

**Mitochondrialer Proteintransport in
Leishmania tarentolae
und
Charakterisierung der Hefeglutaredoxine 6-8**

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

von
Elisabeth Eckers
aus
München

München 2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München den 20.12.2012

.....

(Unterschrift)

Dissertation eingereicht am 20.12.2012

Mündliche Prüfung am 07.05.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mitochondrien	1
1.2	Mitochondrialer Proteinimport in Opisthokonten	2
1.2.1	Klassische Translokasen der mitochondrialen Außenmembran	2
1.2.2	Klassische Translokasen der mitochondrialen Innenmembran	3
1.2.3	Das Mia-Erv-Disulfidtransfersystem	3
1.3	Die Sulfhydryl-Elektronentransferase Erv1	4
1.4	Die evolutionäre Konservierung des mitochondrialen Proteinimports	6
1.4.1	Phylogenie der Eukaryoten	6
1.4.2	Kinetoplastiden	7
1.4.3	MPI in Nicht-Opisthokonten	9
1.5	Glutaredoxine	10
1.6	Glutaredoxine aus Hefe	12
1.7	Zielsetzung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Materialien und Geräte	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Geräte	15
2.1.4	Primer	16
2.1.5	Plasmide und Konstrukte	17
2.2	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	18
2.2.2	Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR	19
2.2.3	Reinigung von DNS mittels Mikrozentrifugationsröhrchen	19
2.2.4	Restriktionsverdau von DNS	19
2.2.5	Agarosegelelektrophorese	20
2.2.6	Ligation von DNS-Fragmenten	20
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von DNS	20
2.2.7.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	20
2.2.7.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese	20
2.2.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	20
2.2.8.1	Chemisch kompetente Zellen	20
2.2.8.2	Elektrokompetente Zellen	21
2.2.9	Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	21
2.2.9.1	Transformation chemisch kompetenter Zellen	21
2.2.9.2	Transformation elektrokompetenter Zellen	21
2.3	Methoden der Hefekultur und Genetik	22
2.3.1	Verwendete Hefestämmen	22
2.3.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3.4	Wachstumsphänotypanalyse von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.3.5	Komplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i>	23
2.4	Methoden der <i>Leishmania tarentolae</i> Kultur und Genetik	23
2.4.1	Verwendete <i>L. tarentolae</i> Stämme	23
2.4.2	Kultivierung von <i>L. tarentolae</i>	23
2.4.3	Anlegen von <i>L. tarentolae</i> Kryokulturen	23
2.4.4	Auftauen von <i>L. tarentolae</i> Kryokulturen	24

2.4.5	Konzentrationsbestimmung von <i>L. tarentolae</i> Kulturen	24
2.4.6	Transfektion von <i>L. tarentolae</i>	24
2.5	Zellbiologische Methoden	24
2.5.1	Isolierung von Mitochondrien aus <i>L. tarentolae</i>	24
2.5.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.5.3	Subfraktionierung von Mitochondrien	26
2.5.3.1	Alkalische Proteinextraktion	26
2.5.3.2	Mitoplasten und Proteasesuszeptibilitätsassay	26
2.5.4	Quervernetzung mitochondrialer Proteine	27
2.5.5	<i>In organello</i> -Import radioaktiv markierter Vorläuferproteine	27
2.5.6	Elektronenmikroskopie von <i>L. tarentolae</i>	27
2.5.7	Immunfluoreszenzanalyse von <i>L. tarentolae</i>	28
2.6	Proteinbiochemische Methoden	29
2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	29
2.6.2	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	29
2.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.6.4	Coomassie-Blau-Färbung	30
2.6.5	Silberfärbung	30
2.6.6	Western Blot	31
2.6.7	Autoradiographische Detektion von Proteinen	31
2.6.8	Immundetektion von Proteinen	31
2.6.9	Expression und Reinigung rekombinater Proteine mit Ni-NTA	31
2.6.10	Analytische Gelfiltration	32
2.6.11	Surface Plasmon Resonance Spektroskopie	32
2.6.12	Metallionenanalyse	33
2.6.13	Proteinkristallisation	33
2.6.14	<i>In vitro</i> -Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine	33
2.6.15	Pulldown-Assays	33
2.6.16	Immunoaffinitäts-Chromatographie	34
2.6.17	Glutaredoxin-Assay	35
2.6.18	Thioredoxinreduktase-Assay	35
2.6.19	Insulin-Assay	36
2.6.20	Cytochrom <i>c</i> -Assay	36
2.6.21	Reinigung von Antikörpern	36
2.6.22	DTNB-Assay	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	<i>In silico</i> -Vergleich mitochondrialer Proteinimportkomplexe von Nicht-Opisthokonten	38
3.2	Etablierung von Leishmanien als MPI-Modellsystem	40
3.2.1	Komponenten des MPI in Leishmanien	41
3.2.2	Leishmanienmitochondrien zeigen eine distinkte Autofluoreszenz	43
3.3	Funktionelle Konservierung der klassischen Importwege	45
3.3.1	Import von Opisthokontenproteinen in isolierte Leishmanienmitochondrien	45
3.3.2	Import von Discicristatenproteinen in isolierte Hefemitochondrien	47
3.4	Charakterisierung von LtErv	48
3.4.1	Strukturvergleich	48
3.4.2	Charakterisierung der einzelnen Cysteine in LtErv	51
3.4.3	LtErv Elektronenübertragung von DTT auf Cytochrom <i>c</i>	53
3.4.4	LtErv lokalisiert in Hefemitochondrien im IMS	54
3.4.5	Nichtfunktionelle Komplementation von ScErv1 durch LtErv	54
3.4.6	Interaktionspartner von LtErv	55
3.5	Vorbereitende Arbeiten zur Identifizierung des Leishmanien TOM-Komplexes	56

