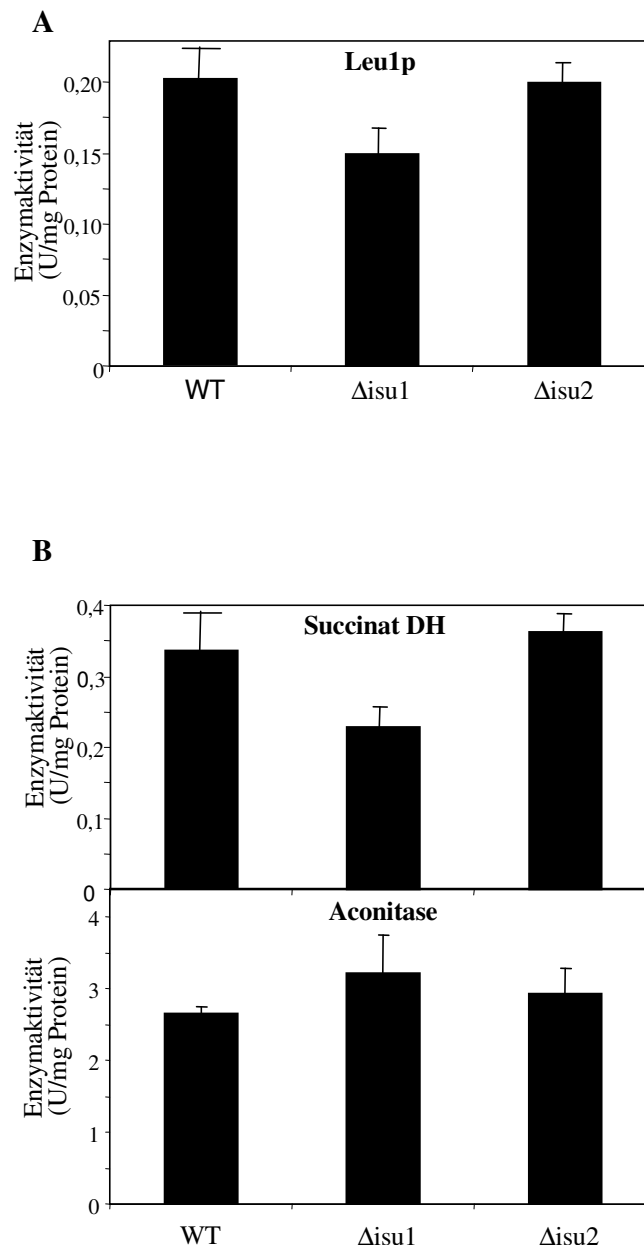


**Abb. 19. Mitochondriale Lokalisierung von Isu1p und Isu2p.** Die Proteine von isolierten Mitochondrien (M) und postmitochondrialem Überstand (PMS) aus Wildtyp-, Δisu1- und Δisu2-Zellen wurden über SDS-PAGE getrennt. Durch Immundekoration mit einem spezifischen Isu Antikörper (erkennt sowohl Isu1p als auch Isu2p) wurde gezeigt, daß die beiden Isu Proteine ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die Reinheit der Mitochondrien und der PMS-Fractionen wurde mit Antikörpern bekannter Proteine dieser Kompartimente nachgewiesen (Nfs1p und Mge1p: Matrixproteine und Leu1p: Cytosol).

Isu1p und Isu2p sind ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert (Abb. 19). Antikörper bekannter Proteine konnten die Reinheit der isolierten Mitochondrien nachweisen. Parallel zu diesem Versuch konnte die mitochondriale Lokalisierung der Proteine auch von zwei anderen Arbeitsgruppen bestimmt werden (Schilke et al., 1999; Garland et al., 1999).

### 3.3.5 $\Delta$ isu1- und $\Delta$ isu2-Zellen zeigen keine signifikante Veränderung in der Aktivität von Fe/S-Cluster-haltigen Enzymen

Ausgehend von der Vermutung, daß Isu1p und Isu2p bei der Fe/S-Cluster Synthese beteiligt sind, wurde die Aktivität von Fe/S-Cluster-haltigen-Enzymen gemessen. Als cytosolisches Protein wurde die Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) gewählt (Abb. 20A), als mitochondriale Fe/S-Proteine Aconitase und Succinat-Dehydrogenase (Abb. 20B).



**Abb. 20. Die Aktivitäten zellulärer Fe/S-Cluster-haltiger-Enzyme sind nach Deletion von *ISU1* oder *ISU2* unverändert.** **A.** Enzymaktivität von cytosolischer Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p). Die Messungen wurden mit Zellextrakten wie unter Abb. 13A beschrieben durchgeführt. **B.** Enzymaktivitäten von mitochondrialer Aconitase und Succinat-Dehydrogenase (Succinat DH). Die Aktivitäten wurden in isolierten Mitochondrien wie unter Abb. 16 angegeben bestimmt.

Die drei getesteten Fe/S-Cluster-haltigen-Enzyme waren in ihrer Aktivität in Isu1p- oder Isu2p-defizienten Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt (Abb. 20). Dies paßt recht gut zum unveränderten Wachstum der Deletionszellen. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß die Einzeldelentionsmutanten nicht zur funktionellen Analyse der *ISU* Gene geeignet sind.

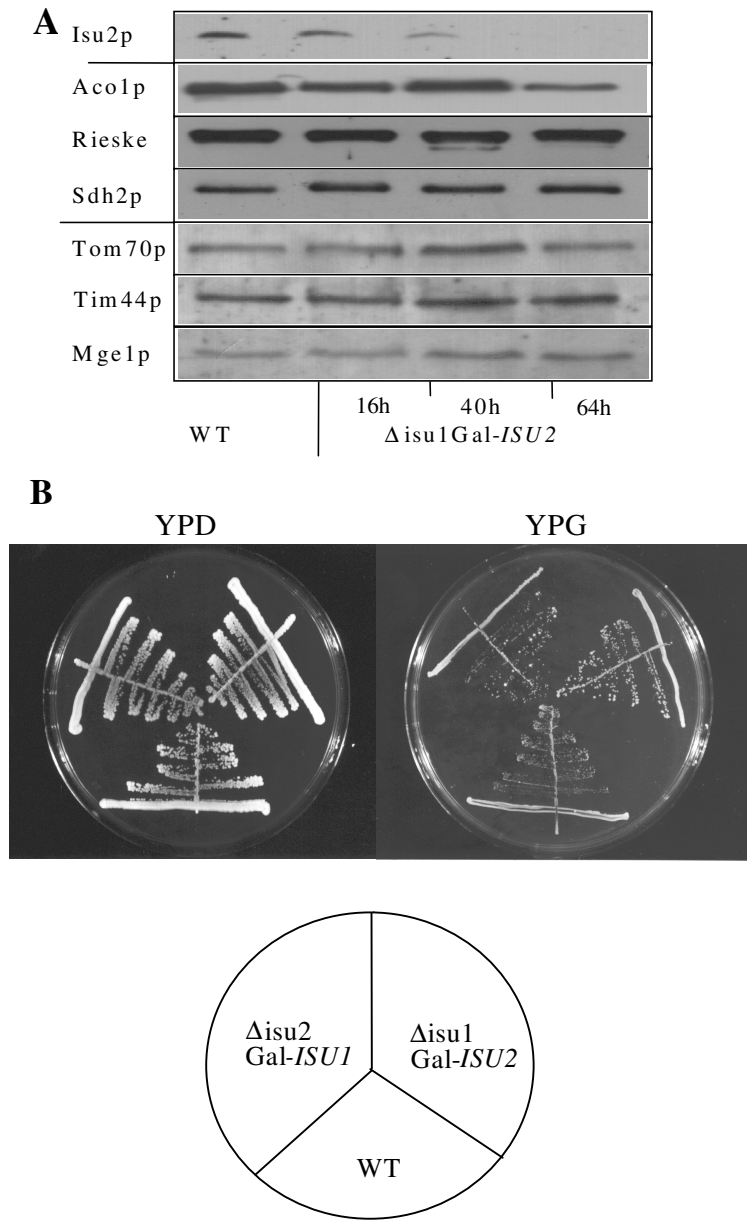
### 3.3.6 Herstellung von $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*- bzw. $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen zur regulierten Expression der Isu Proteine

Da die Doppeldeletion der *ISU* Gene letal für die Zelle ist, mußte eine andere Strategie zur Untersuchung der Funktion der Isu Proteine angewandt werden. Dazu wurden Mutanten hergestellt, in denen jeweils eines der beiden *ISU* Gene deletiert war und das andere unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors stand.

Um den Promotor des *ISU1* bzw. *ISU2* Gens gegen einen Galaktose-induzierbaren Promotor auszutauschen, wurde folgendermaßen vorgegangen. Für jedes Gen wurden zwei PCR-Stücke benötigt. Das eine entsprach der codierenden Sequenz von *ISU1* (Nukleotide -3 bis 522) oder *ISU2* (Nukleotide -24 bis 474). Das andere war zur Region unmittelbar vor dem Startcodon der Gene (Nukleotide -310 bis -4 bei *ISU1*, Nukleotide -314 bis -25 bei *ISU2*) homolog. Diese PCR-Fragmente wurden jeweils in die *Bam*HI-*Hind*III (PCR-Fragment der codierenden Region) und *Hind*III-*Hpa*I Restriktionsschnittstellen eines Yep51 Vektors, der den *GAL10* Promotor trägt, kloniert. Die Plasmid-DNA wurde durch *Hind*III Spaltung linearisiert und so zur Transformation von  $\Delta$ isu1- bzw.  $\Delta$ isu2-Hefezellen verwendet. Um Zellen zu identifizieren, bei denen das DNA-Stück in die genomische DNA integriert war, wurde auf den *LEU2* Auxotrophiemarker, den das inserierte DNA-Fragment enthält, selektiert. Die erfolgreiche Integration an die Stelle eines *ISU* Gens im Hefegenom wurde über PCR überprüft (*ISU1*: Oligonukleotide Isu 112 und Leu2 11, *ISU2*: Isu 212 und Leu2 11). Die Zellen mit erfolgreichem Austausch des Eigenpromotors durch einen Galaktose-induzierbaren Promotor wurden als  $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Stämme bezeichnet. Diese Zellen wurden phänotypisch charakterisiert.

**3.3.7  $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen zeigen keinen wesentlichen Wachstumsphänotyp**

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten dieser Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auf verschiedenen Medien beobachtet (Abb. 21).

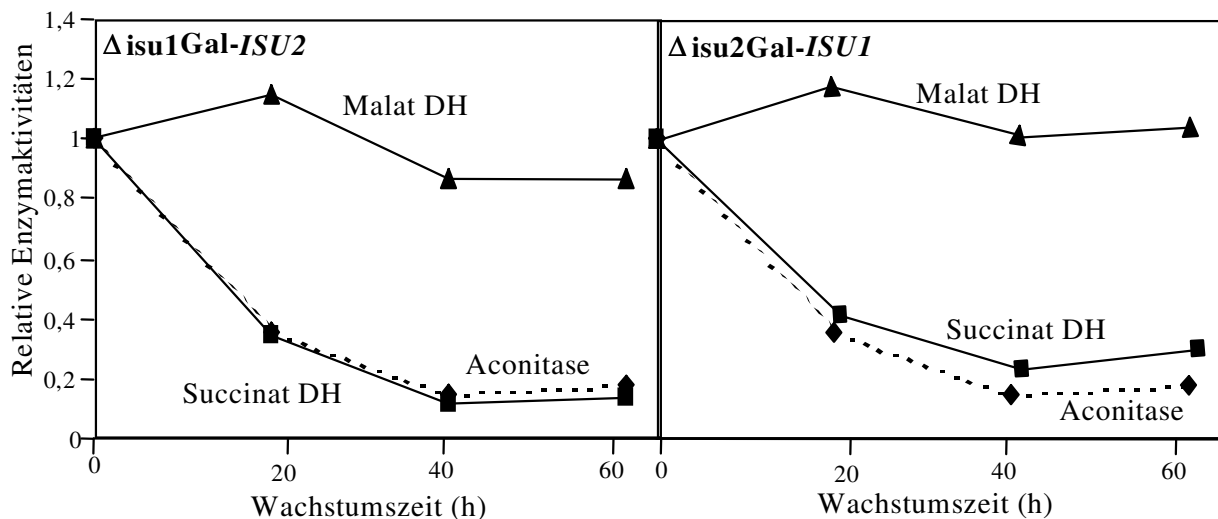


**Abb. 21.  $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen zeigen auf galaktosefreiem Agarmedium keinen Wachstumsphänotyp.** **A.** Immundekorationsanalyse. Die Wildtyp (WT)- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen wurden auf Medium mit Glukose gezüchtet. Das Wachstum von  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen wurde nach 16, 40 oder 64 h beendet. Die Mitochondrien wurden isoliert, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Mit einem spezifischen Antikörper konnte Isu2p detektiert werden. Zum Vergleich wurde die Immundekoration mit Antikörpern durchgeführt, die verschiedene mitochondriale Proteine erkennen. **B.** Wachstum der Zellen auf Vollmedium. Wildtyp-Zellen und Isu Protein-depletierte Zellen wurden für drei Tage bei 30°C auf Vollmedium mit Glukose (YPD) oder Glycerin (YPG) kultiviert.

Bei Wachstum der  $\Delta isu1Gal-ISU2$ -Zellen auf galaktosefreien Medien wurde eine Depletion des Isu2p beobachtet (Abb. 21A). Für  $\Delta isu2Gal-ISU1$ -Zellen wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (nicht gezeigt). Andere mitochondriale Proteine waren nach Depletion der Isu Proteine nicht merklich reduziert. Doch weder  $\Delta isu2Gal-ISU1$ - noch  $\Delta isu1Gal-ISU2$ -Zellen zeigten nach drei Tagen eine signifikante Reduktion des Wachstums relativ zu Wildtyp-Zellen (Abb. 21B). Es ist bekannt, daß die Expression von Genen unter Kontrolle des *GAL10* Promotors nicht vollständig abgestellt werden kann. Offensichtlich genügt diese geringe Menge an Isu Proteinen, um ein normales Wachstum zu erhalten. Da längere Wachstumszeiträume auf Agarplatten nicht zu verfolgen sind, wurden die Zellen in Flüssigmedium ohne Galaktose inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte eine Wachstumsminderung nach drei Tagen beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß Hefezellen eine drastische Reduktion der zellulären Konzentration der Isu Proteine ohne wesentlichen Einfluß auf das Wachstumsverhalten tolerieren. Offensichtlich genügt eine geringe Menge an Isu Proteinen, um deren Funktion zu erfüllen.

### 3.3.8 Die Depletion der Isu Proteine führt zu einem Defekt in der Biogenese von Fe/S-Clustern mitochondrialer Proteine

Die Aktivitäten einiger ausgewählter mitochondrialer Fe/S-Proteine (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) wurden im Vergleich zur Malat-Dehydrogenase, die keinen Fe/S-Cluster enthält, gemessen (Abb. 22).

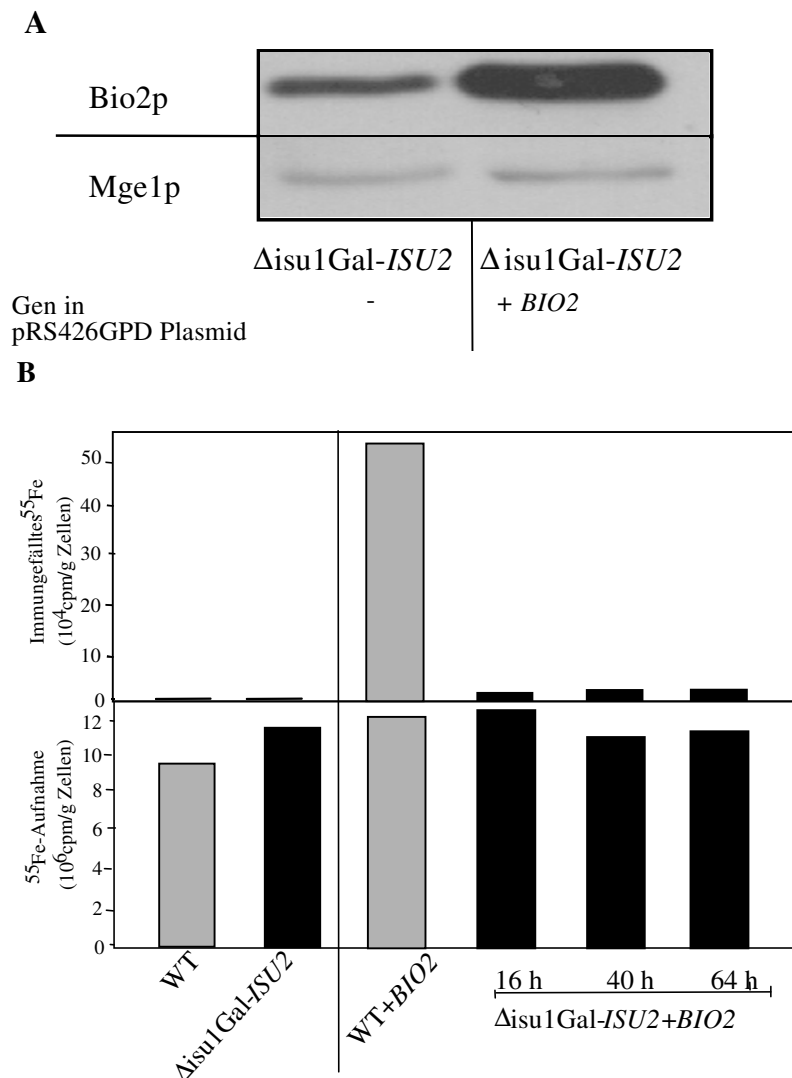


**Abb. 22. Die Depletion der Isu Proteine führt zu einer Inaktivierung mitochondrialer Fe/S-Cluster-haltiger Enzyme.** Die Wildtyp-,  $\Delta isu2Gal-ISU1$ - und  $\Delta isu1Gal-ISU2$ -Zellen wurden für 0, 16, 40 oder 64 h in Laktatmedium mit Glukose (Glu) kultiviert. Anschließend wurden Mitochondrien isoliert und die mitochondrialen Aktivitäten der Enzyme Succinat DH, Aconitase (Methode, vgl. Abb. 16) und Malat DH gemessen. Die Aktivität der Malat DH wurde anhand des Verbrauchs von NADH bei der Bildung von Malat aus Oxalacetat gemessen. Angegeben sind die Enzymaktivitäten der Isu Protein-depletierten Zellen relativ zu den Aktivitäten, die in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen gemessen wurden. DH, Dehydrogenase.



Nach Depletion der Isu Proteine war die Aktivität mitochondrialer Fe/S-Proteine (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) um den Faktor 7 bis 10 gegenüber Wildtyp-Zellen reduziert (Abb. 22), obwohl die Expression dieser Proteine in allen Zellen vergleichbar war (Abb. 21A). Ein nicht-Fe/S-Cluster-haltiges Enzym zeigte in allen Zellen vergleichbare Aktivitäten.

Um die *de novo* Biosynthese von Fe/S-Clustern zu verfolgen, wurde die Biotinsynthase (Bio2p) als mitochondriales Fe/S-Modellprotein genutzt (Abb. 23). Dazu wurde das *BIO2* Gen in einen Expressionsvektor (pRS426GPD) kloniert und dieser Vektor in Wildtyp- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen transformiert. Nach Wachstum auf Minimalmedium wurden Zellextrakte hergestellt und die Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Menge an Bio2p durch Immundekoration zu überprüfen (Abb. 23A). Dabei konnte eine deutliche Überexpression (mindestens 10fach) von Bio2p in Zellen mit dem Vektor pRS426GPD+*BIO2* beobachtet werden. Bio2p war in den Mitochondrien lokalisiert (nicht gezeigt).



**Abb. 23. Die Depletion der Isu Proteine führt zu einem Defekt in der Biosynthese des Fe/S-Clusters von mitochondrialem Bio2p. A.** Immundekorationsanalyse zur Überprüfung der Überexpression von Bio2p. In die Analyse wurden isolierte Mitochondrien eingesetzt, die aus  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen, transformiert mit dem angegebenen Plasmid, isoliert wurden

(weitere Methode s. Abb. 18A). **B.** Wildtyp- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen wurden mit dem Plasmid pRS426GPD+*BIO2* oder dem Ausgangsvektor transformiert und anschließend auf Glukose-haltigem Medium kultiviert. Um *in vivo* den Einbau des Fe/S-Clusters in Bio2p studieren zu können, wurde die Assoziation von radioaktiv markiertem [ $^{55}\text{Fe}$ ]-Eisen mit Bio2p gemessen (oben, Methode s. Abb. 5). Die Depletion der Isu Proteine hatte eine deutliche Reduktion des Einbaus von Eisen in Bio2p zur Folge. Die Eisenaufnahme war in allen Zellen gleich hoch (unten). (cpm = Zählereignisse pro Minute).

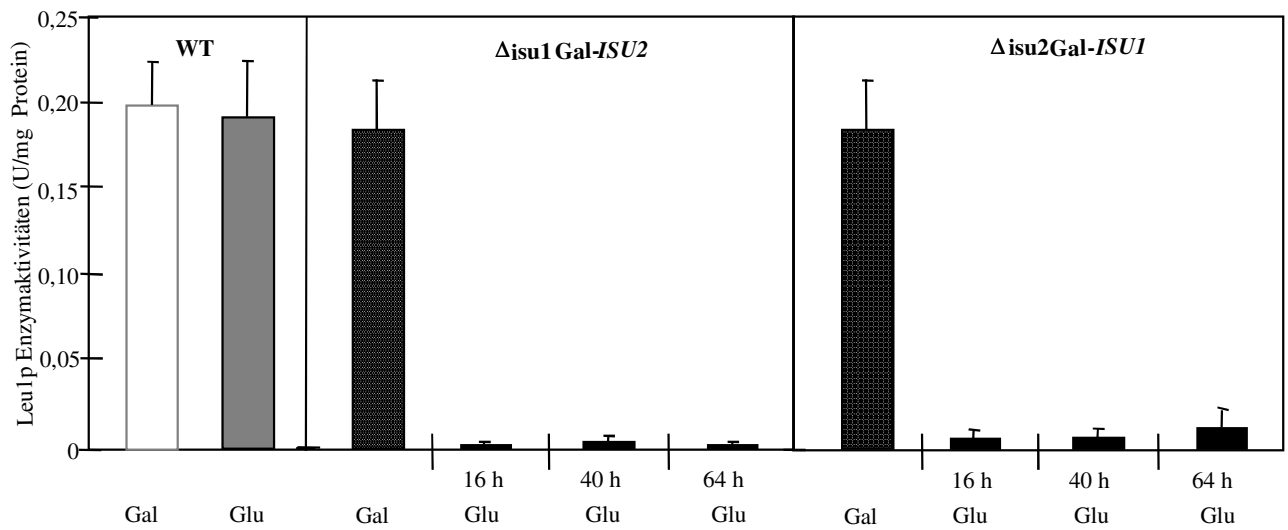
Wildtyp- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen, in denen Bio2p überexprimiert oder in Wildtyp-Konzentrationen vorlag, wurden für 16, 40 und 64 h auf Glukose-haltigem Medium kultiviert. In diesen Zellen wurde die *de novo* Synthese des Fe/S-Clusters von Bio2p gemäß dem in Kap. 3.1.2 beschriebenen Versuchsablauf gemessen. In Wildtyp- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen war nahezu kein Einbau von  $^{55}\text{Fe}$  in Bio2p zu messen (Abb. 23B, oben links). Der Einbau von  $^{55}\text{Fe}$  in zelleigenes Bio2p kann über diesen Versuchsansatz also nicht detektiert werden. Erst nach Überexpression von Bio2p wurden auswertbare Daten erhalten. So war der Einbau von Eisen in überexprimiertes Bio2p in Wildtyp-Zellen deutlich meßbar. Im Vergleich dazu war er jedoch in Isu Protein-depletierten Zellen etwa um den Faktor 40 reduziert (Abb. 23B, oben rechts). Da die Aufnahme von  $^{55}\text{Fe}$  in alle Zellen in ähnlichem Ausmaß erfolgte, hat die Depletion der Isu Proteine keinen Einfluß auf den Eisentransport in die Zelle (Abb. 23B, unten). Die drastische Störung des Eiseneinbaus in Bio2p bei Isu Protein-defizienten Zellen scheint deshalb durch eine Störung der Biogenese des Fe/S-Clusters von Bio2p hervorgerufen zu werden.

Aus diesen Messungen kann eine wichtige Funktion von Isu1p und Isu2p für die Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine abgeleitet werden.

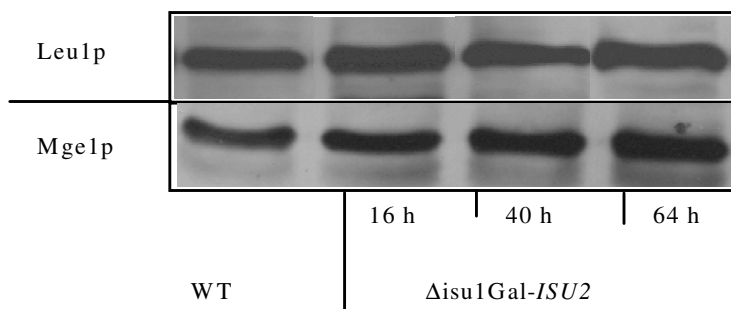
### 3.3.9 Isu Protein-depletierte Zellen zeigen eine Störung in der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine

Wie wirkt sich die Depletion der Isu Proteine auf die Aktivität cytosolischer Fe/S-Clusterhaltiger Enzyme aus? Um diese Frage zu beantworten, wurden  $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Stämme ein bis drei Tage in Vollmedium mit Glukose kultiviert, die Zellen aufgeschlossen und die Zellextrakte dazu benutzt, die Enzymaktivität der cytosolischen Isopropylmalat-Isomerase zu bestimmen (Abb. 24).

**A**



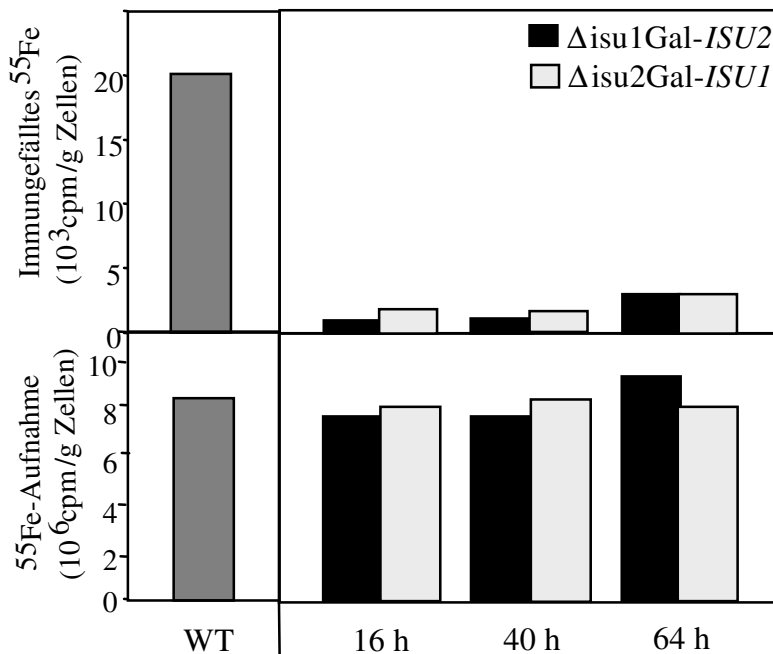
**B**



**Abb. 24. Die Depletion der Isu Proteine führt zu einer Inaktivierung des cytosolischen Fe/S-Proteins Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p).** **A.** Die Aktivität von Leu1p wurde in Extrakten von  $\Delta$ isu2Gal-ISU1- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-ISU2-Zellen im Vergleich zu Wildtypextrakten gemessen (Methode, s. Abb. 13). U = Units; WT = Wildtyp; Gal = Galaktose. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 16 h, 40 h oder 64 h in Laktatmedium mit Glukose (Glu). Zum Vergleich wurde die Aktivität in Extrakten von Zellen gemessen, die auf Galaktose-haltigem Medium gewachsen waren. **B.** Zur Immundekoration mit dem Antikörper gegen Leu1p wurden die Zellextrakte auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Synthese der cytosolischen Leu1p Polypeptidkette ist bei Depletion von Isu1p (nicht gezeigt) und Isu2p nicht betroffen.

Durch Wachstum von  $\Delta$ isu2Gal-ISU1- bzw.  $\Delta$ isu1Gal-ISU2-Zellen auf Glukose-haltigem Medium wurde eine Depletion der Isu Proteine erreicht (s. Abb. 21A). Dies hatte den fast vollständigen Verlust der Aktivität des Fe/S-Cluster-haltigen Enzyms Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) zur Folge (Abb. 24A). Eine Immundekorationsanalyse ergab, daß Leu1p in  $\Delta$ isu2Gal-ISU1- (nicht gezeigt) bzw.  $\Delta$ isu1Gal-ISU2-Zellen in Wildtyp-Mengen exprimiert wurde und daher kein Defekt in der Synthese der Leu1p Polypeptidkette in diesen Zellen vorlag (Abb. 24B). Dieses Ergebnis läßt auf eine Funktion der Isu Proteine bei der Bildung der Holoform von Leu1p schließen.

Zur Überprüfung dieser These wurde die *de novo* Synthese des Fe/S-Clusters von Leu1p gemessen (Versuchsablauf s. Kap. 3.1.2) (Abb. 25).

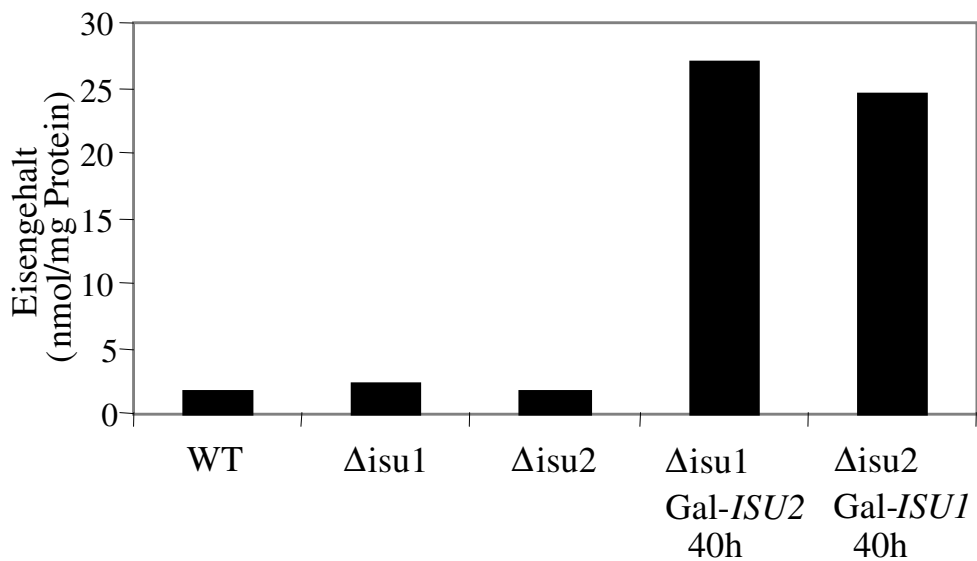


**Abb. 25. Die Depletion der Isu Proteine führt zu einem Defekt in der Biogenese des Fe/S-Clusters von Leu1p.** Um *in vivo* den Einbau des Fe/S-Clusters in Leu1p studieren zu können, wurde die Assoziation von radioaktiv markiertem [<sup>55</sup>Fe]-Eisen an das Leu1p Protein gemessen (oben) (Methode, s. Abb. 5). Dies wurde in Wildtyp-, Δisu2Gal-ISU1- und Δisu1Gal-ISU2-Zellen bestimmt, die auf Glukose-haltigem Medium gewachsen waren. Die Eisenaufnahme in diese Zellen wurde ebenfalls quantifiziert (unten). (cpm = Zählereignisse pro Minute).

Die Depletion der Isu Proteine durch Wachstum auf Glukose führte zu einer 10fachen Reduktion des mit dem Anti-Leu1p Antikörper co-präzipitierten Eisens (Abb. 25, oben). Bereits 16 h nach Abschalten der Expression des *ISU1* bzw. *ISU2* Gens war die präzipitierte Eisenmenge in Leu1p um den Faktor 10 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erniedrigt. Ein ähnliches Ergebnis wurde für Zellen erhalten, die für 40 bzw. 64 h in Galaktose-freiem Medium kultiviert wurden. Bei diesen Versuchen war die Eisenaufnahme durch die Reduktion der Menge an Isu Protein in den Δisu2Gal-ISU1- und Δisu1Gal-ISU2-Zellen nicht betroffen (Abb. 25 unten). Es handelt sich also um keinen generellen Defekt in der zellulären Eisenaufnahme, sondern um einen spezifischen Ausfall der Bildung des Fe/S-Clusters. Diese Daten belegen in direkter Weise den Defekt im Einbau des Fe/S-Clusters in Leu1p als Folge der Depletion der Isu Proteine. Daraus folgt, daß die Isu Proteine eine wichtige Funktion in der Biogenese des Fe/S-Clusters cytosolischer Proteine haben.

### 3.3.10 Die Depletion der Isu Proteine führt zu einer Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien

In einer Reihe von Zellen, in denen ein an der Fe/S-Cluster-Synthese beteiligtes Protein in seiner Funktion gestört war, konnte eine Akkumulation von freiem Eisen in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Dieser charakteristische Phänotyp konnte beispielsweise in  $\Delta atm1$ -Zellen und Nfs1p-depletierten Zellen beobachtet werden (Kispal et al., 1997; Kispal et al., 1999). Es war deshalb von Interesse, ob man diesen Phänotyp auch in Isu Protein-depletierten Hefezellen findet.

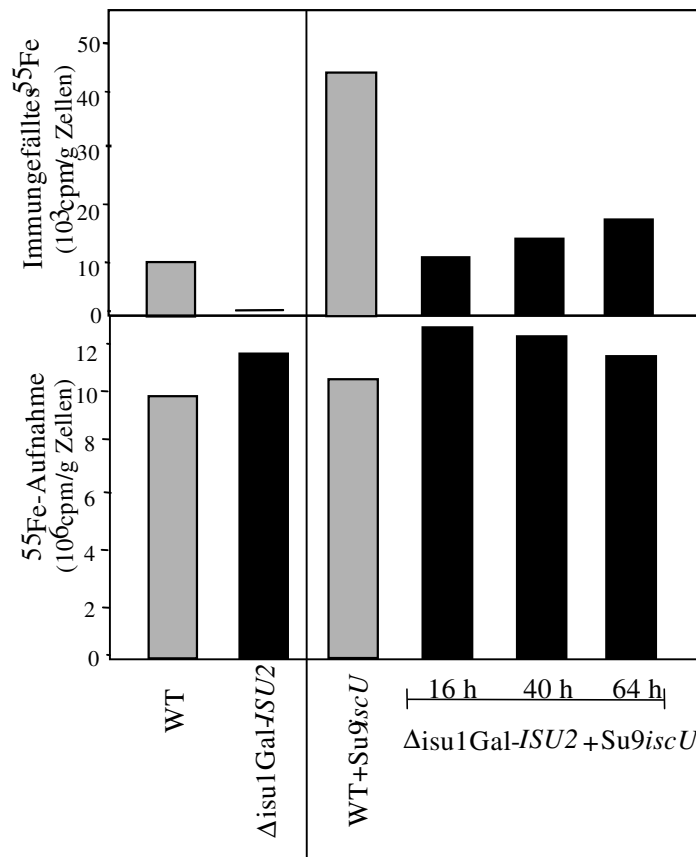


**Abb. 26. Quantitative Bestimmung des freien Eisens in isolierten Mitochondrien.** Die Mitochondrien wurden aus  $\Delta isu2$ Gal-*ISU1*- und  $\Delta isu1$ Gal-*ISU2*-Zellen, die 40 h auf Laktatmedium mit Glukose gewachsen waren, sowie aus  $\Delta isu1$ -,  $\Delta isu2$ - und Wildtyp(WT)-Zellen isoliert und anschließend auf ihren Eisengehalt hin untersucht. Reduziertes freies Eisen wurde nach Zugabe eines Chelators anhand der Absorption des Eisen-Chelator-Komplexes bei 535 nm bestimmt. Die Streuung der Meßwerte einzelner Versuche lag bei 10%.

In  $\Delta isu1$ - und  $\Delta isu2$ -Zellen war die Menge an mitochondrialem freiem Eisen mit etwa 2 nmol/mg Protein ähnlich hoch wie in Wildtyp-Zellen (Abb. 26). Nur ein geringfügiger Anstieg auf 3,5 nmol Eisen pro mg Protein war in Mitochondrien aus  $\Delta isu1$ -Zellen zu beobachten. Im Vergleich dazu führte die Depletion der Isu Proteine zu einem 15fachen Anstieg des mitochondrialen Gehalts an freiem Eisen. Diese Eisenakkumulation ist ähnlich hoch wie in Mitochondrien aus  $\Delta atm1$ -Zellen und Nfs1p-depletierten Zellen (Kispal et al., 1997; Kispal et al., 1999).

3.3.11 Bakteriellcs IscU ist ortholog zu Isu1p und Isu2p

In *A. vinelandii* wurde gezeigt, daß das *isc*-Operon für Proteine codiert, die für die Fe/S-Cluster-Biogenese verantwortlich sind. Das in diesem Operon codierte IscU ist in seiner Sequenz sehr ähnlich zu den Hefepoteinen Isu1p und Isu2p. Um zu prüfen, ob diese Proteine eine vergleichbare Funktion ausüben, wurde bakterielles IscU in Isu Protein-depletierten Hefezellen exprimiert. Dazu wurde *iscU* mit der codierenden DNA der aminoterminalen Präsequenz von Su9 (s. 3.2.2.2) in den Hefevektor pRS416MET25 kloniert. Wildtyp- und  $\Delta$ isu2Gal-*ISU1*-Zellen wurden mit diesem Vektor bzw. mit dem Ausgangsvektor transformiert. Anschließend wurde in diesen Zellen die *de novo* Synthese des Fe/S-Clusters in Leu1p Protein untersucht (Methode s. Kap. 3.1.2) (Abb. 27).



**Abb. 27. Expression von bakteriellem IscU führt in Isu Protein-depletierten Hefezellen zu einer normalen Fe/S-Cluster-Synthese.** Wildtyp- und  $\Delta$ isu1Gal-*ISU2*-Zellen wurden mit dem Plasmid pRS416MET25-Su9iscU bzw. dem Ausgangsvektor transformiert und in Glukosehaltigem Laktatmedium kultiviert. Um *in vivo* den Einbau des Fe/S-Clusters in Leu1p studieren zu können, wurde die Assoziation von radioaktiv markiertem [ $^{55}\text{Fe}$ ]-Eisen an das Leu1p Protein gemessen (Methode, s. Abb. 5) (oben). Die Eisenaufnahme in die Zellen wurde quantifiziert (unten). (cpm = Zählereignisse pro Minute).

In Extrakten von Isu Protein-depletierten Zellen konnte nach Immunpräzipitation mit Anti-Leu1p Antikörper nur sehr wenig radioaktives Eisen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen detektiert werden (Abb. 27, oben links). Wurde bakterielles IscU in Mitochondrien aus Wildtyp- oder Isu Protein-depletierten Zellen exprimiert, so erhöhte sich in den entsprechenden Zellextrakten die mit Leu1p co-präzipitierte Eisenmenge. In Wildtyp-Zellen mit exprimiertem IscU erhöhte sich die co-präzipitierte  $^{55}\text{Fe}$ -Menge sogar über die normale Einbaurrate von  $^{55}\text{Fe}$  in Leu1p von Wildtyp-Zellen (Abb. 27, oben rechts). In den Isu Protein-depletierten Zellen konnte bei IscU Expression eine starke Erhöhung des Einbaus von  $^{55}\text{Fe}$  in Leu1p gemessen werden, die vergleichbar war mit den gemessenen Werten in Wildtyp-Zellen. Die Aufnahme von Eisen war in allen Zellen ähnlich (Abb. 27, unten). Weiterhin wies die Immundekorationsanalyse eine nahezu gleich starke Expression von Leu1p in allen Zellen nach (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse belegen, daß die Expression von bakteriellem IscU in Isu Protein-depletierten Zellen zu einer den Wildtyp-Zellen vergleichbaren Fe/S-Cluster-Biosynthese von Leu1p führt. Das bakterielle Protein IscU kann damit als funktionelles Ortholog der beiden Hefeproteine Isu1p und Isu2p betrachtet werden, da es in eukaryontischen Zellen die Synthese von cytosolischen Fe/S-Clustern unterstützen kann.

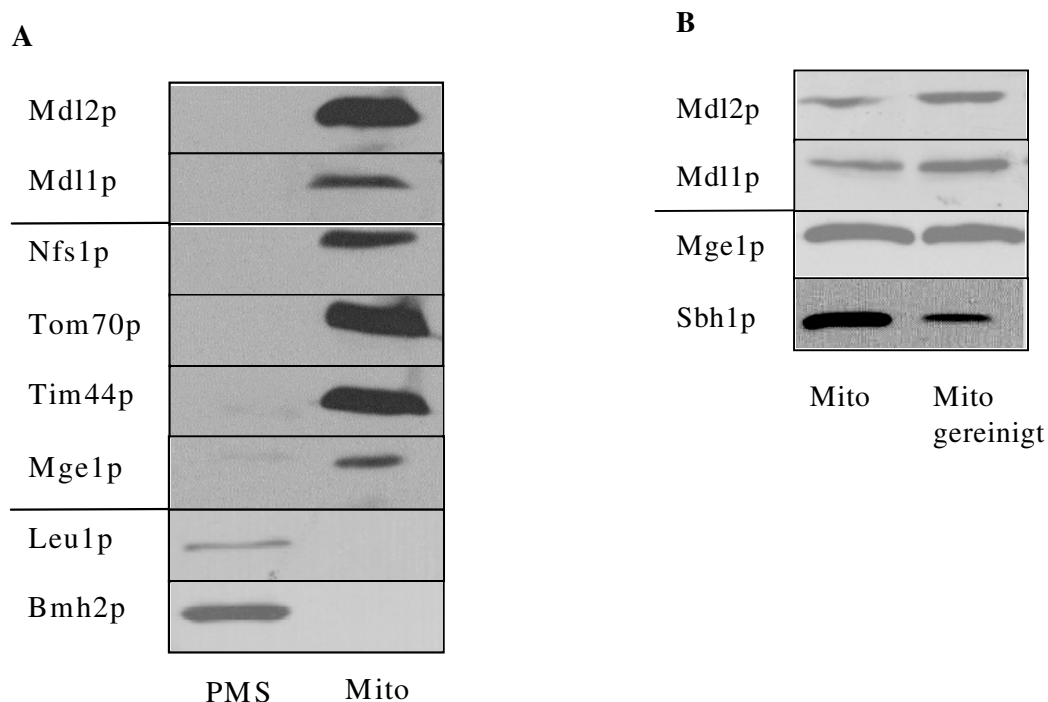
### 3.4 Funktionsaufklärung der Proteine Mdl1p und Mdl2p

Der RNase L Inhibitor 1 (Rli1p) ist ein essentielles Fe/S-Protein der Hefe, das extramitochondrial lokalisiert ist. Rli1p besitzt zwei Fe/S-Cluster, die über vier Cysteine gebunden werden. Die Mutation je eines dieser vier Cysteine in Rli1p führt zum Tod der Zelle. Dies belegt, daß die Bindung dieser Fe/S-Cluster in Rli1p essentiell für das Überleben der Zelle ist. Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (G. Kispal, H.Lange und A.Kaut) konnten - wie für Bat1p und Bat2p in Kap. 3.2.2.3.2 beschrieben - für die mitochondrialen Proteine Nfs1p, Atm1p, Yah1p und Isa1p eine Beteiligung an der Bildung der Fe/S-Cluster in Rli1p zeigen. Die Bildung von funktionellem Rli1p scheint daher eine Ursache für den essentiellen Charakter der Fe/S-Cluster-Biosynthese-Maschinerie der Mitochondrien (z.B. von Nfs1p und Yah1p) zu sein. Dies wirft nun die interessante Frage auf, warum Atm1p als postulierter Transporter für Fe/S-Cluster nicht essentiell in Hefe ist, wie z.B. Nfs1p oder Yah1p. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, daß ein zweiter ABC-Transporter in der mitochondrialen Membran existiert, der Atm1p, wenn auch nur mit geringer Effizienz, funktionell ersetzt und Fe/S-Cluster für extra-mitochondriale Fe/S-Proteine wie Rli1p verfügbar macht. In Hefe existieren 29 ABC-Transporter. Für die meisten dieser Proteine ist die zelluläre Lokalisierung bekannt (Decottignies and Goffeau, 1997). Für zwei ABC-Transporter, Mdl1p und Mdl2p, wurde bisher noch nicht beschrieben, in welchem Kompartiment sie in der Hefezelle lokalisiert sind. Auffälligerweise besitzen diese beiden Proteine eine N-terminale Sequenz, die einer typischen mitochondrialen Präsequenz ähnelt. Für die im folgenden beschriebene Charakterisierung der beiden Mdl Proteine wurden von der Arbeitsgruppe Tampé (Institut für Physiologische Chemie, Universität Marburg) die Deletionsmutanten und Antikörper zur Verfügung gestellt.