3.6	Neue Glutaredoxine aus Hefe	57
3.6.1	<i>In silico</i>-Identifizierung und Strukturvergleich dreier neuer Glutaredoxine	57
3.6.1.1	Die Quartärstruktur von ScGrx6-8.....	59
3.6.1.2	Kristallisation von ScGrx7 und ScGrx8	63
3.7	Katalytische Eigenschaften der neuen Glutaredoxine	63
3.7.1	Monothiol-Glutaredoxine	63
3.7.1.1	ScGrx6 und ScGrx7 sind im HEDS-Assay aktiv.....	64
3.7.1.2	Ping-Pong-Katalysemechanismus von ScGrx7	65
3.7.1.3	Reduktion von ScGrx7-SSG durch das GR/GSH-System	66
3.7.2	Dithiol-Glutaredoxine	67
3.7.2.1	Aktivität von ScGrx8 im HEDS-Assay	67
3.7.2.2	Reduktion von ScGrx8 Disulfid durch GSH.....	69
3.7.2.3	Reduktion von ScGrx8-SSG durch GSH.....	70
3.7.3	Reduktion von ScGrx8(S₂) und glutathionyliertem ScGrx7 durch Hefe-TrxR.....	72
3.7.4	ScGrx8 Aktivität im Insulin-Assay	72
4	DISKUSSION.....	73
4.1	Die Zusammensetzung der Nicht-Opisthokonten-MPI-Maschinerie unterscheidet sich deutlich von den traditionellen Modellen.....	73
4.2	Funktionelle Konservierung des MPI in Kinetoplastiden trotz fehlender Komponenten	73
4.2.1	Die MPI-Komplexe der OM.....	74
4.2.1.1	Kinetoplastiden verfügen über eine zu TOM alternative Translokase	74
4.2.1.2	Die Kernkomponenten des TOB-Komplexes sind evolutionär konserviert	74
4.2.1.3	Die Rezeptorproteine der OM MPI-Komplexe sind nicht konserviert.....	74
4.2.1.4	Evolutionäre Entstehung der TOM-Komplexe.....	75
4.2.2	Die MPI-Komplexe der IM.....	75
4.2.2.1	Der OXA-Komplex ist in Kinetoplastiden partiell konserviert	75
4.2.2.2	Der TIM23-Komplex ist in Kinetoplastiden deutlich verändert	75
4.2.2.3	Der klassische TIM22-Komplex ist in Kinetoplastiden nicht nachweisbar	77
4.2.2.4	Evolutionäre Entstehung der TIM-Komplexe.....	77
4.2.3	Das MPI-System des IMS.....	78
4.2.3.1	Das MPI-System des IMS unterscheidet sich deutlich von Opisthokonten	78
4.2.3.2	Evolutionäre Entstehung des IMS Imports.....	78
4.2.4	LtErv.....	79
4.2.4.1	Elektronentransfer in LtErv	79
4.3	Die Autofluoreszenz in Leishmanienmitochondrien ist durch Flavoproteine verursacht	82
4.4	Struktur der Hefe Glutaredoxine 6-8.....	83
4.4.1	ScGrx6 bildet FeS-Cluster assoziierte Tetramere	83
4.4.2	ScGrx6 und ScGrx7 bilden nichtkovalent verknüpfte Dimere	84
4.4.3	ScGrx6 dimerisiert über eine intermolekulare Disulfidbrücke	84
4.5	Katalyse der drei neuen Glutaredoxine.....	85
4.5.1	ScGrx6 und ScGrx7	86
4.5.2	ScGrx8	87
4.6	Limitationen des traditionellen Glutaredoxin-Katalysemodells	88
4.6.1	Reaktionsgeschwindigkeitsbegrenzung der oxidativen Halbreaktion	88
4.6.2	Reaktionsgeschwindigkeitsbegrenzung der reduktiven Halbreaktion.....	89
4.6.3	Konformationsänderung als Kontrollfaktor der Katalyse in Grx und Trx	89
4.6.4	Verfeinertes Modell des Glutaredoxin Katalysemechanismus.....	90
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATUR.....	95

Verzeichnisse:

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transportwege des mitochondrialen Proteinimports.....	1
Abbildung 2: Vermutliches Reaktionsschema des Mia-Erv-Systems.....	5
Abbildung 3: Dendrogramm der eukaryotischen Phylogenie.....	7
Abbildung 4: Traditioneller Grx-Katalysemechanismus.....	11
Abbildung 5: Alignment der kleinen-Tim-Proteine aus Hefe und parasitischen Kinetoplastiden.....	39
Abbildung 6: Potentielle Transportwege des MPI in Kinetoplastiden.....	41
Abbildung 7: Kontrolle der Antikörper α LtTob55, α LtErv, α LtsTim1 und α LtTim17.....	42
Abbildung 8: Zelluläre Lokalisation der <i>L. tarentolae</i> -MPI-Proteine.....	43
Abbildung 9: Mitochondriale Autofluoreszenz in <i>L. tarentolae</i>	44
Abbildung 10: Import von Opisthokonten-Präproteinen in Hefe- und Leishmanienmitochondrien.....	46
Abbildung 11: Import von Leishmanien-Präproteinen in Hefemitochondrien.....	47
Abbildung 12: Struktur- und Funktionsmodell von LtErv.....	49
Abbildung 13: Vergleich der Domänenstruktur von LtErv und ScErv1.....	49
Abbildung 14: Vergleich der LtErv- und FAD-Absorptionsspektren.....	50
Abbildung 15: LtErv bildet kovalent verknüpfte Dimere.....	50
Abbildung 16: Dimerisierung von LtErv Mutanten.....	51
Abbildung 17: Absorptionsspektren von LtErv-Cystein-Mutanten.....	52
Abbildung 18: DTT-Cytochrom <i>c</i> -Elektronentransferase-Assay.....	53
Abbildung 19: Analyse von YPH501 Δ Erv1-pYX232LtErv- und -pYX232ScErv1-Mitochondrien.....	54
Abbildung 20: Komplementation von ScErv1 durch LtErv.....	55
Abbildung 21: Schematische Darstellung der TOM-Komplex-Pulldown-Konstrukte.....	56
Abbildung 22: Expressionskontrolle der TOM-Komplex-Pulldown-Konstrukte.....	57
Abbildung 23: Glutaredoxinmodelle und Alignments.....	58
Abbildung 24: Reinigung von ScGrx6-8.....	60
Abbildung 25: ScGrx6 UV-Vis-Spektrum.....	60
Abbildung 26: ScGrx6-8-Gelfiltrationsanalyse.....	61
Abbildung 27: Stabilisierung des ScGrx6-Holoproteins.....	62
Abbildung 28: ScGrx7 ist im HEDS-Assay aktiv.....	64
Abbildung 29: Abhängigkeit der ScGrx7-Aktivität im HEDS-Assay von HEDS und GSH.....	65
Abbildung 30: Zweisubstratkinetiken von ScGrx7 mit GSH und GSSCys.....	66
Abbildung 31: Aktivität von ScGrx8 im HEDS-Assay.....	67
Abbildung 32: Frisch gereinigtes ScGrx8 liegt weitgehend reduziert vor.....	68
Abbildung 33: Reduktion von ScGrx8(S ₂) durch GSH.....	69
Abbildung 34: Reduktion von glutathionyliertem ScGrx7 und ScGrx8 ^{C28S} durch das GR/GSH-System.....	71
Abbildung 35: Evolutionsmodelle der MPI-Maschinerie.....	76
Abbildung 36: Reaktionsschema von LtErv.....	80
Abbildung 37: Mesomere Grenzstruktur von LtErv C300S.....	81
Abbildung 38: ScGrx6 Quartärstrukturmodelle.....	85
Abbildung 39: Verfeinerte Modelle des Grx-Katalysemechanismus.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	15
Tabelle 2	15
Tabelle 3	16
Tabelle 4	17
Tabelle 5	18
Tabelle 6	22
Tabelle 7	29
Tabelle 8	38
Tabelle 9	40
Tabelle 10	41
Tabelle 11	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
Δ	Delta	GR	Glutathionreduktase
$\Delta\Psi$	Membranpotential	Grx	Glutaredoxin
π	Pi	GSH	Glutathion, reduziert
Å	Åström	GSSG	Glutathiondisulfid
x g	Erdbeschleunigung	GSS-Cys	L-Cystein-Glutathion-Disulfid
°C	Grad Celsius	h	Stunde
2-ME	β -Mercaptoethanol	HAc	Essigsäure
5-FOA	5-Fluororotsäure	HCl	Salzsäure
μ g	Mikrogramm	HEDS	Di-(2-hydroxyethyl)-disulfid
μ l	Mikroliter	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
μ m	Mikrometer	His ₆	6x Histidin-Tag
μ M	Mikromolar	HRP	Meerrettichperoxidase
Abs	Absorption	<i>hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
AAC	ADP-ATP-Transporter	IAC	Iodacetamid
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	IgG	Immunglobulin G
AB	Antibiotikum	IM	Innenmembran
Abb.	Abbildung	IMP	Innenmembranpeptidase
Amp	Ampicillin	IMS	Intermembranraum
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ICP-AES	Induktiv gekoppelte Plasma-Atomemissionsspektrometrie
AS	Aminosäure	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ATP	Adenosintriphosphat	ITS	IMS-Targeting Signal
ATOM	Archaische Translokase der mitochondrialen Außenmembran	Kan	Kanamycin
ALR	Anreger der Leberregeneration	kb	Kilobasenpaar
bp	Basenpaare	k_{cat}	katalytische Konstante, Wechselzahl
BHI	Hirn-Herz-Brühe	K_d	Dissoziationskonstante
BMH	Bismaleimidohexan	kDa	Kilodalton
BSA	Bovines Serumalbumin	K_m	Michaelis-Menten-Konstante
bzw.	beziehungsweise	L	Liter
C-	Carboxy	LB	Luria Bertani
ca.	zirka	<i>Lm</i>	<i>Leishmania major</i>
CBP	Calmodulinbindendes Protein	<i>Lt</i>	<i>Leishmania tarentolae</i>
CCCP	Carbonyl Cyanid 3-Chlorphenylhydrazon	Lusy	Lumacinsyntase
CK	Creatinkinase	M	Molar
cm	Zentimeter	MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid Ester
CnBr	Cyanbromid	mDHFR	murine Dihydrofolatreduktase
CP	Phosphocreatin	MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
CTC	Charge-Transfer-Komplex	mg	Milligramm
Cytc	Cytochrom c	Mia	Mitochondrialer Intermembranraumimport und Assemblierung
d	Delta	min	Minute
DDM	n-Dodecyl- β -Maltosid	MISS	Mitochondrien IMS-Sortierungssignal
DFDNB	1,5-Difluor-2,4-Dinitrobenzen	ml	Milliliter
DLD	D-Lactat-Dehydrogenase	mM	Millimolar
DMSO	Dimethylsulfoxid	MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure	MPI	Mitochondrialer Proteinimport
DSG	Disuccinimidylglutarat	MPP	Mitochondriale Prozessierungs-Peptidase
DSS	Disuccinimidylsuberat	N-	Amino-
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
DTT	Dithiothreitol	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Nc	<i>Neurospora crassa</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum	nm	Nanometer
Erv	Essentiell für Respiration und Viabilität	OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
<i>et al.</i>	Und andere	OM	Außenmembran
FAD	Flavinadenindinukleotid	OXA	Oxidase Assemblierung
FCS	Fötale Kälberserum	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster	PCR	Polymerasekettenreaktion
g	Gramm	PDB	Protein Datenbank
ggf.	Gegebenenfalls		
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker		