#### 3.4.1 Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p

Um die subzelluläre Lokalisierung der Mdl Proteine in der Hefezelle zu untersuchen, wurden aus Wildtyp-Zellen Mitochondrien und postmitochondrialer Überstand (PMS) isoliert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Mdl1p und Mdl2p mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 28). Zur Überprüfung der Reinheit der Mitochondrien und der PMS-Fractionen wurden bekannte Proteine mit spezifischen Antikörpern dieser Kompartimente detektiert.





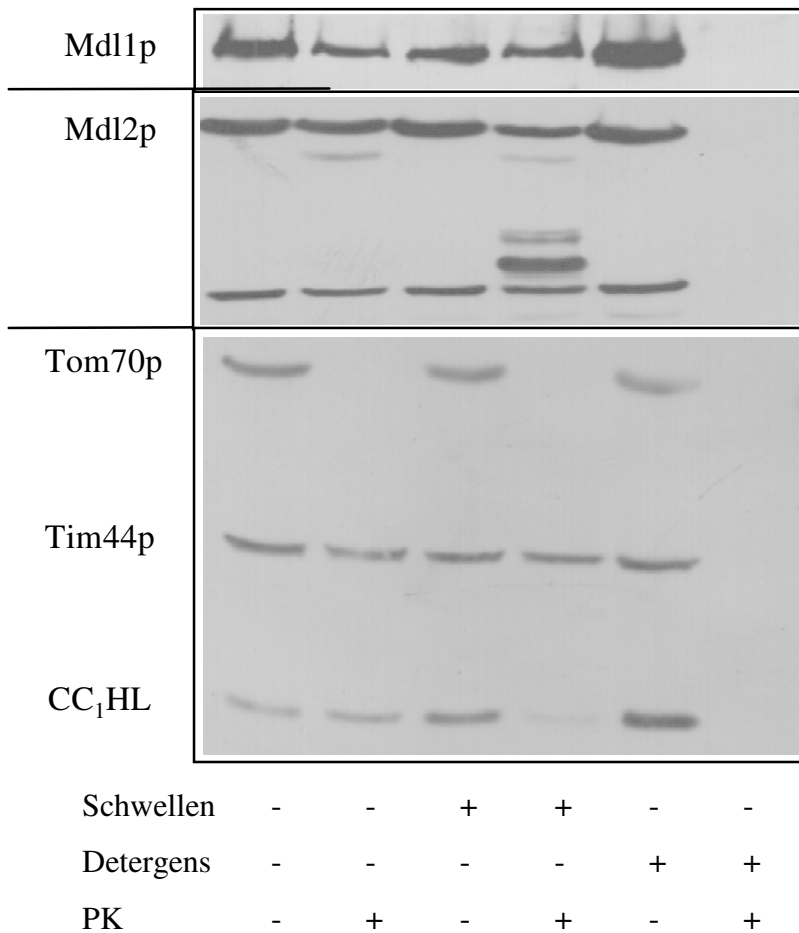
**Abb. 28. Lokalisierung der Mdl Proteine in den Mitochondrien.** **A.** Proteine des postmitochondrialen Überstands (PMS) und der Mitochondrien (Mito) aus Wildtyp-Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Immundekoration mit spezifischem Mdl1p- und Mdl2p-Antikörper wurde gezeigt, daß diese beiden Proteine ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert sind. Zur Überprüfung der Reinheit der Mitochondrien und der PMS-Fraktion wurde die Lokalisierung bekannter Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert (Tom70p: Mitochondrien-Außenmembran, Tim44p: Mitochondrien-Innenmembran, Mge1p und Nfs1p: Matrixproteine, Leu1p und Bmh2p: Cytosol). **B.** Auftrennung der Proteine aus Nykodenz-Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien und über Nykodenz-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigte Mitochondrien wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden aufgetrennt und über Immundekoration sichtbar gemacht. (Sbh1p, ER-Protein)

Mdl1p und Mdl2p wurden ausschließlich in den Mitochondrien detektiert (Abb. 28A). Da isolierte Mitochondrien gewöhnlich mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) verunreinigt sind, wurden Mitochondrien mit Hilfe einer Nykodenz-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auch in gereinigten Mitochondrien konnten Mdl1p und Mdl2p detektiert werden, während ein Markerprotein des ER (Sbh1p) ca. 10fach abgereichert wurde (Abb. 28B). Dies legt nahe, daß beide ABC-Transporter mitochondrial lokalisiert sind.

#### 3.4.1.1 Lokalisierung der Mdl Proteine in der mitochondrialen Innenmembran

Zur sub-mitochondrialen Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p wurden gleiche Anteile an Mitochondrien in isotonischem und hypotonischem Puffer mit Proteinase K inkubiert. In isotonischem Puffer bleibt die Mitochondrienaußen- und -innenmembran intakt, so daß nur Proteine auf der Außenseite der Mitochondrien proteolytisch abgebaut werden. Die Inkubation der Mitochondrien in hypotonischem Milieu bewirkt das Schwellen der Mitochondrien und das

Aufbrechen der äußeren Membran. Dadurch sind auch Proteine des Intermembranraumes für die Proteinase K zugänglich. In einem weiteren Teil des Reaktionsansatzes wurden die Mitochondrien mit Detergens vollständig solubilisiert, so daß Proteinase K auch die Proteine innerhalb der Innenmembran abbauen konnte (Abb. 29).

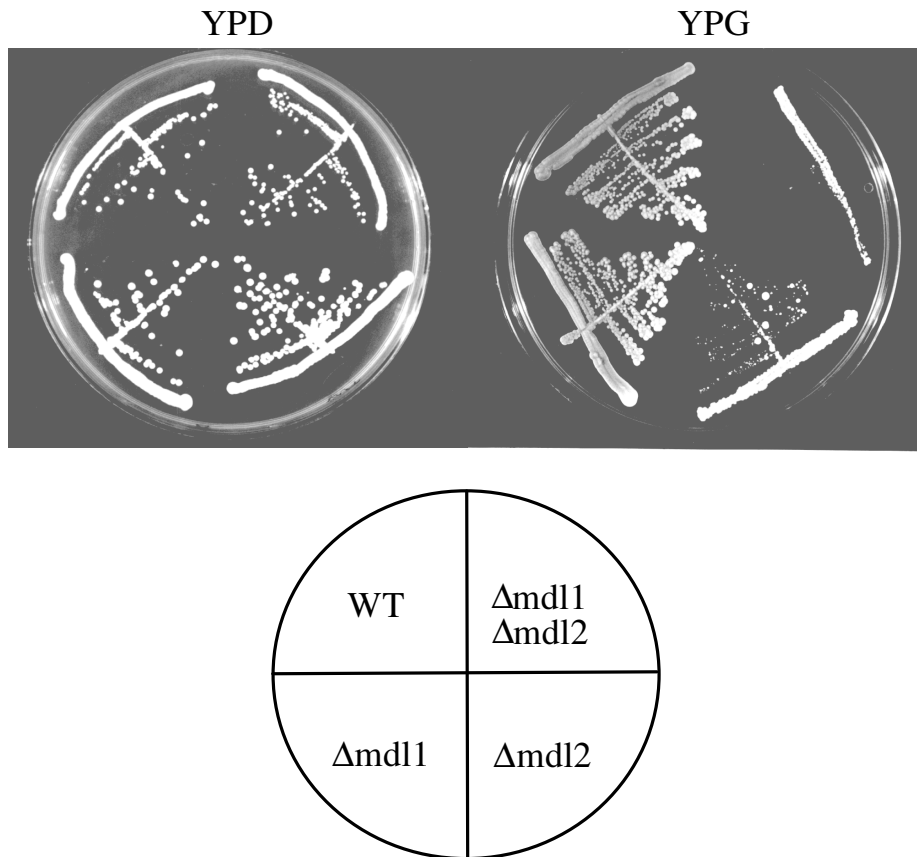


**Abb. 29. Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p in den Mitochondrien.** Gleiche Anteile isolierter Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen wurden in isotonischem und hypotonischem (Schwellen) Puffer mit Proteinase K inkubiert. Ein weiterer Teil wurde mit Triton X-100 Detergens vollständig solubilisiert, so daß Proteinase K auch die Proteine auf der Matrixseite abbauen konnte. Als Markerproteine in Mitochondrien wurden in der Immunfärbung verwendet: Tom70p, Außenmembran; Tim44p, Innenmembran; CC<sub>1</sub>HL, Intermembranraum.

Weder vor noch nach Aufbrechen der Außenmembran war Mdl1p zugänglich für Proteinase K (PK) (Abb. 29). Mdl2p hingegen wurde nach Öffnen der Außenmembran partiell zugänglich für PK. Nach Lyse der Mitochondrien in Triton X-100 Detergens waren beide Mdl Proteine nicht mehr detektierbar. Diese Ergebnisse belegen eine Lokalisierung der beiden Proteine in der inneren Mitochondrienmembran. Die Nukleotidbindungsdomäne beider Proteine scheint dabei zur Matrixseite hin exponiert zu sein. Die kurzen Schleifen im Intermembranraum zeigen keine (Mdl1p) oder nur geringe (Mdl2p) Proteasesensitivität.

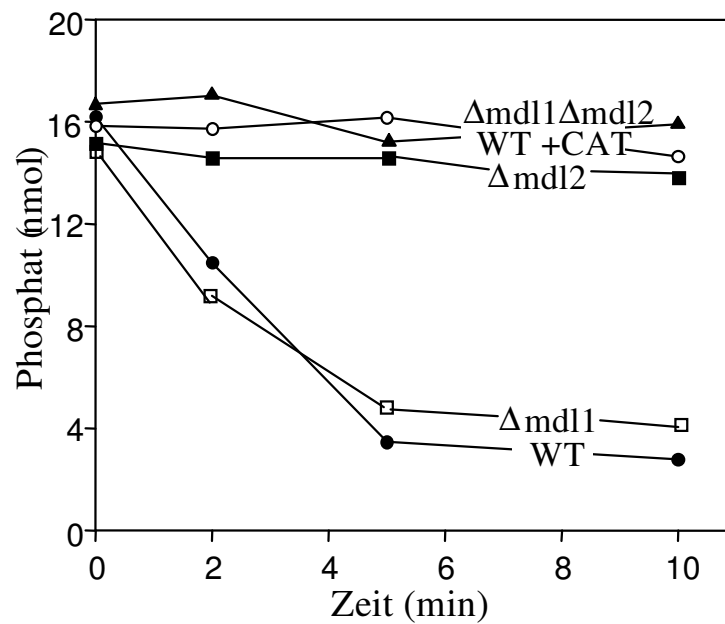
### 3.4.2 Analyse des Phänotyps von Mdl Protein-defizienten Zellen

Um die Mdl Proteine in ihrer Funktion charakterisieren zu können, wurde das Wachstum von Hefezellen verfolgt, in denen *MDL1* und *MDL2* entweder einzeln oder zusammen deletiert waren (Abb. 30).



**Abb. 30. Wachstum der *MDL* Mutanten auf Vollmedium mit Glukose oder Glycerin.** Wildtyp-,  $\Delta\text{mdl1}$ -,  $\Delta\text{mdl2}$ - und  $\Delta\text{mdl1}\Delta\text{mdl2}$ -Zellen wurden auf Glukose-(YPD) oder Glycerin-haltigem (YPG) Medium ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. WT, Wildtyp.

Bei *Mdl2p*-depletierten Zellen ( $\Delta\text{mdl2}$ -,  $\Delta\text{mdl1}\Delta\text{mdl2}$ -Zellen) wurde eine Wachstumsreduktion auf Glycerin-haltigem Medium gegenüber Wildtyp-Zellen beobachtet, während  $\Delta\text{mdl1}$ -Zellen Wildtyp-Wachstum aufwiesen (Abb. 30). Dies könnte bedeuten, daß in *Mdl2p*-depletierten Zellen die oxidative Phosphorylierung einen Defekt aufweist. Daher wurde in isolierten Mitochondrien aus diesen Zellen und in denen aus Wildtyp-Zellen die Membranpotential-abhängige ATP-Bildung gemessen. In diesem Versuchsansatz wurde das Membranpotential durch die Zugabe von NADH gebildet, und die Synthese von ATP aus anorganischem Phosphat und ADP durch die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATPase anhand der Abnahme der Phosphatmenge verfolgt (s. Kap. 3.2.2.1).

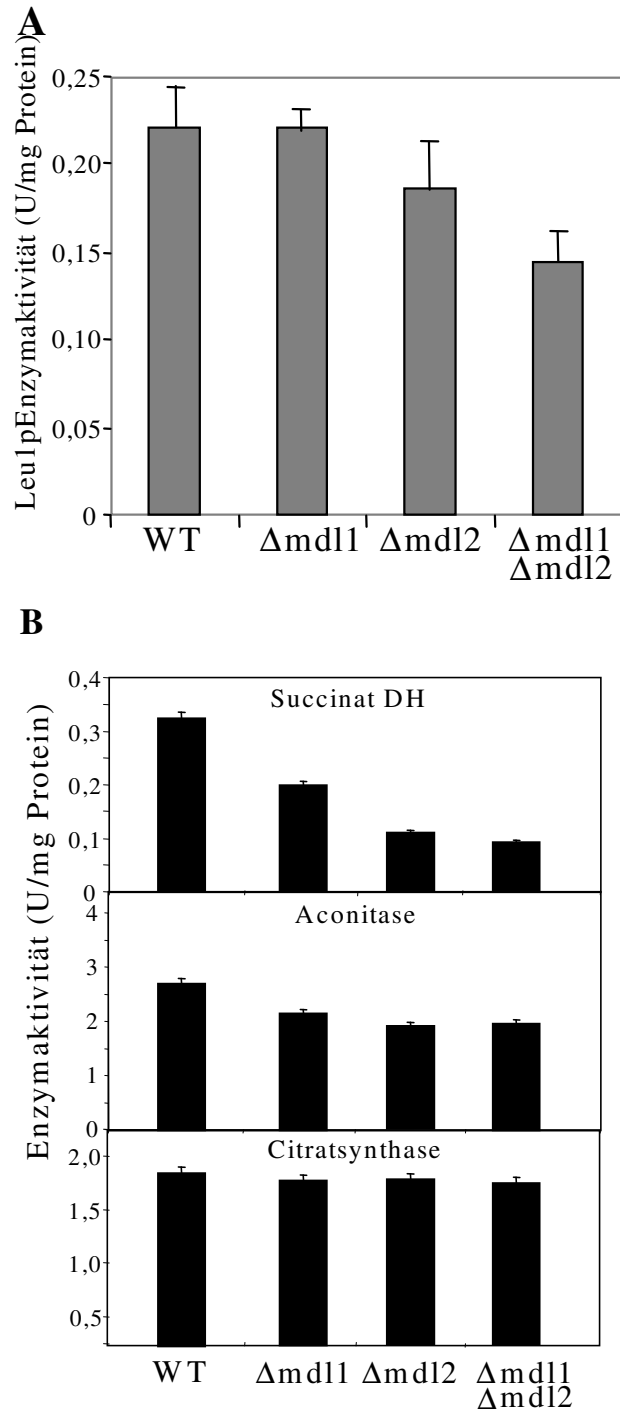


**Abb. 31. In Mdl2p-depletierten Zellen ist die oxidative Phosphorylierung gestört.** Für die Messung der Membranpotential-getriebenen ATP-Bildung wurde wie in Abb. 10 verfahren. WT, Wildtyp.

Mitochondrien aus Mdl2p-depletierten Zellen synthetisieren auch in Anwesenheit eines Membranpotentials kein ATP, was bedeutet, daß sie in der oxidativen Phosphorylierung gestört sind (Abb. 31). Dieses Ergebnis erklärt das reduzierte Wachstum von  $\Delta$ mdl2- und  $\Delta$ mdl1 $\Delta$ mdl2-Zellen auf Glycerin-haltigem Medium (Abb. 30).

#### 3.4.2.1 In Mdl2p-defizienten Zellen ist die Aktivität der Fe/S-Proteine nicht signifikant betroffen

In Wildtyp-Zellen und Mutanten in den *MDL* Genen wurden die Aktivitäten mitochondrialer (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) und cytosolischer (Isopropylmalat-Isomerase) Fe/S-Cluster-haltiger Enzyme gemessen (Abb. 32). Dazu wurden Mitochondrien bzw. Zellextrakte von Wildtyp-,  $\Delta$ mdl1-,  $\Delta$ mdl2- und  $\Delta$ mdl1 $\Delta$ mdl2-Zellen verwendet.



**Abb. 32. Messung der Aktivitäten mitochondrialer und cytosolischer Fe/S-Clusterhaltiger Enzyme.** **A.** Die Aktivitäten des cytosolischen Fe/S-Clusterhaltigen Enzyms Leu1p wurden in Zellextrakten von Wildtyp (WT)- und *MDL* Deletionszellen gemessen. **B.** Die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme Succinat DH, Aconitase und Citratsynthase wurden in Mitochondrien bestimmt (Methode, s. Abb. 16). Leu1p, Isopropylmalat-Isomerase; DH, Dehydrogenase.

In Extrakten aus Mdl2p-depletierten Zellen ( $\Delta$ mdl2-,  $\Delta$ mdl1 $\Delta$ mdl2-Zellen) wurde im Vergleich zu Wildtyp-Zellextrakten eine 15-30%ige Aktivitätsminderung des cytosolischen Fe/S-Clusterhaltigen Enzyms Leu1p gemessen (Abb. 32A), obwohl die Menge dieses Proteins

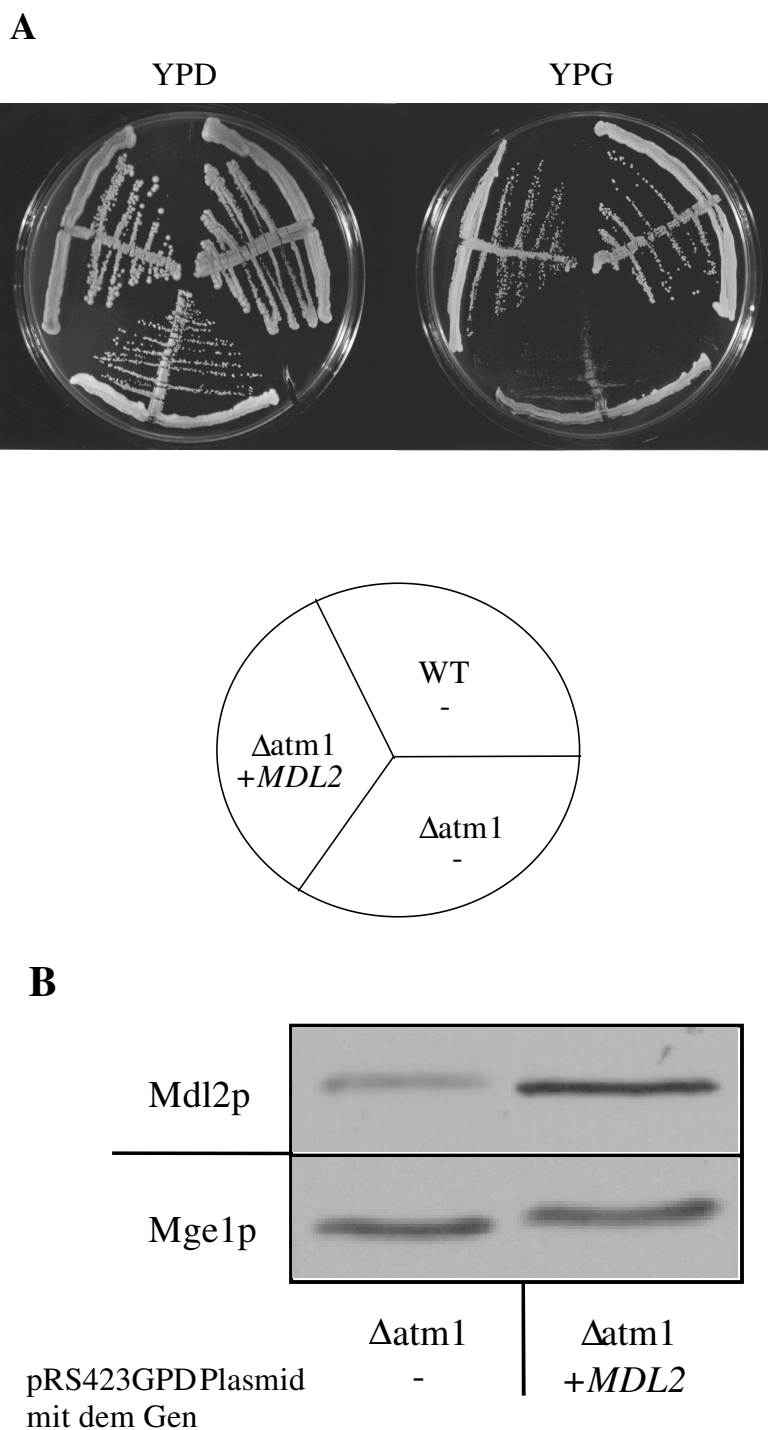
vergleichbar zu der in Wildtyp-Zellen war (nicht gezeigt). Auf die Aktivität des mitochondrialen Fe/S-Proteins Aconitase wirkte sich die Mdl2p Depletion nicht signifikant aus (Abb. 32B). Die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität war jedoch auf 30% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Dieser Aktivitätsverlust könnte im Zusammenhang mit dem Atmungsdefekt dieser Zellen stehen (Abb. 31). Die Aktivität der Citratsynthase war in allen Stämmen vergleichbar. Diese Messungen geben keinen eindeutigen Hinweis darauf, ob Mdl2p an der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine beteiligt ist. Eindeutig geht jedoch aus den Daten hervor, daß Mdl2p keine Funktion bei der Reifung der Aconitase hat. Der Effekt auf die Succinat-Dehydrogenase scheint eher indirekt zu sein, da auch ein Defekt der oxidativen Phosphorylierung gemessen wurde.

### 3.4.3 Mdl2p kann den Wachstumsdefekt von Atm1p-defizienten Zellen komplementieren

Es wurde überprüft, ob die Überexpression der Mdl Proteine den Wachstumsdefekt von  $\Delta atm1$ -Zellen komplementieren kann. Ein solches Ergebnis wäre ein Hinweis auf eine ähnliche Funktion der Mdl Proteine wie die von Atm1p und würde erklären, warum Atm1p kein essentielles Protein ist.

#### 3.4.3.1 Die Überexpression von Mdl2p komplementiert den Wachstumsdefekt von $\Delta atm1$ -Zellen

Die Gene *MDL1* bzw. *MDL2* wurden in einen Hefevektor kloniert. Wildtyp- und  $\Delta atm1$ -Zellen wurden mit diesen Vektoren transformiert. Diese Zellen wurden zusammen mit Zellen, die mit dem Ausgangsvektor transformiert worden waren, auf Vollmedien ausgestrichen (Abb. 33; Versuch mit pRS426GPD-*MDL1* nicht gezeigt).



**Abb. 33. Mdl2p komplementiert den Wachstumsphänotyp von  $\Delta atm1$ -Zellen.** **A.** In  $\Delta atm1$ -Zellen wurde das Plasmid pRS423GPD-*MDL2* (+*MDL2*) oder das entsprechende Ausgangsplasmid (-) transformiert und die Zellen auf Agarplatten ausgestrichen. Im Vergleich dazu wurde das Wachstum von Wildtyp (WT)-Zellen beobachtet, die mit dem Ausgangsplasmid transformiert worden waren. Die Zellen wurden auf Vollmedium für drei Tage bei 30°C inkubiert. **B.** Mitochondrien wurden aus  $\Delta atm1$ -Zellen, die mit dem angegebenen Plasmid transformiert worden waren, isoliert und die Proteine über SDS-PAGE getrennt. Durch Immundekorationsanalyse wurde Mdl2p mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

Die Überexpression von Mdl1p hatte keinen Einfluß auf das Wachstum der  $\Delta atm1$ -Zellen (nicht gezeigt). Die Überexpression von Mdl2p hingegen komplementierte den Wachstumsdefekt von  $\Delta atm1$ -Zellen, sowohl auf Vollmedium mit Glukose als auch mit Glyzerin vollständig (Abb. 33A). Nach Immundekorationsanalyse war die zelluläre Menge von Mdl2p nur 2-3fach erhöht (Abb. 33B). Offensichtlich genügt eine geringe Steigerung der Expressionsrate von Mdl2p für eine Aufhebung der schweren Auswirkungen der Depletion von Atm1p. Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, daß Mdl2p, zumindest nach Erhöhung der Kopienzahl, eine Funktion als Transporter von Fe/S-Clustern besitzt und damit eine ähnliche Funktion wie Atm1p ausüben kann.



### 3.5 Aufklärung der Funktion des Proteins Leu5p

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß die gleichzeitige Deletion von *ATM1* und *LEU5* zur sog. synthetischen Letalität der Hefezelle bei erhöhten Temperaturen führt, d. h. Hefezellen mit gleichzeitiger Inaktivierung von *LEU5* und *ATM1* sind nicht lebensfähig. Diese genetische Interaktion machte es interessant, Leu5p näher zu charakterisieren.

Ein Sequenzvergleich von Leu5p mit homologen Proteinen aus Hefe und anderen Organismen ergab, daß Leu5p in die Klasse der mitochondrialen Carrierproteine einzuordnen ist (Abb. 34). Leu5p teilt die charakteristischen Merkmale dieser Proteinklasse:

- a) das sog. "carrier signature motif", das aus einer typischen Aneinanderreihung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren besteht (Abb. 34). Das dreimalige Vorkommen dieser Sequenz deutet die dreigeteilte Struktur von Carrierproteinen an.
- b) das Vorhandensein von sechs Transmembrandomänen
- c) das Fehlen einer typischen N-terminalen mitochondrialen Präsequenz.

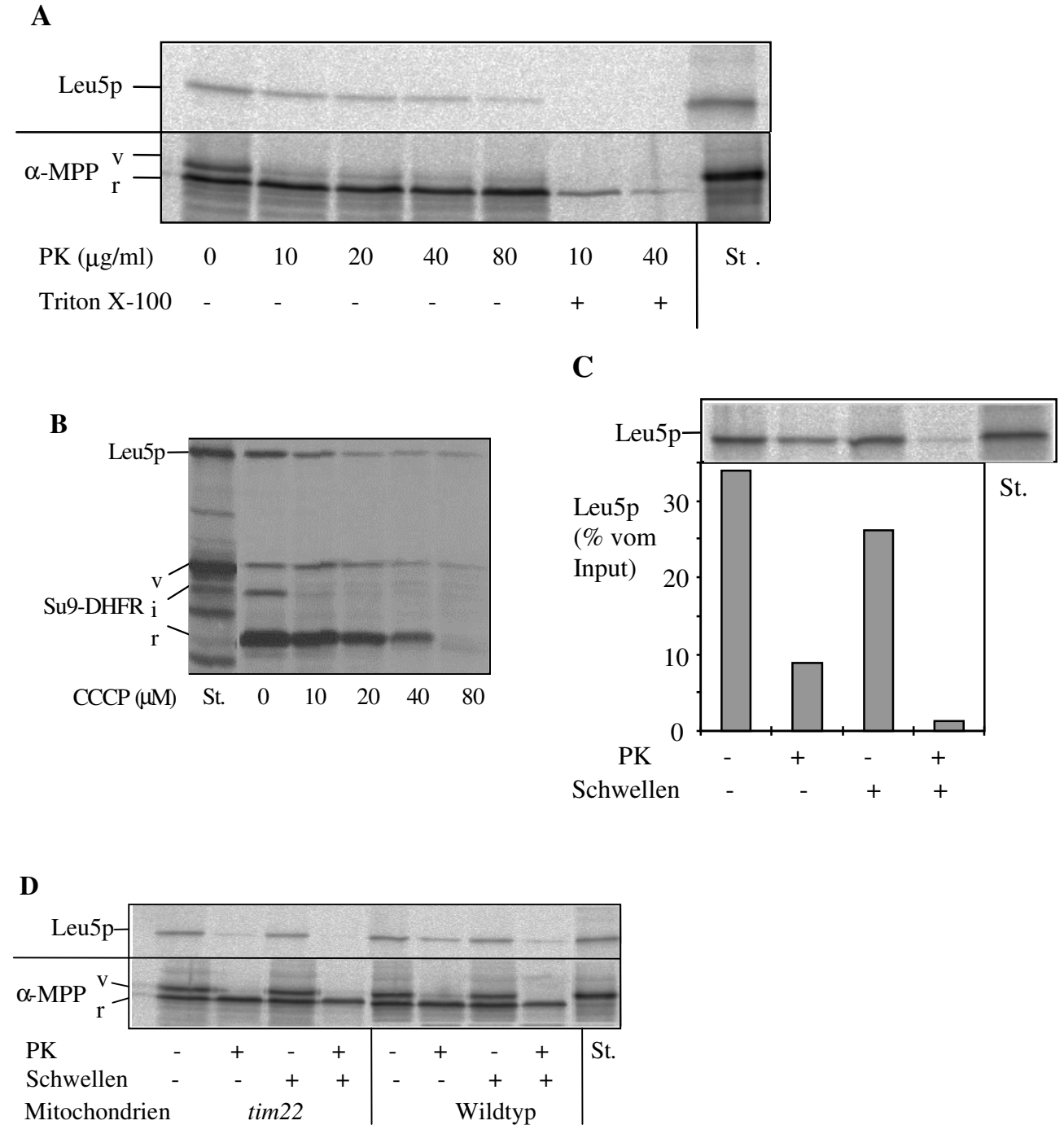
Hohe Sequenzhomologie besteht zu dem humanen "Graves` disease" Protein (36% identische Aminosäurereste; Zarrilli et al., 1989) und zu einem Protein aus *S. pombe* (45%).



**Abb. 34. Sequenzvergleich von Leu5p mit homologen Proteinen.** Die Anordnung der Sequenzen nach maximaler Ähnlichkeit wurde mit dem Programm "MultiAlign" erstellt. In Fettschrift sind die hypothetischen Transmembrandomänen hervorgehoben. Unter den Aminosäuresequenzen wurde das "carrier signature motif" (Pφ-φφ+φ+φ; P, Prolin; φ, hydrophobe Aminosäure; +, -, geladene Aminosäuren) eingefügt. ScLeu5p: Leu5 Protein aus *S. cerevisiae*; SpLeu5p: Leu5 Protein aus *S. pombe*; hGraves: "human Graves` disease protein"; ScAAC2: ADP/ATP Carrierprotein 2 aus *S. cerevisiae*; ScMir1p: Phosphatcarrier aus *S. cerevisiae*; ScMrs4p: Mitochondriales Carrierprotein unbekannter Funktion aus *S. cerevisiae*; hUCP1: "human uncoupling protein 1".

3.5.1 Import von Leu5p in die mitochondriale Innenmembran

Um Leu5p als mögliche Komponente der mitochondrialen Innenmembran zu identifizieren, wurde der Import und die Lokalisation von Leu5p in Mitochondrien studiert. Leu5p wurde durch *in vitro* Transkription und Translation in der Gegenwart von radioaktivem (<sup>35</sup>S)-Methionin synthetisiert. Das so markierte Protein wurde mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze für 20 min bei 0°C mit Proteinase K versetzt, um nicht aufgenommenes Leu5p proteolytisch abzubauen (Abb. 35).



**Abb. 35. Leu5p wird in die mitochondriale Innenmembran importiert.** **A.** Für die Importversuche wurden verschiedene Vorstufenproteine (Leu5p,  $\alpha$ -MPP, pSu9-DHFR (siehe B)) durch *in vitro* Translation im Reticulozytenlysat synthetisiert, wobei ( $^{35}$ S)-Methionin als Markierung des Proteins verwendet wurde. Für den Import in Mitochondrien wurde das radioaktiv markierte Vorstufenprotein zu isolierten Mitochondrien, NADH, ATP und Importpuffer gegeben. Nach einer Inkubationsphase von 10 min bei 25°C wurden die Proben zentrifugiert (6 min, 7000 Upm) und die Pellets in Puffer aufgenommen. Die Proben wurden dann für 20 min bei 0°C mit den angegebenen Konzentrationen an Proteinase K (PK) in Ab- oder Anwesenheit von 0,2% Detergens (Triton X-100) behandelt. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt. Anschließend wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die ( $^{35}$ S)-Methionin markierten Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.  $\alpha$ -MPP,  $\alpha$ -Untereinheit der Matrix-Prozessierungspeptidase; v und r: Vorläufer- und reife Form von  $\alpha$ -MPP. **B.** Mitochondrien wurden in Importpuffer mit den angegebenen Konzentrationen an CCCP für 3 min bei 25 °C behandelt. ( $^{35}$ S)-Methionin markiertes Leu5p und pSu9-DHFR wurden zugegeben und die Proben für 10 min bei 25°C inkubiert. Die weitere Analyse wurde durchgeführt wie in A beschrieben, jedoch ohne Behandlung mit Detergens. v, i, r: Vorläufer-, Intermediär- und reife Form von Su9-DHFR. **C.** Der Import von Leu5p wurde wie in A angegeben durchgeführt. Anschließend wurden die Mitochondrien einer Schwellprozedur unterworfen; d.h. ein Teil der Probe wurde in physiologischem Puffer, der andere Teil in hypotonischem Puffer in An- oder Abwesenheit von 50 mg/ml Proteinase K (PK) inkubiert. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt. Die Proteine wurden mit TCA präzipitiert und mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Daten der Autoradiographie wurden quantifiziert und als Balkendiagramm wiedergegeben. Das erfolgreiche Schwellen der Mitochondrien wurde nach Auftrennung der Proteine über ein SDS-Gel und anschließende Immundekoration mit spezifischen Antikörpern, die bekannte mitochondriale Proteine detektieren, überprüft (nicht gezeigt, vgl. Abb. 29). St., Standard, der 50% des anfänglichen Vorstufenproteins enthält. **D.** Leu5p benötigt Tim22p für den Import. Mitochondrien wurden aus Wildtyp-Zellen und aus Tim22-depletierten Zellen isoliert. Der Import von Leu5p und  $\alpha$ -MPP in diese Mitochondrien wurde wie in A angegeben durchgeführt. Die anschließende Schwellprozedur erfolgte wie in C beschrieben.

Eine signifikante Menge an Leu5p war nach der Importreaktion resistent gegen den Proteinase K-Abbau, was die Aufnahme von Leu5p in die Organellen nahelegt (Abb. 35A). Übereinstimmend mit dem Fehlen einer mitochondrialen Präsequenz wurde keine proteolytische Prozessierung beobachtet. Erst nach Lyse der Mitochondrien mit einem Detergens wurde Leu5p vollständig abgebaut. Dies beweist, daß die Proteaseresistenz nicht durch Aggregation von Leu5p verursacht worden ist. Der Import von Leu5p war abhängig von einem Membranpotential an der inneren Membran der Mitochondrien. Die Depletion des Membranpotentials durch Zugabe des Entkopplers CCCP inhibierte den Import von Leu5p vollständig (Abb. 35B). Da pSu9DHFR Membranpotential-abhängig in die Mitochondrien eingeschleust wird, wurde es zur Überprüfung des Versuches parallel importiert.

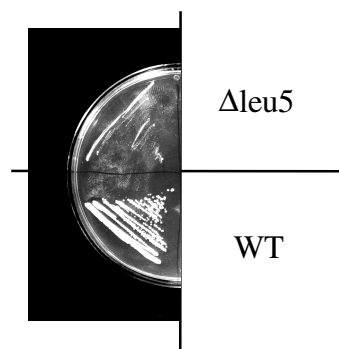
Zur Analyse der mitochondrialen Lokalisation von importiertem Leu5p wurden die Mitochondrien in hypotonischem Medium zum Schwellen gebracht. Dies führte zum Aufbrechen der äußeren, aber nicht der inneren Membran (Glick et al., 1992). Der Erfolg dieser Behandlung der Mitochondrien wurde im Anschluß an den Versuch mittels Transfer der

Proteine auf Nitrozellulose und Immundekorationsanalyse mit spezifischen Antikörpern, die bekannte mitochondriale Proteine detektieren, überprüft (nicht gezeigt). Wie in Abb. 35C zu sehen ist, wurde das meiste importierte Leu5p nach dem Schwellen der Mitochondrien für den Proteaseangriff zugänglich, was bedeutet, daß Leu5p zum Intermembranraum hin exponiert ist. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß Leu5p in einem Membranpotential-abhängigen Prozeß in die mitochondriale Innenmembran importiert wird und zum Intermembranraum weist.

Carrierproteine werden auf einem eigenen Importweg in die mitochondriale Innenmembran geschleust. Dabei benötigen sie die Innenmembranproteine Tim18p, Tim22p und Tim54p (Koehler et al., 2000; Sirrenberg et al., 1996; Kerscher et al., 1997). Um zu testen, ob Leu5p dem spezifischen Carrier-Importweg folgt, wurde der Import von Leu5p in Tim22p-depletierte Mitochondrien untersucht (Sirrenberg et al., 1996). Der Import war um 80% reduziert verglichen mit dem in Wildtyporganellen (Abb. 35D). Die  $\alpha$ -Untereinheit der Matrix-Prozessierungspeptidase ( $\alpha$ -MPP) ist ein Matrixprotein, das durch die Proteine Tim17p, Tim23p und Tim44p über die Innenmembran gelangt. Daher wird der Import von  $\alpha$ -MPP in Tim22p-depletierte Mitochondrien nicht behindert (Abb. 35D). Offensichtlich benötigt Leu5p für den Import in die Mitochondrien Tim22p. Dies legt nahe, daß es dem carrierspezifischen Importweg folgt.

### 3.5.2 Deletion von *LEU5*

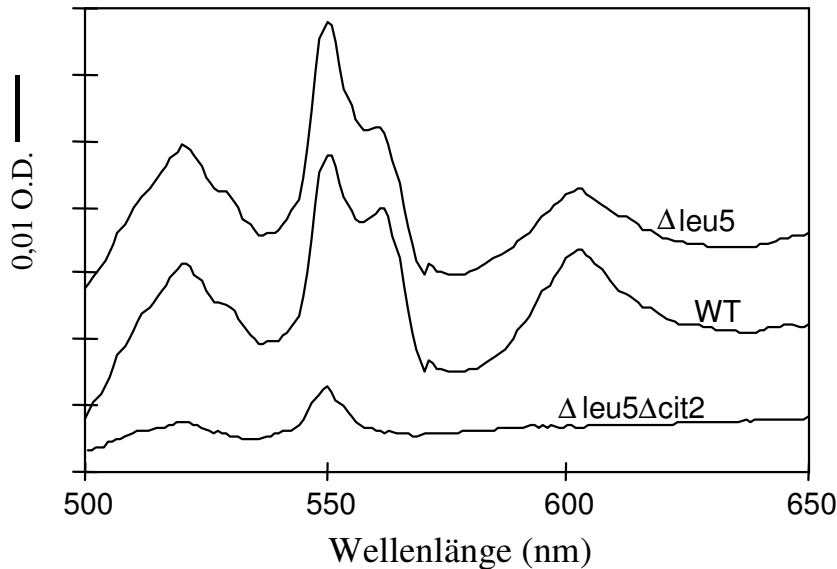
Um die Funktion von Leu5p aufklären zu können, wurde das *LEU5* Gen deletiert. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zeigte die  $\Delta$ leu5-Mutante ein nur geringfügig reduziertes Wachstum auf Vollmedium mit Glukose (nicht gezeigt), jedoch stark verlangsamtes Wachstum auf Vollmedium mit Glycerin (Abb. 36). Die  $\Delta$ leu5-Zellen weisen somit einen partiellen *PET* Phänotyp auf (Tzagoloff and Dieckmann, 1990), was vermuten läßt, daß Leu5p eine wichtige, aber keine essentielle Rolle in der Ausbildung funktionell aktiver Mitochondrien spielt.



**Abb. 36. Leu5p-defiziente Zellen zeigen eine Wachstumsreduktion auf Glycerinhaltigem Medium.** Wildtyp (WT)- und  $\Delta$ leu5-Zellen wurden auf Agarplatten mit Vollmedium und 2% Glycerin 4 Tage lang bei 30°C inkubiert.

### 3.5.2.1 *Leu5p*-defiziente Zellen sind funktionell in der oxidativen Phosphorylierung

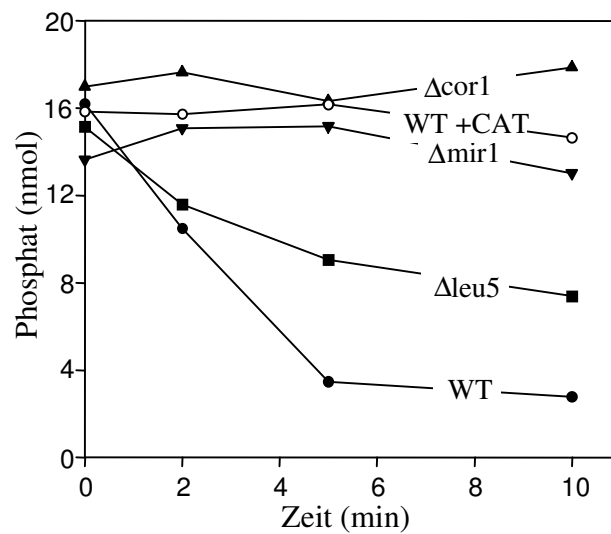
Aufgrund des Wachstumsphänotyps auf Glycerin-haltigem Medium läßt sich ein Defekt in der Atmungskette der Mitochondrien vermuten. Dies wurde auf zweierlei Weise untersucht. Zum einen wurde ein Cytochromspektrum von isolierten Mitochondrien aufgenommen.



**Abb. 37. Das Cytochromspektrum wird durch *LEU5* Deletion nicht beeinträchtigt.** Cytochromspektren wurden von isolierten Mitochondrien aus Wildtyp (WT)- und  $\Delta leu5$ -Zellen, die über Nacht in Glukose-haltigem Vollmedium gewachsen waren, aufgenommen. Der Balken entspricht einer Absorptionsdifferenz von 0,01. O.D., optische Dichte.