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Tc</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
PFA	Para-Formaldehyd	TCA	Trichloressigsäure
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ Ionenkonzentration	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
PK	Proteinase K	TIM	Translokase der mitochondrialen Innenmembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TMD	Transmembrandomäne
RNS	Ribonukleinsäure	TOB	Topogenese von Außenmembran β -Barrel-Proteinen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	TOM	Translokase der mitochondrialen Außenmembran
rpm	Umdrehungen pro Minute	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
RT	Raumtemperatur	TrxR	Thioredoxinreduktase
RU	Relative Unit	Trx	Thioredoxin
S _D -Medium	Selektiv-Medium (Glucose)	U	Units
SDS	Natriumdodecylsulfat	üN	über Nacht
sec	Sekunde	UV	Ultraviolett
SOC	Superoptimales Medium mit Glucose	V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz	v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
Su9	Untereinheit 9	w/v	Gewichtszusatz (Gewicht/Volumen)
SV	Säulenvolumen	WT	Wildtyp
t	Zeit	YPD	Hefe, Pepton, Dextrose
Tab.	Tabelle	z. B.	zum Beispiel
TAE	Tris-acetat-EDTA	Z	Zellen
TAP	Tandem Affinitätsreinigung		
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>		
TBS	Tris buffer saline		

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen eukaryotischer Zellen, welche von zwei Membranen, der Außen- (OM) und der Innenmembran (IM), umschlossen sind. Die OM grenzt den wenige Nanometer breiten Intermembranraum (IMS) nach außen vom Zytosol ab, wohingegen die IM den IMS und die zentrale mitochondriale Matrix separiert. Die IM kann weiterhin in zwei Bereiche eingeteilt werden, 1. die innere Grenzmembran (IBM), welche parallel zur OM verläuft und 2. weit in die Matrix hineinragende Einstülpungen der IM, die sogenannten Cristae. Mitochondrien entstanden durch die Endosymbiose von anaeroben Vorläuferzellen mit aeroben α -Proteobakterien [1], welche der anaeroben Vorläuferzelle durch oxidative Phosphorylierung Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitstellen. Neben der ATP-Produktion werden in Mitochondrien u. a. essentielle Eisen-Schwefel-Cluster (FeS-Cluster) synthetisiert [2], Fettsäuren oxidiert und die Calciumhomöostase reguliert. Aufgrund ihres endosymbiotischen Ursprungs verfügen Mitochondrien über ein eigenes Genom, welches jedoch nur für ca. 1 % der mitochondrialen Proteine kodiert [3]. Der Großteil der Proteobakteriengene wurde im Lauf der Evolution in die nukleäre Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Wirtszellen integriert. Somit werden in etwa 99 % der mitochondrialen Proteine im Zytosol synthetisiert und müssen anschließend in das entsprechende mitochondriale Kompartiment transportiert werden.