Die Cytochromspektren von isolierten Mitochondrien aus Wildtyp- und  $\Delta leu5$ -Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede, was nahelegt, daß die Deletion von *LEU5* keine direkte Auswirkung auf die Bildung der Cytochrome hat (Abb. 37).

Zum anderen wurde die Membranpotential-getriebene ATP-Produktion in isolierten Mitochondrien gemessen, wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben (Abb. 38).



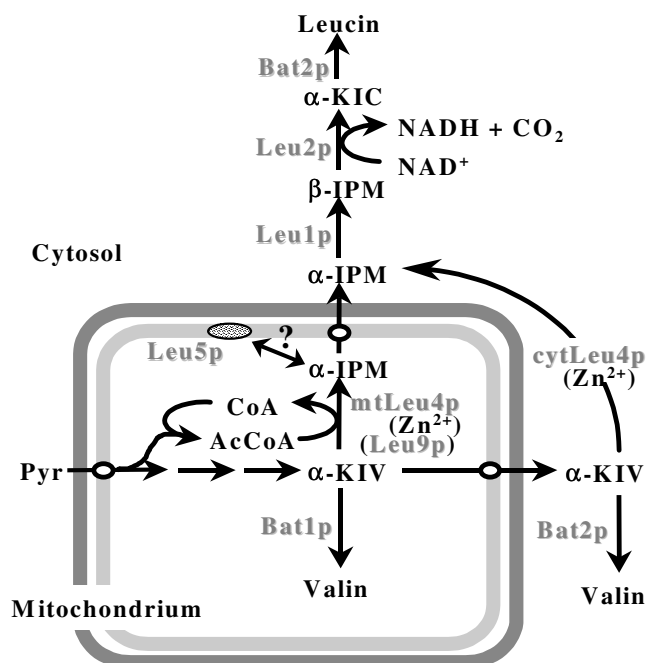
**Abb. 38. Leu5p-defiziente Zellen sind funktionell in der oxidativen Phosphorylierung.** Für die Messung der Membranpotential-getriebenen ATP-Bildung wurden zuerst Mitochondrien aus Wildtyp (WT)-Zellen isoliert und aus Zellen, bei denen *LEU5* ( $\Delta leu5$ ), der Phosphatcarrier *MIR1* ( $\Delta mir1$ ) oder die core 1 Untereinheit von Komplex III ( $\Delta cor1$ ) deletiert war. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie in Abb. 10 beschrieben.

In Mitochondrien aus  $\Delta leu5$ -Zellen wurde ein ähnlicher Phosphatverbrauch wie in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen gemessen (Abb. 32). In  $\Delta leu5$ -Zellen liegt also kein Defekt in der oxidativen Phosphorylierung vor. In Mitochondrien mit einem Defekt in der oxidativen Phosphorylierung ( $\Delta cor1$ ) oder ohne funktionellen Phosphatcarrier ( $\Delta mir1$ ) wurde im Vergleich kein Membranpotential-getriebener Einbau von Phosphat in ADP beobachtet (Abb. 38). Zur weiteren Überprüfung dieser Phosphorylierungsreaktion wurde in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen der ADP/ATP-Carrier durch Zugabe von CAT blockiert, so daß kein ATP synthetisiert werden konnte.

Die Daten zeigen eindeutig, daß das verlangsamte Wachstum von  $\Delta leu5$ -Zellen unter nicht-fermentativen Bedingungen nicht durch eine Störung der oxidativen Phosphorylierung hervorgerufen sein kann, sondern in der Fehlfunktion eines anderen mitochondrialen Prozesses begründet sein muß.

### 3.5.3 Identifizierung des möglichen Substrats von Leu5p

Um die Funktion des Leu5p zu entschlüsseln, wurde versucht, das Substrat von Leu5p zu identifizieren. Als Ausgangspunkt wurden in der Literatur beschriebene charakteristische Eigenschaften verschiedener Hefemutanten benutzt. Einzeldelationen der Gene *LEU4* oder *LEU5* ergeben keine Auxotrophie für Leucin (Chang et al., 1984). Hingegen benötigt eine Doppeldelationsmutante die Zugabe von Leucin. Ursprünglich war daher vermutet worden, daß Leu5p eine Isoform von Leu4p ist, also auch eine Funktion als  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (IPMS) ausübt. Dies wurde jedoch durch die Sequenzierung des *LEU5* Gens widerlegt. Die vollständige Sequenzierung des Hefegenoms trug dazu bei, daß Leu9p als zweite IPMS neben Leu4p identifiziert werden konnte (Pelzer and Lill, unveröffentlicht) (Abb. 39).



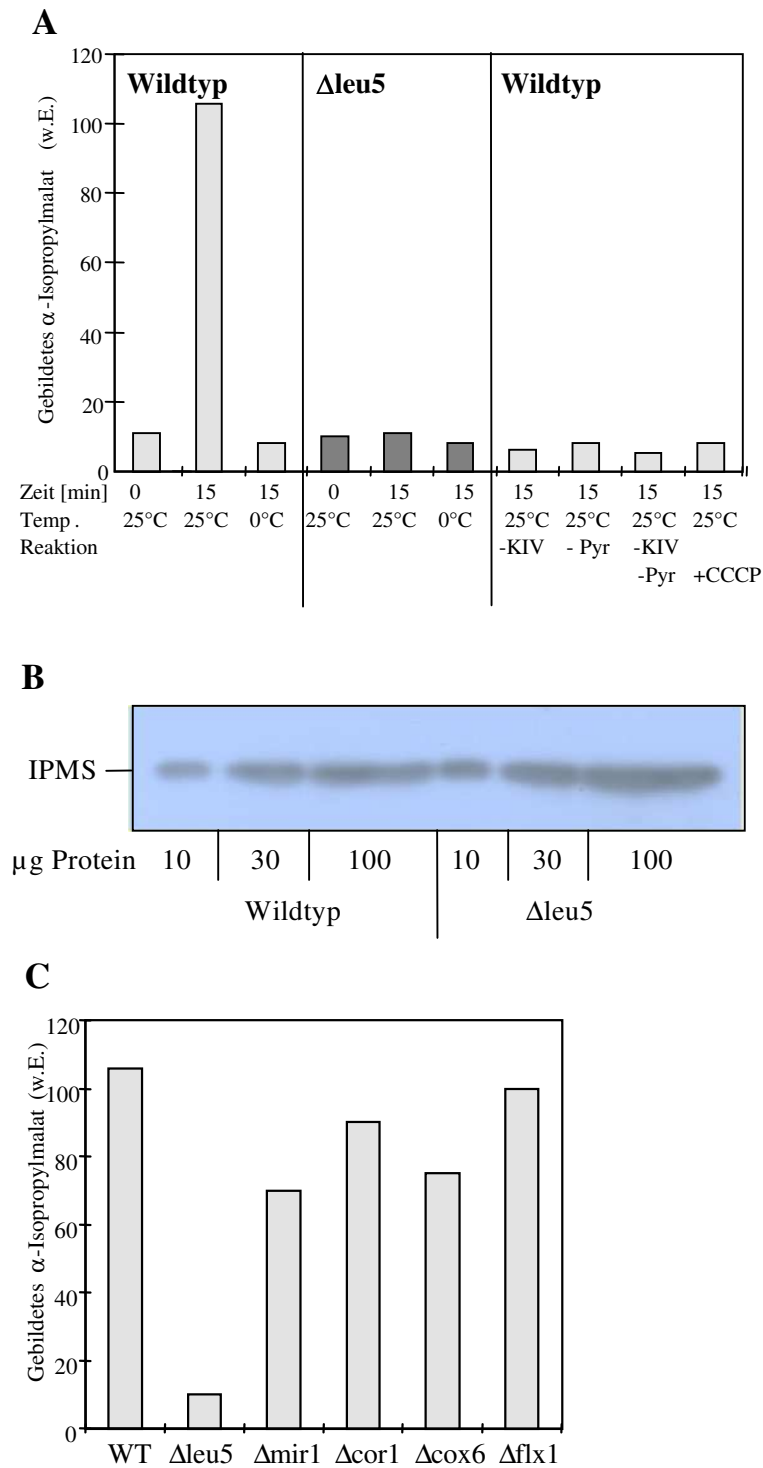
**Abb. 39. Die späten Schritte der Leucinbiosynthese in Hefe.** Die Lokalisierung der verschiedenen Enzyme ist angegeben. Pyr, Pyruvat;  $\alpha$ -KIV,  $\alpha$ -Ketoisovalerat;  $\alpha$ -IPM,  $\alpha$ -Isopropylmalat;  $\beta$ -IPM,  $\beta$ -Isopropylmalat;  $\alpha$ -KIC,  $\alpha$ -Ketoisocaproat; mtLeu4p und cytLeu4p bezeichnen die mitochondriale und die cytosolische Form von Leu4p.

Leu9p ist in seiner Aminosäuresequenz sehr ähnlich zu Leu4p und kommt ausschließlich in den Mitochondrien vor. Im Gegensatz dazu wurde Leu4p sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytosol lokalisiert (Abb. 39, Beltzer et al., 1988)). Das bedeutet, daß in  $\Delta$ leu4-Zellen  $\alpha$ -Isopropylmalat ( $\alpha$ -IPM) ausschließlich in den Mitochondrien synthetisiert werden kann.

Um die Verbindung zwischen Leu5p und Leu4p zu verstehen, die zur Leucinauxotrophie führt, wurde die IPMS-Aktivität in verschiedenen Zellen bestimmt.

3.5.3.1 Intakte Mitochondrien ohne Leu5p weisen einen Defekt in der Synthese von  $\alpha$ -Isopropylmalat auf

Die Synthese von  $\alpha$ -IPM durch  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (IPMS) wurde in intakten isolierten Mitochondrien anhand des fluoreszierenden Umbelliferonderivats von  $\alpha$ -IPM verfolgt (Abb. 40).



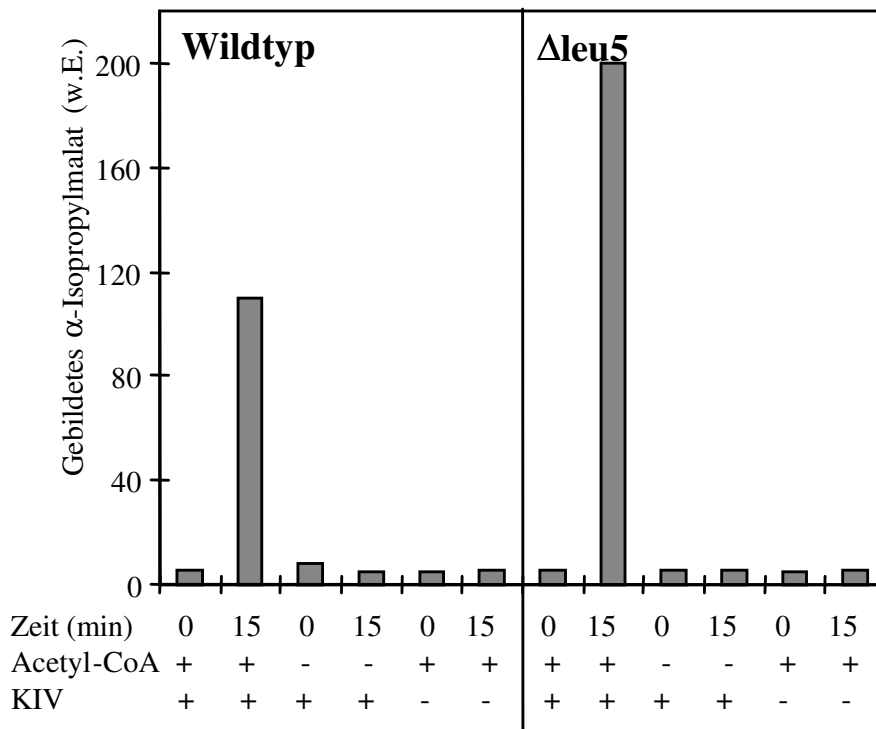


**Abb. 40. Mitochondrien ohne Leu5p weisen einen Defekt in der Synthese von  $\alpha$ -Isopropylmalat auf.** **A.** Mitochondrien wurden aus Wildtyp (WT)- und  $\Delta$ leu5-Zellen, die auf YPGal-Medium gewachsen waren, isoliert. Sie wurden in SOH-Hepes-Puffer für 15 min bei 0°C oder 25°C mit 2 mM  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV) und 2 mM Pyruvat (Pyr) - wenn nicht anders angegeben - inkubiert. Eine Probe enthielt 20  $\mu$ M CCCP, um das Membranpotential zu zerstören. Das gebildete  $\alpha$ -Isopropylmalat wurde umgewandelt in ein Umbelliferonderivat, welches dann durch Fluorimetrie bestimmt wurde. w.E., willkürliche Einheiten. **B.** Isolierte Mitochondrien aus Wildtyp- und  $\Delta$ leu5-Zellen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Proteine aufzutrennen. Nach Transfer auf Nitrozellulose wurde  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (IMPS) durch Immundekorationsanalyse durch einen spezifischen Antikörper detektiert. **C.** Mitochondrien aus den angegebenen Hefestämmen wurden mit 2 mM KIV und 2 mM Pyruvat bei 25 °C wie unter A beschrieben inkubiert.  $\alpha$ -Isopropylmalat wurde bestimmt wie unter A angegeben. Verwendet wurden Mitochondrien aus Zellen, in denen die Gene des Phosphatcarriers ( $\Delta$ mir), des FAD Carriers ( $\Delta$ flx1), der core1-Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette ( $\Delta$ cor1) oder der Untereinheit 6 des Komplexes IV der Atmungskette ( $\Delta$ cox6) deletiert waren. WT, Wildtyp.

Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen zeigten eine temperatur- und zeitabhängige Bildung von  $\alpha$ -IPM (Abb. 40A). Die Synthese benötigte die Zugabe von  $\alpha$ -Ketoisovalerat und Pyruvat (für die intra-mitochondriale Bildung von Acetyl-CoA, da dieses nicht in die Mitochondrien eintreten kann) und wurde inhibiert durch die Zugabe des Entkopplers CCCP, der vermutlich die potentialabhängige Aufnahme von  $\alpha$ -Ketoisovalerat und/oder Pyruvat in die Mitochondrien blockiert. Im Vergleich zu Wildtyporganellen synthetisierten Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen kein  $\alpha$ -IPM, obwohl diese Organellen normale Mengen an IPMS enthielten, wie in der Immundekoration gezeigt werden konnte (Abb. 40B). In isolierten Mitochondrien aus Zellen, in denen die Gene des Phosphatcarriers ( $\Delta$ mir1), des FAD Carriers ( $\Delta$ flx1), einer Untereinheit des Komplexes III ( $\Delta$ cor1) oder des Komplexes IV ( $\Delta$ cox6) deletiert waren, war die  $\alpha$ -IPM-Synthese vergleichbar zu Wildtyp-Zellen (Abb. 40C). Dies zeigt, daß die intakten Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen einen spezifischen Defekt in der von IPMS katalysierten Reaktion aufweisen.

#### 3.5.3.2 Lysierte Mitochondrien aus $\Delta$ leu5-Zellen können $\alpha$ -Isopropylmalat synthetisieren

Diese Beobachtungen an intakten Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen könnten sowohl durch einen Defekt in der enzymatischen Aktivität der IPMS als auch durch das Fehlen eines Substrates erklärt werden. Um dies zu untersuchen, wurden ähnliche Versuchsbedingungen wie in Kapitel 3.5.3.1 gewählt. Jedoch wurden die Mitochondrien vor Versuchsbeginn lysiert, aggregiertes Material abzentrifugiert und der Extrakt zur Synthese von  $\alpha$ -IPM aus  $\alpha$ -Ketoisovalerat und Acetyl-CoA eingesetzt (Abb. 41).



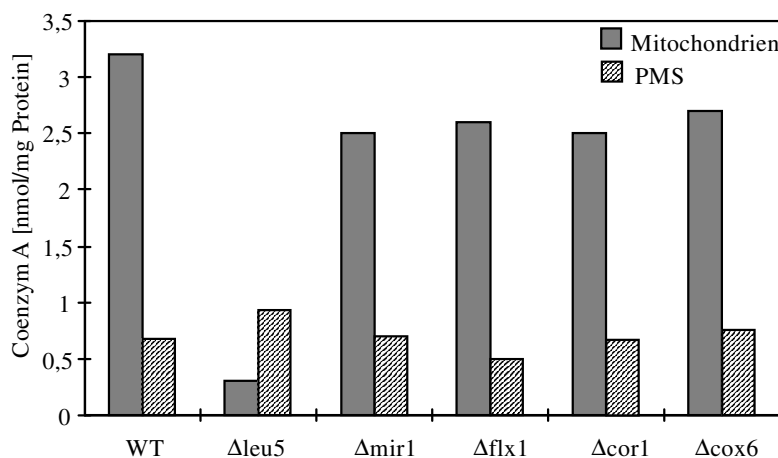
**Abb. 41. Die Bildung von  $\alpha$ -IPM in Detergensextrakten von Mitochondrien aus Wildtyp- und  $\Delta leu5$ -Zellen erfolgt mit vergleichbarer Effizienz.** Die Mitochondrien wurden aus Wildtyp- und  $\Delta leu5$ -Zellen isoliert, die auf YPGal Medium gewachsen waren. Die Organellen wurden in SOH-Hepes-Puffer lysiert, der 0,05% Triton X-100 enthielt, und die Proben für 10 min bei 12 000 Upm zentrifugiert. Der Extrakt wurde für 0 oder 15 min mit 2 mM  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV) und 1 mM Acetyl-CoA - wie angegeben - inkubiert.  $\alpha$ -IPM wurde - wie in Abb. 40A beschrieben - bestimmt. w.E., willkürliche Einheiten.

Lysierte Mitochondrien aus  $\Delta leu5$ -Zellen wiesen eine fast zweifach höhere IPMS-Aktivität im Vergleich zu Extrakten der Wildtyp-Organellen auf (Abb. 35). Die Bildung von  $\alpha$ -IPM war zeit- und temperaturabhängig und benötigte die Zugabe der Substrate von IMPS,  $\alpha$ -Ketoisovalerat und Acetyl-CoA. Die Zugabe von  $Zn^{2+}$  Ionen zur Stimulierung der  $\alpha$ -IPM-Synthese war nicht erforderlich, was die Möglichkeit ausschließt, daß das Fehlen von  $Zn^{2+}$  in der mitochondrialen Matrix der Grund für die defekte IPMS Reaktion in intakten  $\Delta leu5$ -Mitochondrien war (nicht gezeigt). Diese Schlußfolgerung wird durch die Tatsache gestützt, daß die  $Zn^{2+}$ -abhängige mitochondriale Alkoholdehydrogenase in  $\Delta leu5$ -Organellen Wildtyp-Aktivität aufwies (nicht gezeigt). Das in Abb. 41 dargestellte Experiment zeigt, daß Mitochondrien aus  $\Delta leu5$ -Zellen aktives IPMS Enzym enthalten. Die IPMS kann  $\alpha$ -IPM jedoch nur nach Öffnen der mitochondrialen Innenmembran synthetisieren.

### 3.5.3.3 Leu5p ist für die Akkumulation von CoA in den Mitochondrien verantwortlich

Bei der Messung der Synthese von  $\alpha$ -IPM in lysierten Mitochondrien wurde Acetyl-CoA als Substrat der IPMS zu dem Versuchsansatz gegeben (Abb. 41). Bei der Messung in intakten Mitochondrien hingegen erfolgte die Bereitstellung von Acetyl-CoA für die IPMS-Reaktion über das in den Versuchsansatz gegebene Pyruvat (Abb. 40). Nach Transport über die mitochondriale Membran dient das Pyruvat als Substrat der Pyruvat-Dehydrogenase, um zusammen mit Coenzym A (CoA) das Acetyl-CoA zu synthetisieren. Da in intakten Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen, in denen die  $\alpha$ -IPM-Synthese stark gestört war, die Pyruvat-Dehydrogenase aktiv ist (nicht gezeigt), wurde postuliert, daß ein Mangel an CoA in der Matrix von Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen der Grund für die gestörte Synthese von  $\alpha$ -IPM sein könnte. Daher wurde der CoA-Gehalt in isolierten Mitochondrien und im postmitochondrialen Überstand (PMS) verschiedener Hefezellen gemessen (Abb. 42).

Zur Bestimmung des CoA-Gehalts wurden die Mitochondrien und PMS zuvor de-proteiniert. Die CoA-Menge wurde über eine enzymatische Methode mit der Phosphotransacetylase bestimmt. Die Phosphotransacetylase-Reaktion war dabei gekoppelt an zwei weitere enzymatische Reaktionen. CoA wurde über die Phosphotransacetylase acetyliert. Das entstandene Acetyl-CoA wurde mit Oxalacetat durch die Citratsynthase in Citrat umgewandelt, wobei CoA regeneriert wurde und erneut in den Zyklus eintreten konnte. Die umgesetzte Menge an CoA wurde durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige Nachbildung von Oxalacetat durch die Malatdehydrogenase gemessen. Die Methode erfaßt sowohl CoA als auch acetyliertes CoA.

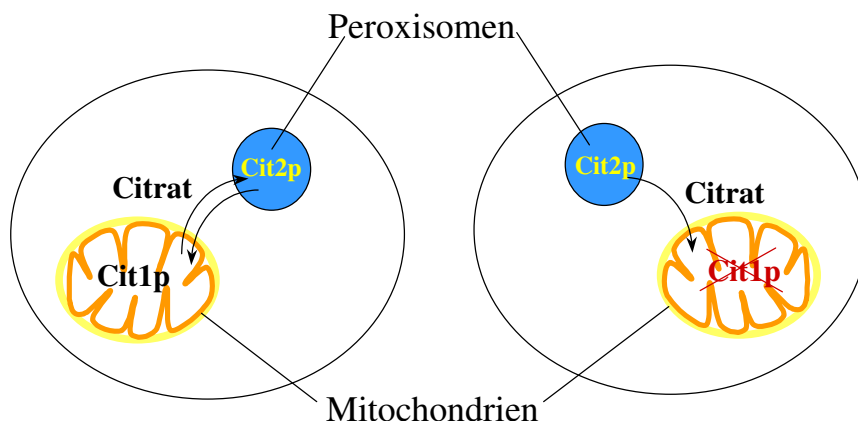


**Abb. 42.  $\Delta$ leu5-Zellen enthalten nur eine geringe Menge an CoA.** Mitochondrien und postmitochondrialer Überstand (PMS) wurden von den angegebenen Stämmen präpariert. Die Menge an CoA und seines acetylierten Derivats wurde bestimmt. WT, Wildtypstamm, andere Zellen siehe Abb. 40C.

In Mitochondrien und PMS von Wildtyp-Zellen wurden 3,2 und 0,7 nmol CoA/mg Protein gefunden (Abb. 42). Unter Annahme einer geschätzten Proteinkonzentration von 300 mg/ml für Mitochondrien und Cytoplasma entsprechen diese Werte 0,96 und 0,21 mM CoA. Auffälligerweise enthielten Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen 15mal weniger CoA im Vergleich zu Organellen aus Wildtyp-Zellen, während im PMS ähnliche Mengen gefunden wurden. Keine signifikanten Abweichungen der CoA-Menge relativ zu Wildtyp-Zellen wurden sowohl für Mitochondrien als auch für PMS verschiedener Mutantenzellen bestimmt (Abb. 42). Leu5p scheint somit wichtig für die Akkumulation von CoA in der mitochondrialen Matrix zu sein.

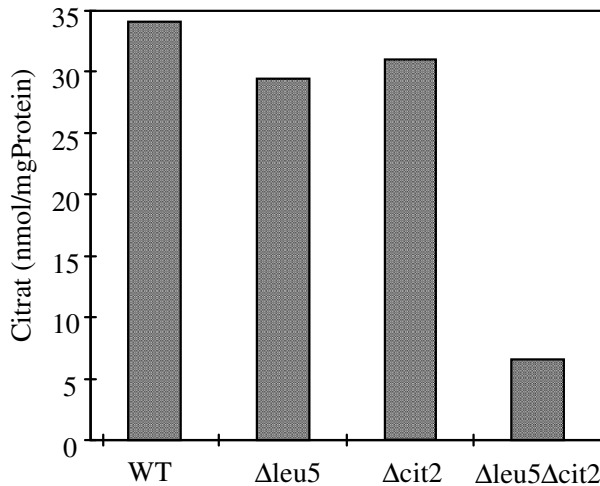
#### 3.5.3.4 Inaktivierung der peroxisomalen Citratsynthase in $\Delta$ leu5-Zellen erniedrigt die Citratkonzentration in der Zelle

Um einen weiteren Hinweis dafür zu bekommen, daß Leu5p für die Akkumulation von CoA in den Mitochondrien verantwortlich ist, wurde eine Kombination aus genetischen und biochemischen Methoden gewählt. Dieser Ansatz zielte auf die Aktivitätsmessung der mitochondrialen Citratsynthase (Cit1p) ab. Das Enzym funktioniert - wie die  $\alpha$ -IPM-Synthase - Acetyl-CoA-abhängig.



**Abb. 43. Die Citratsynthasen Cit1p und Cit2p sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Hefezelle lokalisiert.**

Da Mitochondrien aus  $\Delta$ leu5-Zellen nur sehr wenig Citrat mit der mitochondrialen Citratsynthase Cit1p synthetisieren sollten, liefert die peroxisomale Citratsynthase Cit2p die Hauptmenge an Citrat in diesen Zellen (Abb. 43). Um die Funktion von Cit1p in  $\Delta$ leu5-Zellen überprüfen zu können, wurde das *CIT2* Gen in Wildtyp- und  $\Delta$ leu5-Zellen ausgeschaltet und die Konsequenzen dieser Inaktivierung verfolgt (Abb. 44).

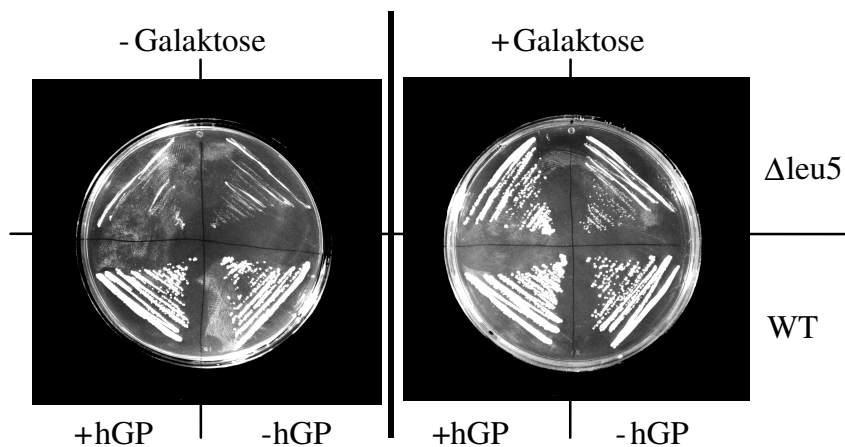


**Abb. 44. Die Doppelmutante  $\Delta leu5\Delta cit2$  enthält sehr wenig Citrat.** Um die zelluläre Citratkonzentration zu messen, wurden die Wildtyp (WT)- und Mutanten-Zellen aufgeschlossen und de-proteiniert. Anschließend wurde die Citratkonzentration über eine Aneinanderreihung von drei enzymatischen Reaktionen bestimmt. Die Citratlyase stellt ein Gleichgewicht zwischen Citrat, Acetat und Oxalacetat ein. Oxalacetat wird spontan zu Pyruvat decarboxyliert. Um sowohl Oxalacetat als auch Pyruvat vollständig zu erfassen, verwendet man als Indikator-Enzyme Malat-Dehydrogenase und Laktat-Dehydrogenase. Die Abnahme der NADH-Konzentration, gemessen an der Abnahme der Extinktion bei 340 nm, ist ein Maß für die umgesetzte Citrat-Menge.

$\Delta leu5\Delta cit2$ -Zellen enthalten fünffach weniger Citrat als Wildtyp-Zellen oder Mutanten mit Einzeldelationen der *LEU5* oder *CIT2* Gene (Abb. 44). Die Doppelmutante zeigte auf Vollmedium mit Glycerin kein Wachstum, d.h., diese Mutante wies im Gegensatz zu  $\Delta leu5$ -Zellen einen strikten *PET* Phänotyp auf (nicht gezeigt). Zusätzlich zeigten  $\Delta leu5\Delta cit2$ -Zellen eine augenfällige Erniedrigung der Cytochrome (Abb. 37) und eine Glutamatauxotrophie (nicht gezeigt). Dieser Phänotyp von  $\Delta leu5\Delta cit2$ -Zellen kann leicht damit erklärt werden, daß Mitochondrien aus *Leu5p*-defizienten Zellen nur eine geringe Menge an mitochondrialem CoA besitzen. Der Mangel an mitochondrialem CoA zusammen mit dem Fehlen der peroxisomalen *Cit2p* erklärt den reduzierten zellulären Gehalt an Citrat (Abb. 44). Als Konsequenz davon ist die Syntheserate von  $\alpha$ -Ketoglutarat (durch den Citratzyklus) und von seinem Transaminierungsprodukt Glutamat, die Vorläuferverbindung von C5 Aminosäuren, vermindert. Weiterhin ist offenbar die Produktion von Succinyl-CoA, dem Substrat des ersten Schrittes der Häm biosynthese, gestört. Dies erklärt den Cytochromdefekt in  $\Delta leu5\Delta cit2$ -Zellen. Somit bietet die Analyse von Zellen, in denen mitochondriales *Leu5p* und peroxisomales *Cit2p* inaktiviert waren, einen *in vivo* Hinweis für die Funktion von *Leu5p* bei der Akkumulation von CoA in den Mitochondrien. *Leu5p* kann damit die Funktion eines Transporters von CoA oder eines Vorläufermoleküls des Coenzym zugeordnet werden.

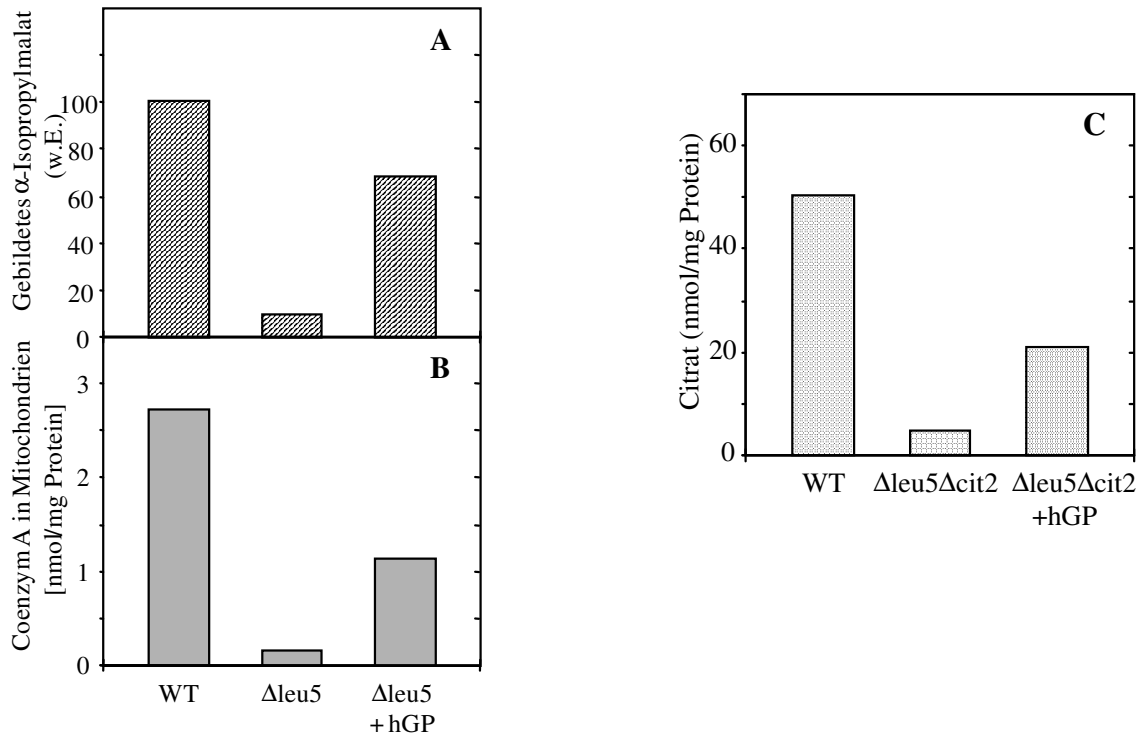
### 3.5.4 Das "human Graves` disease protein" kann Leu5p funktionell ersetzen

Die signifikante Homologie (36% identische Aminosäurereste, Abb. 34) zwischen dem "human Graves` disease protein" (hGP) und Leu5p machte es wahrscheinlich, daß diese Proteine dieselbe Funktion in Mitochondrien ausüben. Daher wurde die funktionelle Komplementation von  $\Delta$ leu5- Zellen durch Expression der cDNA von hGP unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors getestet.  $\Delta$ leu5-Zellen wurden mit einem Vektor transformiert, der das hGP Gen enthält. Diese Zellen wurden hinsichtlich ihres Wachstums auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen analysiert (Abb. 45).



**Abb. 45.  $\Delta$ leu5-Zellen mit exprimiertem hGP komplementieren den Wachstumsphänotyp von  $\Delta$ leu5-Zellen.** Wildtyp (WT)- und  $\Delta$ leu5-Zellen wurden auf Agarplatten mit Vollmedium und 2% Glycerin 4 Tage lang bei 30°C inkubiert. Die rechte Platte enthielt zusätzlich 0,2% Galaktose. Wenn angegeben enthielten die Zellen ein Plasmid mit der cDNA von hGP ("human Graves` disease protein"). Die Expression des hGP wurde über einen Galaktose-induzierbaren Promotor reguliert.

Wenn die Expression von hGP durch Zugabe von Galaktose induziert wurde, zeigten die  $\Delta$ leu5-Zellen Wildtyp-Wachstum (Abb. 45, rechte Platte).  $\Delta$ leu5-Zellen wuchsen unter diesen Bedingungen deutlich langsamer. Die Komplementation des Wachstumsdefektes von  $\Delta$ leu5-Zellen durch Expression von hGP zeigt, daß hGP das Leu5p Protein ersetzen kann.



**Abb. 46. Das "human Graves` disease protein" (hGP) kann die Funktion von Leu5p weitgehend ersetzen.** Biochemische Untersuchungen wurden in Wildtyp (WT)-,  $\Delta\text{leu5}$ - und  $\Delta\text{leu5}\Delta\text{cit2}$ -Zellen durchgeführt. **A.** Die Menge an gebildetem  $\alpha$ -Isopropylmalat wurde in isolierten Mitochondrien wie in Abb. 40A angegeben bestimmt. w.E., willkürliche Einheiten. **B.** Der Gehalt an mitochondrialem CoA wurde in isolierten Mitochondrien wie in Abb. 42 beschrieben gemessen. **C.** Die Bestimmung der mitochondrialen Citratkonzentration erfolgte in Zellextrakten (siehe Abb. 44).

Die funktionelle Ähnlichkeit zwischen Leu5p und hGP konnte in einer Serie von biochemischen Untersuchungen bestätigt werden. Die in Abb. 46 zusammengefaßten Daten belegen, daß das humane Protein hGP das Hefeprotein Leu5p in seiner Funktion weitgehend ersetzen kann. So wurde in  $\Delta\text{leu5}$ -Zellen nach Expression des hGP im Vergleich zu  $\Delta\text{leu5}$ - und Wildtyp-Zellen die Bildung von  $\alpha$ -Isopropylmalat (Abb. 46A) und der CoA-Gehalt von Mitochondrien (Abb. 46B) gemessen. Während in  $\Delta\text{leu5}$ -Zellen die erhaltenen Werte gegenüber Wildtyp-Zellen in diesen beiden Messungen drastisch erniedrigt waren, differierten die Werte in  $\Delta\text{leu5}$ -Zellen mit exprimiertem hGP nur um den Faktor 1,5-2 gegenüber Wildtyp-Zellen. Die Anwesenheit von hGP führte daher zu einer weitgehenden Normalisierung der IPMS-Aktivität bzw. der mitochondrialen CoA-Konzentration. Die Messung der Citratkonzentration in Extrakten von  $\Delta\text{leu5}\Delta\text{cit2}$ -Zellen lieferte eine 15fache Erniedrigung im Vergleich zu der Konzentration in Wildtyp-Zellen (Abb. 46C). Die Expression von hGP in diesen Deletionszellen führte zu einem 7fachen Anstieg der zellulären Citratkonzentration,

nämlich auf 50% des für Extrakte von Wildtyp-Zellen gemessenen Werts. Aus diesen biochemischen Kriterien geht hervor, daß das humane Protein hGP das Hefeprotein Leu5p funktionell weitgehend komplementieren kann.

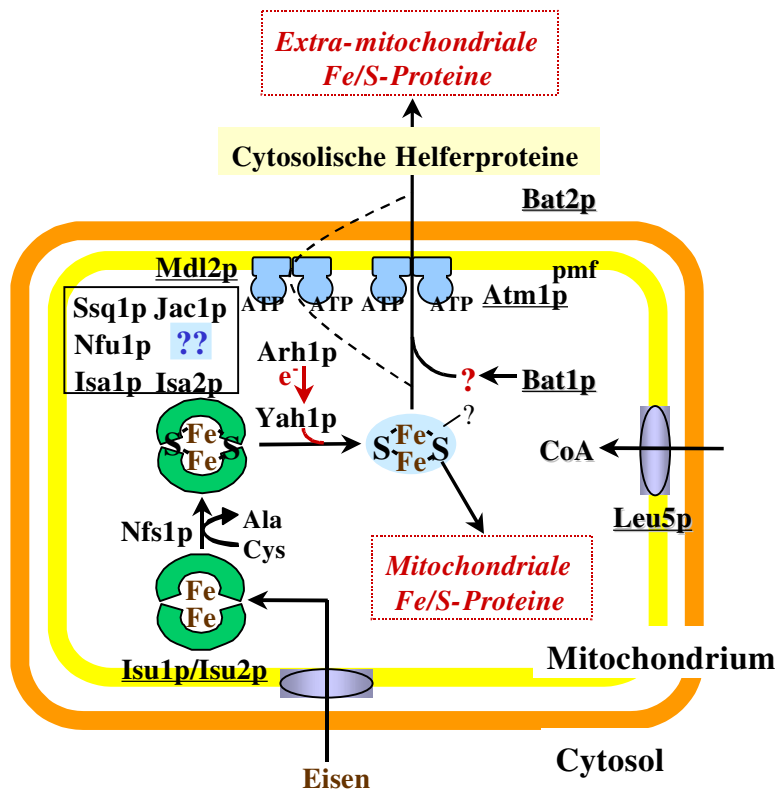
Zusammenfassend belegen diese Daten, daß Leu5p und das "human Graves` disease protein" für die Anreicherung von CoA in den Mitochondrien verantwortlich sind. Im einfachsten Modell könnte Leu5p/hGP danach als Carrier für den Transport von CoA fungieren. Da jedoch bisher unklar ist, ob CoA vollständig außerhalb der Mitochondrien synthetisiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, daß Zwischenstufen der CoA-Synthese als Substrate von Leu5p/hGP dienen.



## 4. Diskussion

### 4.1 Die Mitochondrien sind der Ort der Biosynthese von Fe/S-Clustern

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Hinweise auf eine Funktion des mitochondrialen ABC-Transporters Atm1p in der Biogenese von cytosolischen Fe/S-Proteinen gefunden. Daraus ergaben sich für den Fortgang der Arbeit wichtige Fragestellungen, die zentraler Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen waren. Es wurden Proteine charakterisiert, die an der Reifung von Fe/S-Proteinen beteiligt sind bzw. die in Wechselwirkung mit Atm1p stehen. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und Daten aus der Literatur wurde ein Modell zur Biogenese von Fe/S-Clustern aufgestellt, das im folgenden genauer beschrieben werden soll (Abb. 47).



**Abb. 47. Modell der Reifung von Fe/S-Proteinen in *S. cerevisiae*.** Die Biosynthese mitochondrialer Fe/S-Proteine ist abhängig von den mitochondrialen Proteinen Nfs1p, Isu1p/Isu2p, Arh1p, Yah1p, Isa1p/Isa2p, Ssq1p, Jac1p und Nfu1p. Für die Reifung extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine werden weiterhin ein Membranpotential (pmf) und die Proteine Atm1p und Bat1p/Bat2p, vermutlich auch Mdl2p benötigt. Es ist noch unbekannt, wie Bat1p (und Bat2p) genau in den Prozeß der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine eingreift. Weiterhin ist unbekannt, welcher Bindungspartner (grau unterlegt) den in der Matrix synthetisierten Fe/S-Cluster zum Apoprotein transportiert. In einem anderen Teil dieser Arbeit wurde Leu5p als mitochondriales Carrierprotein identifiziert. Proteine, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind unterstrichen. Ala, Alanin; Cys, Cystein, e<sup>-</sup>, Elektronen.

#### 4.1.1 Mitochondriale Synthese von Fe/S-Clustern

Die Synthese von Fe/S-Clustern beginnt in den Mitochondrien mit Schritten, die schon recht gut bekannt sind. Daran beteiligt sind die Isu Proteine und Nfs1p (s. Abb. 47). Als initialer Schritt binden Isu1p und Isu2p Eisen. Die Cysteindesulfurase Nfs1p stellt den Schwefel für die Synthese des Fe/S-Clusters an den Isu-Proteinen zur Verfügung (Kispal et al., 1999). Dieser Mechanismus der Biogenese eines Fe/S-Clusters in der Hefe wird gemäß der Synthese in Prokaryonten postuliert.

Eine Sequenzanalyse konnte eine Homologie zwischen den Isu Proteinen und dem bakteriellen IscU und dem N-Terminus von NifU zeigen. In diesen Proteinen sind drei Cysteine konserviert, deren Funktion bei der Bindung von Eisen inzwischen nachgewiesen ist. So konnte für NifU gezeigt werden, daß es zwei Eisenionen pro NifU-Homodimer bindet (Yuvaniyama et al., 2000). Unsere eigenen Arbeiten zeigten, daß Hefezellen mit Deletionen der Gene *ISU1* oder *ISU2* keinen signifikanten Phänotyp aufweisen. Aufgrund der starken Sequenzhomologie der beiden Isu Proteine ist dies auch nicht weiter überraschend, da man eine überlappende Funktion dieser Proteine vermuten kann. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, daß eine Doppeldeletion der *ISU* Gene letal für die Hefezelle ist. Um eine funktionelle Untersuchung der Isu Proteine zu ermöglichen, wurde ein Austausch des eigenen Promotors der *ISU1* bzw. *ISU2* Gene im Hefegenom gegen einen Galaktose-regulierbaren Promotor in  $\Delta$ isu2- bzw.  $\Delta$ isu1-Stämmen vorgenommen. Durch Wachstum auf Glukose-haltigem Medium konnte damit eine starke Erniedrigung der zellulären Konzentration des noch verbliebenen Isu Proteins in den zwei Stämmen erreicht werden. Wir konnten beobachten, daß eine Depletion der Isu Proteine zu einem deutlichen Defekt in der Fe/S-Cluster Bildung mitochondrialer Proteine führt. Dies konnte sowohl an dem Enzymaktivitätsverlust der entsprechenden Fe/S-Proteine (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) als auch durch die Messung der Neubildung eines Fe/S-Clusters in Fe/S-Proteinen nachgewiesen werden.