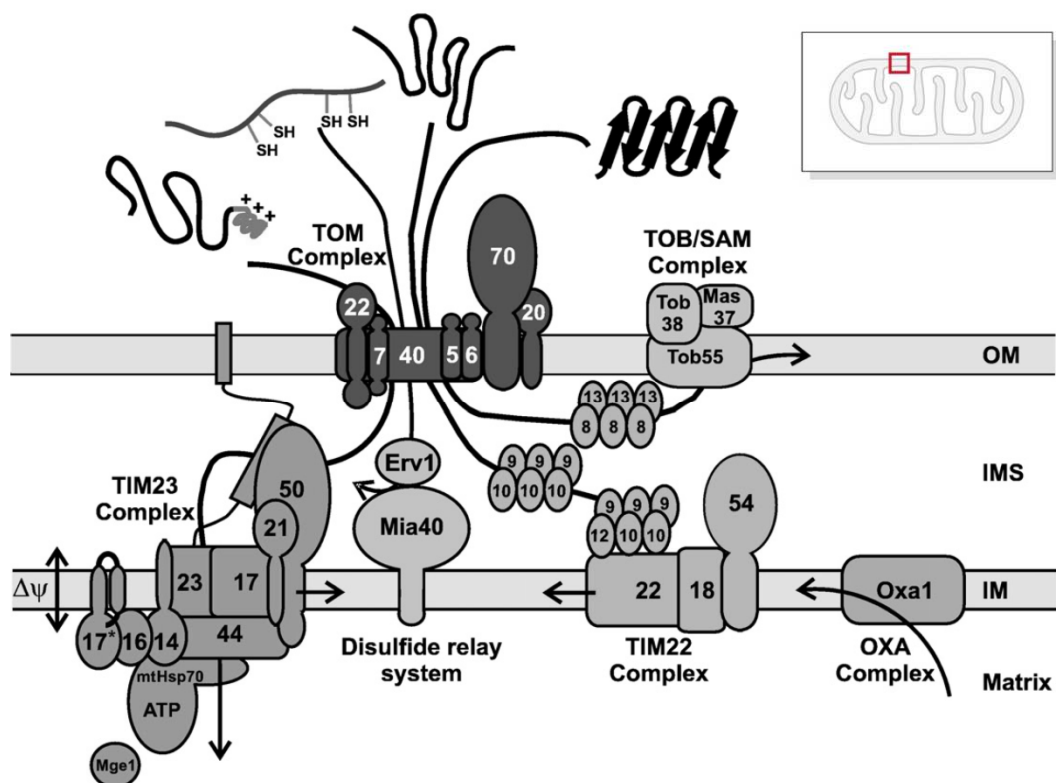


Abbildung 1: Transportwege des mitochondrialen Proteinimports.

Das Schema zeigt die unterschiedlichen Komplexe des MPI und die Importwege spezifischer Substratproteine in Opisthokonten. Variiert nach Mocranjac [4]

1.2 Mitochondrialer Proteinimport in Opisthokonten

Der mitochondriale Proteinimport (MPI) wurde in den letzten Jahren zum größten Teil an Opisthokonten - wie Pilzen und Menschen - sowie Pflanzen untersucht. Anhand von spezifischen Signalsequenzen werden die kernkodierte Proteine in die entsprechenden Kompartimente der Mitochondrien importiert. Dabei wird zwischen N-terminalen und internen Signalsequenzen unterschieden. N-terminale Signalsequenzen bestehen aus einigen positiv geladenen Aminosäuren und bilden eine amphipathische Helix aus, die den Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix ermöglicht [5, 6]. Nach Erreichen des Kompartiments wird die Signalsequenz gewöhnlich durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP) abgespalten [7], wohingegen die weniger gut erforschten internen Signalsequenzen in der Regel nicht prozessiert werden. Der Import der Präproteine in die Mitochondrien ist aufgrund der Kompartimentierung sehr komplex und benötigt spezifische Maschinerien. Bisher wurden sechs verschiedene Proteinimportkomplexe identifiziert: Der TOM- (Translokase der Außenmembran) sowie der TOB- (Topogenese von Außenmembran β -Barrel-Proteinen) Komplex in der OM, die Komplexe TIM23 (Translokase der mitochondrialen Innenmembran), TIM22 und OXA1 (Oxidase Assemblierung) in der IM sowie das Mia- (Mitochondrialer Intermembranraumimport und Assemblierung) Erv- (Essenziell für Respiration und Viabilität) Disulfidbrückentransfersystem im IMS.

1.2.1 Klassische Translokasen der mitochondrialen Außenmembran

Die OM der Mitochondrien enthält sogenannte Porine, die für niedermolekulare Moleküle durchlässig sind. Proteine können Porine jedoch nicht passieren, sondern werden über den TOM-Komplex durch die OM transportiert. Dieser besteht zum einen aus den primären Rezeptormolekülen Tom20, welches vor allem mit der Hydrophoben Seite der N-terminalen Signalsequenzen interagiert, Tom70, welches interne Signalsequenzen erkennt [8], und Tom22 [9]. Die durch Tom20 und Tom70 erkannten Proteine werden über Tom22 und die kleinen-Tom-Proteine Tom5-7 zum zentralen β -Barrel-Protein Tom40 weitergeleitet. Dieses bildet 2-3 Poren von etwa 22 Å aus, durch welche die Präproteine die OM passieren [10, 11]. Der TOM-Komplex ist ebenfalls an der Insertion von integralen Proteinen der OM beteiligt, der einzigen Membran in eukaryotischen Zellen, welche abgesehen von Chloroplasten β -Barrel-Proteine enthält. Diese Proteine werden von den TOM-Komplex-Rezeptorproteinen, besonders Tom20, erkannt und über den TOM-Komplex in den IMS transportiert [12-15]. Dort interagieren sie mit den kleinen Tim Proteinkomplexen [9, 16, 17], bis sie über den TOB-Komplex in die Außenmembran inseriert werden. Der TOB-Komplex besteht aus der Hauptkomponente Tob55 sowie Tob38 und Mas37. Letzteres ist an der Freisetzung der Substratproteine aus dem Komplex beteiligt [18-22]. Der TOB-Komplex assoziiert dynamisch mit verschiedenen weiteren Proteinen wie Mdm10 und Mim1. Diese sind an der Insertion von C-terminal bzw. N-terminal in der Membran verankerten helikalen Proteinen sowie dem Aufbau des TOM-Komplexes beteiligt [23-27]. Des Weiteren ist der TOB-Komplex an der Insertion kleiner, helikaler TOM Komponenten in die OM beteiligt [28, 29].

Daneben wurde ein weiterer Importmechanismus für Proteine mit multiplen Transmembrandomänen (TMD) postuliert, der unabhängig von der zentralen TOM Pore sowie dem TOB Komplex ist. Lediglich eine Beteiligung von Tom70 und Mim1 wurde nachgewiesen [30].

1.2.2 Klassische Translokasen der mitochondrialen Innenmembran

Der TIM23-Komplex ermöglicht den Transport von Präproteinen mit N-terminaler Signalsequenz in die Matrix, oder deren Insertion in die IM. In letzterem Fall folgt der N-terminalen amphipathischen Signalsequenz eine hydrophobe Domäne. Dadurch kommt es zum Stopp der Translokation und zur Insertion der Domäne in die Membran [31, 32]. Anschließend wird die Signalsequenz durch MPP prozessiert und das IMS Protein bleibt in der IM verankert. In einigen Fällen wird die TMD proteolytisch durch die Innenmembranpeptidase (IMP) abgetrennt und das Protein in den IMS freigesetzt [31, 33, 34]. Der TIM23-Komplex besteht aus den homologen Proteinen Tim17 und Tim23 und dem Rezeptorprotein Tim50 sowie den regulatorischen Untereinheiten Pam17 und Tim21 [35]. Die Translokation der positiv geladenen Signalsequenz erfordert das Membranpotential über die IM als Antrieb [36]. Durch einen Importmorkomplex in der Matrix, dessen Hauptkomponente mitochondriales Hsp70 ist, wird das Protein in einem durch ATP-Hydrolyse angetriebenen Prozess vollständig in die Matrix importiert [37, 38]. Polytope Proteine der IM mit mehreren TMD und internen Signalsequenzen werden über den TIM22-Komplex importiert [39-42]. Die Proteine assoziieren nach dem Transfer durch die OM mit hexameren Komplexen aus den Proteinen Tim8/13 bzw. Tim9/10. Diese Assoziation verhindert eine Aggregation der hydrophoben Proteine im IMS bis zum Import in die IM [43, 44]. Die Insertion erfolgt membranpotentialabhängig über Tim22 [45, 46]. Eine weitere Gruppe von Proteinen, welche sowohl kern- als auch mitochondrial kodierte Proteine umfasst, wird von der Matrix über den OXA-Komplex in die IM inseriert. Zu dieser Gruppe gehören vor allem Proteine der Atmungskettenkomplexe [47-50].