Bisher wurde noch kein experimenteller Beweis der Eisenbindung von Isu1p und Isu2p erbracht, aber durch *in vitro* Experimente oder Reinigung der Isu Proteine sollte das möglich sein. Für die weitere Untersuchung der Funktion von Isu1p und Isu2p in der Fe/S-Cluster Biogenese, liegt es nahe, auf die Beobachtungen von Dean (Yuvaniyama et al., 2000) zurückzugreifen. Diese Gruppe konnte zeigen, daß bei einem Aminosäureaustausch im N-

Terminus von NifU die intermediäre Bindung des Fe/S-Clusters zeitlich verlängert und so nachweisbar gemacht werden konnte.

In Analogie zu Befunden mit NifS in Prokaryonten (Zheng et al., 1994) liefert das essentielle Hefeprotein Nfs1p den Schwefel für die Fe/S-Cluster Bildung. Nfs1p fungiert als Cysteindesulfurase, die die Bildung von elementarem Schwefel aus Cystein katalysiert. Eine Depletion der Nfs1p-Konzentration führt zu einem starken Biogenesedefekt mitochondrialer Fe/S-Proteine (Kispal et al., 1999).

Nach dem aufgestellten Modell (Abb. 47) liegt der an den Isu Proteinen durch Nfs1p synthetisierte Fe/S-Cluster nun intermediär gebunden vor. Gemäß der in Bakterien erhaltenen Ergebnisse (Yuvaniyama et al., 2000) ist für die Abdissoziation des Fe/S-Clusters *in vitro* die Zugabe eines Reduktionsmittels notwendig. Als potentieller Elektronenlieferant in physiologischem Fall kommt eine Elektronentransportkette in Frage, die von NADPH über das essentielle Protein Arh1p (Adrenodoxin-Reduktase-Homolog 1) und das Ferredoxin Yah1p läuft. Für beide Proteine konnte eine Beteiligung an der Synthese mitochondrialer Fe/S-Proteine gezeigt werden (Lange et al., 2000; Manzella, in Vorbereitung). Jedoch ist noch nicht direkt untersucht, ob diese Proteine Elektronen an den an die Isu Proteine gebundenen Fe/S-Cluster liefern, damit der Cluster abdissoziieren kann. Der Fe/S-Cluster von Yah1p ist in seinen spektroskopischen Eigenschaften nahezu identisch zu dem permanent gebundenen [2Fe-2S]-Cluster in einer zentralen Region des bakteriellen NifU. Für letzteren Cluster wird spekuliert, daß er Reduktionsäquivalente zur Synthese der Fe/S-Cluster für das Enzym Nitrogenase bereitstellt (Yuvaniyama et al., 2000).

#### 4.1.2 Übertragung neusynthetisierter Fe/S-Cluster in mitochondriale Apoproteine

Wie der synthetisierte Fe/S-Cluster in den Mitochondrien zu seinem Apoprotein gelangt und eingebaut wird, ist noch weitgehend ungeklärt. Jedoch sind eine Reihe mitochondrialer Proteine bekannt, die an diesem Prozeß mitwirken könnten. Die Proteine Isa1p und Isa2p gehören dazu. Beide Isa Proteine sind in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Kaut et al., 2000; Pelzer und Lill, eingereicht). Für die beiden Proteine wurde eine Funktion in der Reifung mitochondrialer Fe/S-Proteine nachgewiesen. Die Isa Proteine sind jedoch nicht essentiell für die Zelle, wie es für die beiden Isu Proteine, Nfs1p und Yah1p bekannt ist. Isa1p und Isa2p können nur die Effizienz des Prozesses der Reifung von Fe/S-Proteinen steigern. Eventuell üben sie eine Chaperon- oder eine Transportfunktion aus, um fertige Fe/S-Cluster auf die

mitochondrialen Zielproteine zu übertragen. Die relativ geringe Aminosäuresequenzidentität zwischen Isa1p und Isa2p spricht dafür, daß die beiden Proteine in ihrer Funktion nicht austauschbar sind.

Noch vollkommen ungeklärt ist die Rolle der mitochondrialen Proteine Ssq1p, Jac1p und Nfu1p im Prozeß der Reifung mitochondrialer Fe/S-Proteine. In Zellen mit depletierten Ssq1p- bzw. Jac1p-Konzentrationen wurden verminderte Aktivitäten von mitochondrialen Fe/S-Cluster-haltigen Enzymen gemessen (Strain et al., 1998). Ssq1p bzw. Jac1p sind stark homolog zu Mitgliedern der Hitzeschockproteinfamilie Hsp70/DnaK bzw. Hsp40/DnaJ und HscA bzw. HscB aus Bakterien. HscA und HscB werden vom *isc*-Operon codiert. Die beiden Hefepoteine Ssq1p und Jac1p üben demnach eine Funktion als Chaperone im Prozeß der Fe/S-Cluster Bildung aus.

Für Nfu1p konnte bisher gezeigt werden, daß eine Doppeldeletion von *NFU1* und *SSQ1* zum Verlust der Lebensfähigkeit der Zelle führt,  $\Delta$ nfu1-Zellen jedoch lebensfähig sind (Schilke et al., 1999). Zum Verständnis der Funktion von Nfu1p könnte wichtig sein, daß bei Doppeldeletion von *NFU1* und *ISU1* ein Defekt in der Reifung mitochondrialer Fe/S-Proteine nachgewiesen werden konnte (Schilke et al., 1999). Da die Proteine Isu1p und Nfu1p eine Homologie zum N- bzw. C-Terminus des bakteriellen NifU besitzen, könnten diese beiden Hefepoteine im Prozeß der Fe/S-Cluster Bildung in Wechselwirkung miteinander stehen.

#### 4.1.3 Atm1p und Mdl2p sind für den Transport der Fe/S-Cluster über die mitochondriale Innenmembran ins Cytosol verantwortlich

Eine zentrale Beobachtung dieser Arbeit war, daß auch extra-mitochondriale Proteine auf die Fe/S-Cluster Synthesemaschinerie der Mitochondrien angewiesen sind. Im Verlaufe dieser Arbeit konnte für eine Reihe der oben beschriebenen Proteine eine Beteiligung an der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine nachgewiesen werden. Dazu gehören die Proteine Nfs1p, Isu1p/Isu2p, Yah1p und Isa1p/Isa2p (Kispal et al., 1999; Lange et al., 2000; Kaut et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das bakterielle IscU den Defekt in der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine in Isu Protein-depletierten Zellen vollständig komplementieren kann. IscU war bei diesen Experimenten in der Hefe mitochondrial lokalisiert. Offensichtlich kann die potentielle eisenbindende Funktion der Isu Proteine nur in der Matrix ausgeübt werden. Eisen muß also in die Matrix eintreten, um dort für die Synthese von Fe/S-Clustern cytosolischer Proteine zur Verfügung zu stehen. Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, daß

die mitochondriale Lokalisierung von Nfs1p für die Funktion notwendig ist, da eine cytosolische Fehllokalisierung den Phänotyp einer *nfs1*-Mutante nicht aufhebt (Kispal et al., 1999). Elementarer Schwefel wird für die Fe/S-Cluster Biogenese also ausschließlich in den Mitochondrien gebildet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Mitochondrien zentraler Ort der Fe/S-Cluster Bildung sowohl für mitochondriale als auch extra-mitochondriale Proteine sind. Es ist daher anzunehmen, daß die mitochondriale Maschinerie einen Fe/S-Cluster oder eine Vorstufe produziert, die dann ins Cytosol transferiert wird.

Wie kann ein Fe/S-Cluster über die mitochondriale Innenmembran ins Cytosol transportiert werden? Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß der ABC-Transporter Atm1p in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielt. Es wurde beobachtet, daß in Atm1p-depletierten Zellen ein drastischer Defekt in der Bildung cytosolischer Fe/S-Proteine auftritt (diese Arbeit, Kispal et al., 1999). Dies konnte vor allem am Beispiel der cytosolischen Fe/S-Proteine Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) und dem RNase L Inhibitor 1 (Rli1p) belegt werden. Die Aktivität und die *de novo* Bildung der Fe/S-Cluster dieser Proteine waren in Atm1p-defizienten Zellen stark erniedrigt. Aus diesem Zusammenhang zwischen Atm1p und cytosolischen Fe/S-Proteinen läßt sich die Funktion von Atm1p als Transporter von Fe/S-Clustern schließen. Da Fe/S-Cluster ohne Bindungspartner jedoch chemisch instabil sind und schnell wieder zerfallen, muß dieser Cluster sicherlich in komplexierter Form transportiert werden.

Das extra-mitochondriale Fe/S-Protein Rli1p ist essentiell für die Zelle (Kispal, in Vorbereitung). Das Protein besitzt zwei [4Fe-4S]-Cluster, die durch vier Cysteine gebunden werden. Die Mutation je eines der vier koordinierenden Cysteine in Rli1p führt zum Tod der Zelle. Dies belegt, daß die Bindung dieser Fe/S-Cluster in Rli1p essentiell für das Überleben der Zelle ist. Die Funktion der Mitochondrien beim Einbau von Fe/S-Clustern in Rli1p könnte erklären, warum die Fe/S-Cluster Biogenese und damit Mitochondrien essentiell sind. Dies wirft jedoch die Frage auf, warum Atm1p keinen essentiellen Charakter für Hefe hat. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Hypothese angegangen, daß ein weiterer ABC-Transporter in Mitochondrien existieren könnte, der zumindest partiell eine Funktion beim Transport von Fe/S-Clustern übernehmen kann. Zwei neue Proteine wurden in diesem Zusammenhang als ABC-Transporter identifiziert, Mdl1p und Mdl2p (Dean et al., 1994). Zunächst wurde nachgewiesen, daß beide Proteine in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert sind. Komplementationsversuche zeigten, daß Mdl2p die Funktion von Atm1p zumindest partiell ersetzen kann.  $\Delta$ atm1-Zellen zeigten schon nach dreifacher Erhöhung der Kopienzahl von Mdl2p nahezu Wildtyp-Wachstum. Für Mdl1p konnte kein Effekt

nachgewiesen werden. In Mdl2p-depletierten Zellen konnte aber - im Gegensatz zu Atm1p-defizienten Zellen - kein signifikanter Defekt cytosolischer Fe/S-Proteine gemessen werden. Auf Fe/S-Proteine der Matrix (Aconitase) hatte die Mdl2p Depletion ebenfalls keine Auswirkung, was zu erwarten war. Nur für die mitochondrialen Membranproteine Succinat-Dehydrogenase und den Komplex III der Atmungskette konnte in Mdl2p-defizienten Zellen ein Aktivitätsverlust gemessen werden, mit dem der Atmungsdefekt dieser Zellen begründet werden kann. Weitere Untersuchungen müssen die genaue Funktion von Mdl2p in der Zelle aufklären. Aus unseren Daten kann spekuliert werden, daß Mdl2p spezifisch für den Transport eines Fe/S-Clusters des Rieske-Fe/S-Proteins in Komplex III der Atmungskette verantwortlich sein könnte. Dies könnte erklären, warum in Mdl2p-depletierten Zellen nur die Aktivität von Komplex III und als Folge davon auch die der Succinat-Dehydrogenase, nicht aber die von der Aconitase betroffen ist.

#### 4.1.4 Die Rolle der Bat Proteine bei der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine

Für das mitochondriale Bat1p und das cytosolische Bat2p konnte gezeigt werden, daß diese beiden Proteine als Transaminasen verzweigtkettiger Aminosäuren fungieren (Kispal et al., 1996). Dies konnte in dieser Arbeit mit gereinigtem Protein bestätigt werden. Darüberhinaus üben die Bat Proteine noch eine zweite Funktion aus. Es konnte bewiesen werden, daß weder fehlende verzweigtkettige Aminosäuren noch fehlende  $\alpha$ -Ketosäuren der Grund des Wachstumsdefekts von  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen sind. Dies weist auf eine zusätzliche Transaminase-unabhängige Funktion der Bat Proteine hin. Der Prozeß, in dem diese zweite Funktion ausgeübt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Bei Depletion beider Bat Proteine ist die Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine in der Hefezelle signifikant beeinträchtigt. In  $\Delta$ bat1 $\Delta$ bat2-Zellen ist der Einbau des Fe/S-Clusters in Leu1p und Rli1p gestört. Bat2p ist damit das erste cytosolische Protein, für das eine funktionelle Beteiligung an der Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit Bat1p übt Bat2p eine Funktion aus, die nur cytosolische Fe/S-Proteine betrifft. Die genaue molekulare Funktion der Bat Proteine bleibt unklar. Vorstellbar wäre, daß die Bat Proteine einen Chelator synthetisieren, der Fe/S-Cluster bindet und so in eine transportkompetente Form überführt. Der potentielle Chelator kann offensichtlich von beiden Bat Proteinen synthetisiert und zwischen Mitochondrien und Cytosol ausgetauscht werden, da nur bei Depletion beider Bat Proteine die Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine gestört ist. Eine mögliche Stoffklasse könnten

Hydroxamsäuren darstellen, die von vielen Organismen produziert werden, um als spezifische Eisenchelatoren dieses Metall in die Zelle zu transportieren.

Nach den hier erhaltenen Ergebnissen üben die Bat Proteine zwei unabhängige Funktionen aus, als Transaminasen verzweigt-kettiger Aminosäuren und als Komponenten im Fe/S-Cluster-Haushalt der Zelle. Diese beobachtete Doppelfunktion eines Proteins ist nicht ungewöhnlich. Weitere Enzyme sind bekannt, die verschiedene Funktionen haben. NifS in *A. vinelandii* ist beispielsweise als Cysteindesulfurase und als Selenocysteinylase aktiv (Lacourciere und Stadtman, 1998). Als Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym ist es in seiner Sequenz homolog zu Transaminasen und agiert eventuell auch als Transaminase (Leong-Morgenthaler et al., 1994).

In Prokaryonten findet man kein homologes Protein zu Atm1p. Eine Ausnahme stellt *R. prowazekii* dar (Tab. 4). Dieser Prokaryont ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der im Menschen Fleckfieber verursacht (Andersson et al., 1998). *R. prowazekii* ist hinsichtlich seiner genetischen Ausstattung den Mitochondrien sehr nahe verwandt, steht also evolutionär diesen Organellen sehr nahe. Der Parasit weist eine reduzierte Genausstattung auf, beispielsweise fehlen ihm die Gene, die für die Enzyme der Glykolyse oder der Aminosäuresynthese codieren. So kann *R. prowazekii* auch keine verzweigt-kettigen Aminosäuren synthetisieren, sondern ist hierbei auf seinen Wirt angewiesen. Allerdings besitzt dieser Prokaryont das Bat Homologe IlvE, das sicherlich im Bakterium nicht als Transaminase in der Aminosäuresynthese fungiert. Vielmehr ist zu vermuten, daß das Protein eine Funktion in der Fe/S-Cluster Synthese ausübt und z.B. zur Herstellung eines Chelators gebraucht wird, der Fe/S-Cluster bindet und über Atm1 exportiert.

#### 4.1.5 Der eukaryontische Fe/S-Cluster Biosyntheseapparat entspricht dem in Prokaryonten

Die Biogenese von Fe/S-Clustern scheint in allen Organismen ein essentieller Prozeß zu sein, ohne den Leben nicht möglich ist. So gibt es eine Reihe von Fe/S-Proteinen, die essentiell für die Zelle sind, z.B. Rli1p und Yah1p in *S. cerevisiae*. Die hier beschriebene Maschinerie der Fe/S-Cluster-Bildung ist in Archaeobakterien, Prokaryonten, sowie niedrigen und hohen Eukaryonten konserviert. Tab. 4 zeigt eine Zusammenstellung der an der Fe/S-Cluster Biosynthese beteiligten Komponenten in Hefe und in Bakterien und gibt einen Überblick über die mögliche Funktion der Proteine.

**Tab. 4. Zusammenstellung der an der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese beteiligten Komponenten in Hefe und Bakterien**

Hefeprotein	Bakterielles Homolog	(mögliche) Funktion
Nfs1p	NifS, IscS	Cysteindesulfurase
Isu1p	NifU (N-terminale Domäne), IscU	Bindung von Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und intermediärem Fe/S-Cluster
Isu2p	NifU (N-terminale Domäne, IscU	intermediärem Fe/S-Cluster
Nfu1p	NifU (C-terminale Domäne)	?
Isa1p	IscA, HesB	Chaperon- oder Transportfunktion?
Isa2p	IscA, HesB	Chaperon- oder Transportfunktion?
Yah1p	Fdx ([2Fe-2S]-Ferredoxin)	Reduktion von Schwefel, Eisen oder einem Intermediat der Fe/S-Cluster-Bildung
Arh1p	Ferredoxinreduktase	NAD(P)H-abhängige Reduktion von Yah1p
Ssq1p	HscA	Chaperon vom Hsp70/DnaK-Typ
Jac1p	HscB	Chaperon vom Hsp40/DnaJ-Typ
Atm1p	Atm1 (in <i>Rickettsia prowazekii</i> )	ABC-Transporter

Auch im Menschen findet man zu den in Tab. 4 aufgeführten Komponenten homologe Proteine, z.B. zum Nfs1p und Atm1p. Letzteres Protein wird beim Menschen als hABC7 bezeichnet (Csere et al., 1998). Mutationen in hABC7 sind die Ursache einer seltenen Eisenspeicherkrankheit, der X-Chromosomen-verknüpften sideroblastischen Anämie mit cerebellarer Ataxie XLSA/A (Allikmets et al., 1999). Daher ist hABC7 aus der medizinischen Sicht ein sehr interessantes Protein.

Vorläufig bleibt sowohl für Prokaryonten als auch für Eukaryonten die Frage offen, wie die einzelnen Proteine in der Zelle interagieren und den Prozeß der Fe/S-Cluster Biosynthese schrittweise ausführen, so daß der Fe/S-Cluster letztendlich sein Zielprotein erreichen und dort eingebaut werden kann. Gerade über den zuletzt genannten Schritt, den Einbau der Fe/S-Cluster in die Apoproteine, kann zur Zeit nur spekuliert werden. Weiterhin ist ungeklärt, wie die unterschiedlichen chemischen Formen von Fe/S-Clustern synthetisiert werden. Der Fe/S-Cluster liegt vor allem als [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster in der Zelle vor. Doch welche Faktoren diese unterschiedlichen chemischen Formen bestimmen, ist noch unbekannt.



Zusammenfassend konnten durch diese Arbeit einige wichtige Proteine (Atm1p, Isu1p, Isu2p, Mdl2p, Bat1p, Bat2p) charakterisiert und in einen bisher wenig bekannten Prozeß eingeordnet werden. Überraschend war bei den Untersuchungen das Ergebnis, daß der Prozeß der Fe/S-Cluster Bildung mitochondrial erfolgt, aber auch essentiell für die Reifung extramitochondrialer Fe/S-Proteine ist. Mit Hilfe der in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse und Daten aus der Literatur war es möglich, ein erstes Modell für den Prozeß der Fe/S-Cluster Biogenese aufzustellen und damit die Grundlage für weitere Untersuchungen zu schaffen.

#### **4.2 Das Carrierprotein Leu5p transportiert Coenzym A in die Mitochondrien**

Carrierproteine sind die wichtigsten Faktoren, die den Transport von Metaboliten in und aus den Mitochondrien ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Leu5p als Carrierprotein der mitochondrialen Innenmembran identifiziert. Um das Substrat dieses Carriers zu bestimmen, wurde die in der Literatur beschriebene Verbindung zwischen Leu5p und der  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (Leu4p) näher untersucht (Chang et al., 1984). Es konnte gezeigt werden, daß in Mitochondrien aus Leu5p-defizienten Zellen keine katalytische Aktivität von Leu4p nachzuweisen war. Genauso wie Leu4p ist auch die mitochondriale Acetyl-CoA-abhängige Citratsynthase bei Leu5p Depletion nicht aktiv. Als Grund für diese Ergebnisse konnte die geringe Konzentration an Coenzym A (CoA) in den Mitochondrien von Leu5p-defizienten Zellen verantwortlich gemacht werden. Offensichtlich spielt Leu5p als Carrierprotein bei der Akkumulation von CoA in den Mitochondrien eine entscheidende Rolle.

Die Lokalisierung der CoA-Syntheseschritte in der Hefezelle ist noch nicht genau bekannt. Zumindest die ersten Schritte der Bildung von CoA aus Pantothensäure, L-Cystein und ATP erfolgen im Cytosol. Diese Reaktionsschritte werden von einem 375 kDa-Enzymkomplex katalysiert (Bucovaz et al., 1997). Der Komplex enthält die Enzyme, die die Schritte von Pantothensäure bis zu Dephospho-CoA bzw. auf einem Alternativweg zu 4-Phosphopantethein katalysieren. Eine weitere 10-15 kDa-Komponente ist für die restlichen Syntheseschritte verantwortlich (Bucovaz et al., 1997). Es ist allerdings noch nicht sicher, ob die letzten Schritte der Synthese im Cytosol, der mitochondrialen Matrix oder in beiden Kompartimenten lokalisiert sind. Es ist deshalb denkbar, daß Leu5p entweder CoA oder ein Vorläufermolekül in die mitochondriale Matrix transportiert. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Der Grund dafür war, daß es nicht möglich war, einen

*in-vitro*-Importversuch mit radioaktiv markiertem CoA aufzustellen. In der Literatur ist ein solcher Versuch für den Import von radioaktiv markiertem CoA in Mitochondrien von Rattenherzzellen beschrieben (Tahiliani und Neely, 1987). Es wurde eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -CoA aus dem Medium in isolierte Mitochondrien beschrieben. An Hefemitochondrien konnte dieser Ansatz jedoch nicht reproduziert werden. Dies lag u.a. daran, daß isolierte Hefemitochondrien das angebotene  $^3\text{H}$ -CoA schnell modifizierten, so daß kein signifikanter Import in die Organelle nachweisbar war. Es könnte auch sein, daß Hefemitochondrien nicht CoA, sondern ein Vorläufermolekül des CoA aufnehmen. Ob Leu5p CoA oder ein Vorläufermolekül über die Membran transportiert, muß nun weiter untersucht werden. Dazu könnte z.B. ein rekonstituiertes System mit gereinigtem Carrierprotein dienen, durch die Modifikation von CoA ausgeschlossen werden kann. In diesem experimentellen System könnten Leu5p auch verschiedene Substrate angeboten werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gefunden, daß das humane Homologe, 'human Graves` disease protein' (hGP), die Funktion von Leu5p in der Hefezelle ersetzen kann. Das bedeutet, daß auch hGP als mitochondriales Carrierprotein fungiert und für die Akkumulation von CoA verantwortlich ist. Dabei bleibt die Frage jedoch noch offen, wie diese Funktion in Zusammenhang mit der Ursache der Krankheit 'Graves` disease' steht.