1.2.3 Das Mia-Erv-Disulfidtransfersystem

Alle Proteine des IMS sind kernkodiert und werden über verschiedene Wege in das Kompartiment transportiert. Der Import von Proteinen mit zweiteiligen N-terminalen Signalsequenzen wurde bereits in Kapitel 1.2.2 besprochen. Eine weitere Gruppe von Proteinen umfasst kleine Proteine, welche in ungefaltetem Zustand den TOM-Komplex, unabhängig von dessen Rezeptoren, in beide Richtungen passieren können [51, 52]. Dabei wird die ungefaltete Form in einigen Fällen durch die Bindung von Zinkionen stabilisiert [53]. Der Import dieser Proteine ist energetisch nicht von ATP und dem Membranpotential abhängig, sondern beruht auf der Faltung dieser Proteine im IMS durch Ausbildung von Disulfidbrücken oder der Bindung von Cofaktoren (Folding-trap-Mechanismus) [51]. So wird z. B. durch die Cytochrom *c*-Hämlyase eine Hämgruppe auf Cytochrom *c* [54-57], oder durch Ccs1 eine Disulfidbrücke sowie Kupferionen auf Sod1 übertragen [58, 59]. Eine spezielle Gruppe von Proteinen mit konservierten Zwillings-Cx₃C- oder Zwillings-Cx₉C-Motiven faltet sich aufgrund der Übertragung von Disulfidbrücken durch das Mia-Erv-Disulfidtransfersystem im IMS. Dabei interagiert Mia40 über ein CPC-Motiv am N-Terminus mit den Substratcysteinen und oxidiert diese. Durch diesen Prozess wird Mia40 selbst in eine reduzierte, inaktive Form umgewandelt und in einer Folgereaktion durch Erv1 reoxidiert. Dabei werden Elektronen vom Substrat über Mia40 auf Erv1 übertragen. Erv1 überträgt die Elektronen anschließend über seinen Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) auf Cytochrom *c* [60-65]. Die Substrate dieses Systems umfassen sowohl die kleinen-Tim-Proteine (Cx₃C-Motiv) und Cox17 (Cx₉C-Motiv), als auch Mia40, das ebenfalls

ein Zwillings-Cx₉C-Motiv aufweist, und ScErv1 selbst. Dabei sind ScErv1 und Ccs1 ungewöhnliche Substrate, da beide nur eine strukturelle Disulfidbrücke ausbilden. Die Signalsequenz dieser Substrate ist nicht homogen. So wurde für Tim9 ein MISS benanntes LxxxCF-Motiv um das erste Cystein definiert. Substrate mit einem Zwillings CX₉C-Motiv hingegen weisen das ITS-Motiv benannte aromatische AS-xx-hydrophobe AS-hydrophobe AS-xxC-Motiv auf. Beide Motive sind für den Import in den IMS sowie die Erkennung durch Mia40 notwendig und Mutationen in diesen Motiven führen zu einem Defekt der Erkennung der Proteine durch Mia40 und deren Import in den IMS [66-68].

1.3 Die Sulfhydryl-Elektronentransferase Erv1

Die Erv-Familie ist in Bezug auf ihre Funktion und Lokalisation sehr divers. Vertreter dieser Familie sind im endoplasmatischen Retikulum (ER) (ScErv2), Mitochondrien (ScErv1) sowie extrazellulär zu finden und sogar an der Viruszusammensetzung im Zytosol (ASFVpB119L) beteiligt. Der Name der Familie geht auf Erv1 aus Hefe zurück, welches entscheidend für die Verteilung der Mitochondrien in der Zelle, die Assemblierung der Atmungskette sowie das Fortschreiten des Zellzyklus ist [69-71]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Erv1 für die Biogenese zytosolischer, nicht aber mitochondrialer FeS-Cluster essentiell ist [72]. Bisher wurden die Strukturen von ScErv2, RnALR, AtErv1 sowie ASFV pB119L mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst [73-76]. All diese Proteine haben eine für FAD-bindende Proteine bisher unbekannt Fünf-Helix-Faltung [77]. Vier dieser Helices bilden ein Bündel, in welchem das FAD gebunden ist, während die fünfte Helix senkrecht zu den anderen steht [78]. Die Proteine dimerisieren nichtkovalent über hydrophobe Bindungen der Helices 1 und 2. Des Weiteren werden in einigen Fällen transiente kovalente Bindungen der verschiedenen Untereinheiten über Disulfidbrücken ausgebildet [79, 80]. ScErv1 besitzt drei Disulfidbrücken, wovon zwei, das universelle CxxC-Motiv sowie ein weit verbreitetes Cx₁₆C-Motiv, in der Erv Domäne liegen. Das proximale, nahe dem gebundenen FAD gelegene CxxC-Motiv ist redoxaktiv und ebenfalls in zahlreichen Thioredoxin-Faltungsdomänen von Oxidoreduktasen vorhanden, während das Cx₁₆C-Motiv strukturstabilisierende Eigenschaften hat und in der Erv-Familie weit verbreitet ist [73, 74]. Die dritte Disulfidbrücke von ScErv1 wird in dem ebenfalls redoxaktiven CxxC-Motiv der N-terminalen flexiblen Region gebildet und variiert innerhalb der Erv-Familie sehr stark. Dieses wird auch als distales Cysteinmotiv bezeichnet. Zum einen ist dieses Motiv sowohl am N- (ScErv1, HsALR) als auch am C-Terminus (ScErv2, AtErv1) zu finden, zum anderen variieren sowohl Anzahl als auch Art der Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen des Motivs in verschiedenen Vertretern der Familie [78]. Sowohl das N-terminale CxxC-Motiv als auch das im aktiven Zentrum gelegene CxxC-Motiv sind an der Elektronentransferreaktion von Mia40 über ScErv1 auf Cytochrom c beteiligt [65]. Der Elektronentransfermechanismus verläuft nach einem ähnlichen Mechanismus wie in den Thioredoxin-Thioredoxinreduktase (Trx-TrxR) [81] und Glutathion-Glutathionreduktase (GSSG-GR) [82] Systemen. Das Flavoenzym verbindet ein oder zwei Thiol-Disulfid Austauschreaktionen mit der Oxidation oder Reduktion von schwefelfreien Molekülen wie Cytochrom c oder NAD(P)/H, wodurch thiolabhängige Reaktionen mit anderen metabolischen Prozessen wie der Atmungskette verknüpft werden können. Im Vergleich zu TrxR und GR verläuft der Elektronentransfer jedoch in umgekehrter Richtung [83]. Der Transfer kann in zwei Teilschritte eingeteilt werden, die reduktive und die oxidative Halb-