#### 4.2.1 Biochemischer Zusammenhang zwischen Leu5p und Atm1p

*LEU5* wurde in unserer Arbeitsgruppe aufgrund seiner genetischen Interaktion mit *ATM1* identifiziert, was Leu5p für unsere Untersuchungen interessant gemacht hatte. Trotz der Identifizierung der von Atm1p und Leu5p unterstützten Prozesse, läßt sich über den funktionellen Zusammenhang zwischen Leu5p und Atm1p keine konkrete Aussage treffen. Allerdings besteht eine biochemische Gemeinsamkeit dieser Proteine darin, daß sie beide in den Leucinbiosyntheseweg eingreifen. Leu5p liefert das CoA als Cofaktor für die mitochondriale  $\alpha$ -Isopropylmalat-Synthase (Leu4p), Atm1p den Fe/S-Cluster für die cytosolische Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p). Auffällig ist weiterhin, daß die Biosynthese von CoA von einem Zwischenprodukt der Leucinbiosynthese aus erfolgen kann, dem  $\alpha$ -Ketoisovalerat. Aus  $\alpha$ -Ketoisovalerat und Tetrahydrofolsäure wird über mehrere Schritte Dehydropantothenäure synthetisiert, woraus CoA gebildet wird.

Mit Leu5p konnte ein weiteres mitochondriales Carrierprotein der Hefe in seiner Funktion charakterisiert werden. Leu5p transportiert CoA oder ein Vorläufermolekül in die Mitochondrien. CoA und sein acetyliertes Derivat liegen in den Mitochondrien in hoher Konzentration von etwa 1 mM vor gegenüber 0,2 mM im Cytosol der Zelle. Dies zeigt auf, daß CoA ein wichtiger Cofaktor der Mitochondrien ist, der in zahlreichen Prozessen, wie dem Citratzyklus und der Aminosäurebiosynthese gebraucht wird.

## 5. Zusammenfassung

Eisen-Schwefel(Fe/S)-Proteine dienen als Elektronenüberträger bei verschiedenen biochemischen Prozessen und sind an diversen katalytischen und regulatorischen Reaktionen beteiligt. Die molekularen Mechanismen der Fe/S-Cluster-Biogenese in Eukaryonten und die daran teilnehmenden Proteine waren bis 1999 noch unbekannt. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, daß Mitochondrien eine entscheidende Funktion in der Fe/S-Cluster-Biosynthese ausüben. Ergebnisse dieser Arbeit und Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen ließen den Schluß zu, daß die Mitochondrien einen Fe/S-Cluster-Biosyntheseapparat besitzen, dessen Komponenten denen der Prokaryonten sehr ähnlich sind. Der Apparat stellt Fe/S-Cluster sowohl für mitochondriale als auch für cytosolische Proteine her. In dieser Arbeit konnte für die Proteine Atm1p, Isu1p, Isu2p, Bat1p, Bat2p und Mdl2p eine Funktion bei der Fe/S-Cluster Biosynthese nachgewiesen werden. Nach der augenblicklichen Vorstellung beginnt die Synthese mit der Bindung von Eisen an die Isu Proteine. Die Depletion dieser Proteine führt zu einem Defekt in der Reifung mitochondrialer und extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine. Dieser Defekt wird durch Expression des bakteriellen Homologen IscU komplementiert, für das die Bindung von Eisen von einer anderen Gruppe nachgewiesen wurde. Das mitochondriale Nfs1p synthetisiert als Cysteindesulfurase den elementaren Schwefel und kombiniert ihn mit dem Eisen an den Isu Proteinen zu einem Fe/S-Cluster. Das Fe/S-Protein Ferredoxin dient als Elektronendonator und könnte die Dissoziation des Fe/S-Clusters von den Isu Proteinen bewirken, so daß der Cluster in Apoproteine eingebaut werden kann.

Für die Reifung von Fe/S-Proteinen im Cytosol werden ABC-Transporter in der mitochondrialen Innenmembran benötigt. Sehr wahrscheinlich transportieren sie einen Fe/S-Cluster ins Cytosol, wo er in Apoproteine eingebaut wird. In dieser Arbeit konnte Atm1p als Haupttransporter identifiziert werden. Bei Depletion dieses Proteins sind cytosolische Fe/S-Proteine aufgrund des fehlenden Fe/S-Clusters inaktiv, während mitochondriale Fe/S-Proteine normal gebildet werden können. Als weiterer mitochondrialer ABC-Transporter mit einer Funktion bei der Fe/S-Protein Reifung im Cytosol konnte Mdl2p identifiziert werden. Die Überexpression dieses Proteins komplementiert den Wachstumsdefekt von Atm1p-depletierten Zellen. Ein zu Mdl2p homologes Protein (Mdl1p) wurde ebenfalls in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert. Es scheint jedoch keine Funktion in der Synthese von Fe/S-Proteinen zu haben. Für zwei weitere Proteine, die Transaminasen Bat1p in der mitochondrialen Matrix und Bat2p im Cytosol, konnte eine spezifische Beteiligung an der

Reifung von cytosolischen Fe/S-Proteinen nachgewiesen werden. Diese Funktion der Bat Proteine scheint unabhängig zu sein von ihrer schon früher identifizierten Rolle bei der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin. Die Bat Proteine könnten möglicherweise einen Chelator synthetisieren, der an Fe/S-Cluster im Mitochondrium binden kann, um die Cluster während des Transports ins Cytosol zu stabilisieren.

Zusammenfassend stellt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der mitochondrialen Proteine Isu1p, Isu2p, Mdl1p, Mdl2p, Atm1p und Bat1p und des cytosolischen Proteins Bat2p einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Fe/S-Cluster-Biogenese in *S. cerevisiae* dar.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion des Proteins Leu5p untersucht, das in genetischer Wechselwirkung mit Atm1p steht. Leu5p wurde als eines von 35 Carrierproteinen der Hefe identifiziert. Carrierproteine bewerkstelligen den Transport von Metaboliten in und aus den Mitochondrien, jedoch kennt man nur von wenigen das Substrat. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Funktion von Leu5p für die Anreicherung von Coenzym A (CoA) in den Mitochondrien nachzuweisen. Leu5p-depletierte Zellen zeigten einen Defekt in den mitochondrialen Enzymen Isopropylmalat-Synthase und Citratsynthase. Beide Proteine katalysieren eine CoA-abhängige Reaktion. Die Messung des mitochondrialen CoA-Gehalts in Leu5p-depletierten Zellen ergab eine stark verringerte CoA-Konzentration in den Mitochondrien, nicht jedoch im Cytosol. Leu5p ist nach diesen Untersuchungen als Carrier für den Import von CoA oder einer Vorstufe des CoA in die mitochondriale Matrix verantwortlich. Ein zu Leu5p ähnliches Protein des Menschen, das 'human Graves` disease protein' (hGP), konnte als Orthologes des Leu5p beschrieben werden. hGP kann in Hefe die Funktion von Leu5p ersetzen. Dies legt nahe, daß hGP in menschlichen Zellen den Transport von CoA oder einer Vorstufe von CoA in die Mitochondrien ausführt.

## 6. Literatur

Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, A., Schueck, N. D., Dean, M., and Koeller, D. M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Gen.* 8, 743-749.

Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140.

Askwith, C. (1996). Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiology* 20, 27-34.

Askwith, C., and Kaplan, J. (1998). Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem. Sci.* 23, 135-138.

Baichwal, V. R., Gatzek, P. R., and Kohlhaw, G. B. (1983). Leucine biosynthesis in yeast. Identification of two genes (*LEU4*, *LEU5*) that affect  $\alpha$ -isopropylmalate synthase activity and evidence that *LEU1* and *LEU2* gene expression is controlled by  $\alpha$ -isopropylmalate and the product of a regulatory gene. *Curr. Genet.* 7, 369-77.

Bauer, B. E., Wolfger, H., and Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 217-36.

Beinert, H., Holm, R. H., and Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653-659.

Beltzer, J. P., Morris, S. R., and Kohlhaw, G. B. (1988). Yeast *LEU4* encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase. *J. Biol. Chem.* 263, 368-374.

Benvenisty, N., Leder, A., Kuo, A., and Leder, P. (1992). An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. *Genes & Dev.* 6, 2513-2523.

Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Halle, D., and Benvenisty, N. (1998). Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene* 17, 165-171.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 4077-4092.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bucovaz, E. T., Macleod, R. M., Morrison, J. C., Whybrew, W. D. (1997). The coenzyme A-synthesizing protein complex and its proposed role in CoA biosynthesis in bakers' yeast. *Biochimie* 79, 787-98.

Cammack, R. (1992). Iron-sulfur clusters in enzymes: Themes and variations. In *Iron-sulfur proteins*, R. Cammack, ed. (San Diego: Academic Press), 281-322.

Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cosee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., DeMichele, G., Filla, A., deFrutos, R., Palau, F., Patel, P. I., DiDonato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M., and Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423-1427.

Cannon, F., Riedel, G., and Ausubel, F. (1977). Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2963-7.

Carvajal, J. J., Pook, M. A., M, d. S., Doudney, K., Hillermann, R., Minogue, S., Williamson, R., Hsuan, J. J., and Chamberlain, S. (1996). The Friedreich's ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Nat. Genet.* 14, 157-62.

Chang, L. F., Cunningham, T. S., Gatzek, P. R., Chen, W. J., and Kohlhaw, G. B. (1984). Cloning and characterization of yeast *LEU4*, one of two genes responsible for alpha-isopropylmalate synthesis. *Genetics* 108, 91-106.

Collier, R. H., and Kohlhaw, G. (1972). Nonidentity of the aspartate and the aromatic aminotransferase components of transaminase A in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 365-371.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16(22), 10881-90.

Csere, P., Lill, R., and Kispal, G. (1998). Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast *Atm1p*. *FEBS Lett.* 441, 266-270.

Daum, G., Gasser, S. M., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: Energy-dependent, two step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome  $b_2$  by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13075-13080.

Davoodi, J., Drown, P. M., Bledsoe, R. K., Wallin, R., Reinhart, G. D., and Hutson, S. M. (1998). Overexpression and characterization of the human mitochondrial and cytosolic branched-chain aminotransferases. *J. Biol. Chem.* 273, 4982-4989.

De Winde, J. H., and Grivell, L. A. (1993). Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 46, 51-91.

Dean, D. R., Bolin, J. T., and Zheng, L. (1993). Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J. Bacteriol.* 175, 6737-6744.

Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S., and Strathern, J. (1994). Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10, 377-383.



Decottignies, A., and Goffeau, A. (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nature Genet.* 15, 137-145.

Diekert, K., de Kroon, A. I. P. M., Kispal, G., and Lill, R. (2000). Isolation and sub-fractionation of mitochondria from the yeast *S. cerevisiae*. *Methods of Cell Biology* (eingereicht).

Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., and Lill, R. (1999). An internal mitochondrial targeting signal directing proteins into the intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (21), 11752-7.

Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M., Byersdorfer, C. A., and Eide, D. (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26092-99.

El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J., and Sluse, F. E. (1997). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 573-581.

Foury, F., and Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* 411, 373-377.

Garland, S., Hoff, K., Vickery, L. E., and Culotta, V. C. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* *ISU1* and *ISU2*: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol. Biol.* 294, 897-907.

Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., and Rees, D. C. (1992). Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* 257, 1653-9.

Gietz, D., St.Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.

Glick, B. S., Beasley, E. M., and Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 17, 453-459.

Grivell, L. A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., de Jong, L., Nijtmans, L. G., van Oosterum, K., Siep, M., and van der Spek, H. (1999). Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Letters* 452, 57-60.

Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991). *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Volume 194 (San Diego: Academic Press).

Hausinger, R. P., and Howard, J. B. (1983). Thiol reactivity of the nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 258, 13486-92.

Hentze, M. W., and Kuhn, L. C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8175-8182.

Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.

Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brüttsch, H., and Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein *MAS70*. *EMBO J.* 9, 3191-3200.

Hinnebusch, A. G. (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In "The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*": Vol. II: Gene expression., E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach, eds. (Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press), 319-414.

Ichihara, A., and Koyama, E. (1966). Transaminase of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acids-alpha-ketoglutarate transaminase. *J. Biochem.* 59, 160-169.

Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J., Newton, W. E., Dean, D. R. (1989). Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* *171*, 1017-27.

Johnson, M. K. (1998). Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *2*, 173-181.

Kakhniashvili, D., Mayor, J. A., Gremse, D. A., Xu, Y., and Kaplan, R. S. (1997). Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product. *J. Biol. Chem.* *272*, 4516-4521.

Kaplan, R. S., Mayor, J. A., Gremse, D. A., and Wood, D. O. (1995). High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *270*, 4108-4114.

Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000). Isa1p is a Component of the Mitochondrial Machinery for Maturation of Cellular Iron-Sulfur Proteins and Requires Conserved Cysteine Residues for Function. *J. Biol. Chem.* *275*(21), 15955-15961.

Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., and Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell. Biol.* *139*, 1663-1675.

Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N., and Neupert, W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature* *348*, 610-616.

Kim, J., and Rees, D. (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* *257*, 1677-82.

Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., and Lill, R. (1997). The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* *418*, 346-350.

Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are required for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* *18*, 3981-3989.

Kispal, G., Steiner, H., Court, D. A., Rolinski, B., and Lill, R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 24458-24464.

Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J., and Schatz, G. (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* *279*, 369-373.

Koehler, C., Murphy, M., Bally, N., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., and Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1187-93.

Kohlhaw, G. B. (1988a). Isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods Enzymol.* *166*, 423-429.

Kohlhaw, G. B. (1988b). Beta-isopropylmalate dehydrogenase from yeast. *Methods Enzymol.* *166*, 429-435.

Kohlhaw, G. B. (1988c). Alpha-isopropylmalate synthase from yeast. *Methods Enzymol.* *166*, 414-423.

Künkele, K. P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F. E., Henry, J. P., Neupert, W., Lill, R., and Thieffry, M. (1998). The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J. Biol. Chem.* *273*, 31032-31039.

Lacourciere, G. M., and Stadtman, T. C. (1998). The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.* *273*, 30921-6.

Lange, H., Kispal, G., and Lill, R. (1999). Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 274, 18989-18996.

Lange, H., Kispal, G., Kaut, A., and Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of intra- and extra-mitochondrial Fe/S proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(3), 1050-5.

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

Lee-Peng, F., Hermodson, M., and Kohlhaw, G. (1979). Transaminase B from *Escherichia coli*: quaternary structure, amino-terminal sequence, substrate specificity, and absence of a separate valine-alpha-ketoglutarate activity. *J. Bacteriol.* 139, 339-45.

Leighton, J., and Schatz, G. (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J.* 14, 188-195.

Leong-Morgenthaler, P., Oliver, S. G., Hottinger, H., and Soll, D. (1994). A *Lactobacillus nifS*-like gene suppresses an *Escherichia coli* transaminase B mutation. *Biochimie* 76, 45-49.

Li, L., and Kaplan, J. (1997). Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J. Biol. Chem.* 272, 28485-28493.

Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990). The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60, 271-280.

Lill, R., Kispal, G., Künkele, K. P., Mayer, A., Risse, B., Steiner, H., Heckmeyer, P., Van der Klei, I., and Court, D. A. (1996). Protein transport into and across the mitochondrial outer membrane: Recognition, insertion and translocation of preproteins. In "Proceedings of the NATO/ASI, Cell Biology": Molecular Dynamics of Biomembranes, J. A. F. Op den Kamp, ed. (Berlin: Springer-Verlag), 137-155.

Michal, G., and Bergmeyer, H. U. (1974). Metabolites: nucleic acids, purines, pyrimidines, nucleosides, coenzymes. In "Methods of enzymatic analysis". (New York: Academic Press), 1975-1981.

Moellering, H., and Gruber, W. (1966). Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.* *17*, 369-76.

Muller, V., Heidkamper, D., Nelson, D. R., and Klingenberg, M. (1997). Mutagenesis of some positive and negative residues occurring in repeat triad residues in the ADP/ATP carrier from yeast. *Biochemistry* *36*, 16008-16018.

Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* *22*, 5767-8.

Nargang, F. E., Künkele, K.-P., Mayer, A., Ritzel, R. G., Neupert, W., and Lill, R. (1995). "Sheltered disruption" of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J.* *14*, 1099-1108.

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

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* *66*, 861-915.

Niwa, Q., Kumazaki, T., Tsukiyama, T., Soma, G., Miyajima, N., and Yokoro, K. (1990). A cDNA clone overexpressed and amplified in a mouse teratocarcinoma line. *Nucleic Acids Res.* *18*, 6709.

Palmieri, L., Lasorsa, F. M., De Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (1997a). Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett.* *417*, 114-118.

Palmieri, L., De Marco, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (1997b). Identification of the yeast *ARG-11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett.* *410*, 447-451.

Palmieri, L., Vozza, A., Honlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V., and Palmieri, F. (1999a). The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol. Microbiol.* *31*, 569-77.

Palmieri, L., Vozza, A., Agrimi, G., De Marco, V., Runswick, M., Palmieri, F., and Walker, J. (1999b). Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J. Biol. Chem.* *274*, 22184-90.

Pelzer, W., and Lill, R. (unveröffentlicht).

Peters, J. W., Fisher, K., and Dean, D. R. (1995). Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* *49*, 335-366.

Pfanner, N., Craig, E. A., and Honlinger, A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *13*, 25-51.

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

Prohl, C., Kispal, G., and Lill, R. (1999). Branched-chain amino acid transaminases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* (im Druck).

Robinson, K. M., and Lemire, B. D. (1995). Flavinylation of succinate: ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* *260*, 34-51.

Robinson, K. M., von Kieckebusch-Guck, A., and Lemire, B. D. (1991). Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant disrupted for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. *J. Biol. Chem.* *266*, 21347-21350.

Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1993). *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual.* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1996). Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 174-177.

Ryan, E. D., Tracy, J. W., and Kohlhaw, G. B. (1973). Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bact.* *116*, 222-225.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-54.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition Edition (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press).

Satyanarayana, T., Umbarger, H. E., Lindegren, G. (1968). Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of leucine biosynthesis in prototrophic and leucine auxotrophic strains. *J. Bacteriol.* *96*, 2018-24.

Scharfe, C., Zaccaria, P., Hoertnagel, K., Jaksch, M., Klopstock, T., Lill, R., Prokisch, H., Gerbitz, K. D., Mewes, H. W., and Meitinger, T. (1999). MITOP: database for mitochondria-related proteins, genes and diseases. *Nucleic Acids Res.* *27*, 153-155.

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

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., and Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 10206-10211.



Schroers, A., Burkovski, A., Wohlrab, H., and Kramer, R. (1998). The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J. Biol. Chem.* 273, 14269-14276.

Schuldiner, O., Eden, A., Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Simchen, G., and Benvenisty, N. (1996). ECA39, a conserved gene regulated by c-Myc in mice, is involved in G1/S cell cycle regulation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7143-7148.

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

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

Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N., and Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* 62, 107-115.

Söllner, T., Rassow, J., and Pfanner, N. (1991). Analysis of mitochondrial protein import using translocation intermediates and specific antibodies. *Meth. Cell Biol.* 34, 345-358.

Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W., and Pfanner, N. (1992). Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature* 355, 84-87.

Srere, P. A., Brazil, M., and Gonen, L. (1963). *Acta Chem. Scand.* 17, 129-134.

Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995). Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 270, 22842-22849.

Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E., and Culotta, V. C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* 273, 31138-31144.

Ta, D. T., Vickery, L. E. (1992). Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 11120-5.

Tangeras, A., Flatmark, T., Bäckström, D., and Ehrenberg, A. (1980). Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers. Estimation, compartmentation and redox state. *Biochim. Biophys. Acta* 589, 162-175.

Tahiliani, A. G., and Neely, J. R. (1987). A transport system for coenzyme A in isolated rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262, 11607-11610.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 267-271.

Tzagoloff, A., and Dieckmann, C. L. (1990). *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 54, 211-225.

Tzagoloff, A., Jang, J., Glerum, D. M., and Wu, M. (1996). *FLX1* codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 7392-7397.

Vickery, L. E., Silberg, J. J., Ta, D. T. (1997). Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 6, 1047-56.

Voos, W., Martin, H., Krimmer, T., and Pfanner, N. (1999). Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1422, 235-54.

Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R., and Phillipsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.

Wilson, R. B., and Roof, D. M. (1997). Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat. Genet.* 16, 352-357.

Woonter, M., and Jaehning, J. A. (1990). Accurate initiation by RNA polymerase II in whole cell extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 8979-8982.

Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1996). Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* 15, 3377-3384.

Yuvaniyama, P., Agar, J., Cash, V., Johnson, M., and Dean, D. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 599-604.

Zarrilli, R., Oates, E. L., McBride, O. W., Lerman, M. I., Chan, J. Y., Santisteban, P., Ursini, M. V., Notkins, A. L., and Kohn, L. D. (1989). Sequence and chromosomal assignment of a novel cDNA identified by immunoscreening of a thyroid expression library: similarity to a family of mitochondrial solute carrier proteins. *Mol. Endocrinol.* 3, 1498-1505.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., and Dean, D. R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* 33, 4714-4720.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., and Dean, D. R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13264-13272.

**Danksagungen**

Besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Lill für seine ständige Diskussionsbereitschaft, wertvollen Ratschläge und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Herzlich danken möchte ich Karina Sordel und Brigitte Niggemeyer für ihre große Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch danke ich allen für den Spaß und die gute Atmosphäre im Labor.