reaktion. In der reduktiven Hälfte interagiert das zweite Cystein des reduzierten Mia40 CPC-Motivs mit der N-terminalen Disulfidbrücke von ScErv1. Es ist nicht bekannt welches der beiden Cysteine des Motivs mit Mia40 interagiert (Abbildung 2, Schritt 1) [84, 85]. Anschließend bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen dem distalen Cysteinmotiv und C130, dem sogenannten interchange-Cystein aus (Abbildung 2, Schritt 2).

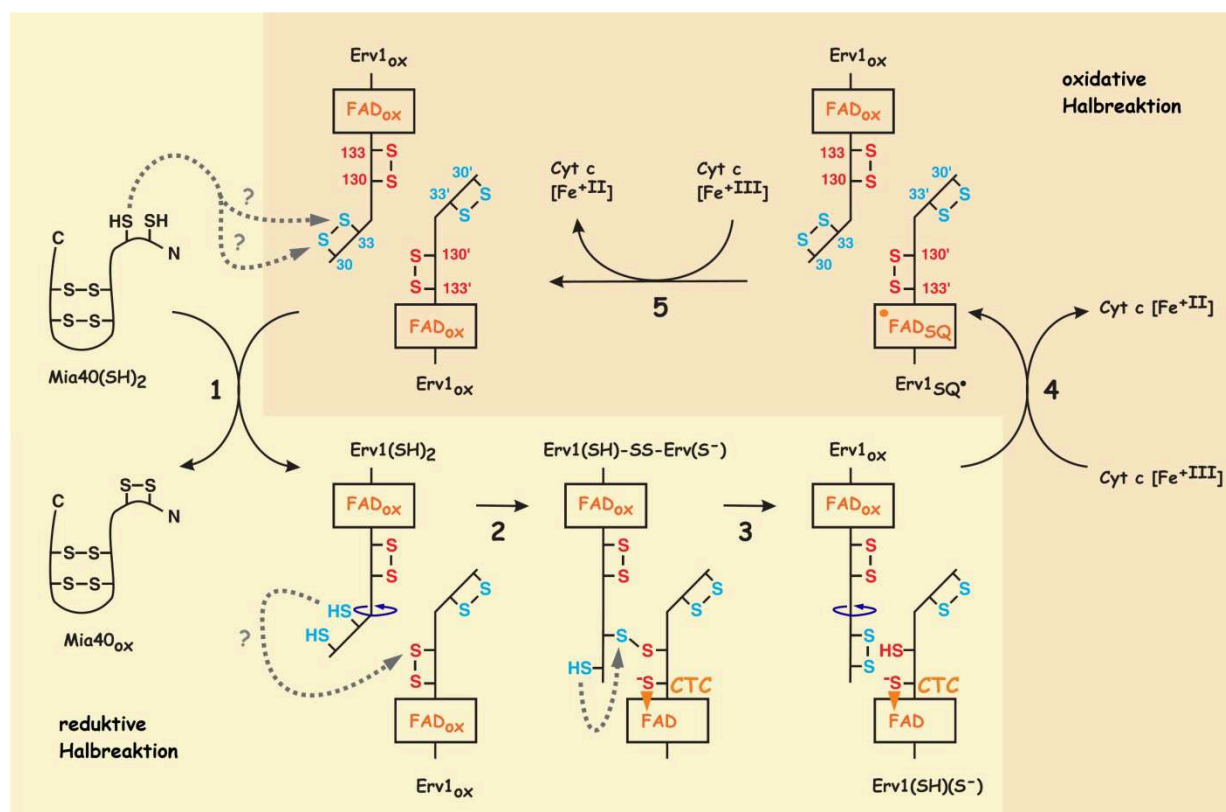


Abbildung 2: Vermutliches Reaktionsschema des Mia-Erv-Systems.

Modell der reduktiven (1-3) und oxidativen (4+5) Halbreaktionen des Elektronentransfers durch ScErv1. Starke strukturelle Änderungen sind durch dunkelblaue Pfeile gekennzeichnet. Die Elektronentransfere der oxidativen Halbreaktion sowie die daran beteiligten Spezies könnten zwischen den Proteinen der Erv-Familie variieren. CTC: Charge Transfer Complex, •FAD_{SQ}: FAD Semiquinon. Variiert nach Deponte [83].

Die Letalität der Mutation C33S im Gegensatz zu C30S deutet darauf hin, dass C33 aus dem distalen Cysteinmotiv an der Bindung beteiligt ist [65, 83]. In diesem Zustand kann das reduzierte C133 einen Thiolat-FAD Charge-Transfer-Complex (CTC) ausbilden (Abbildung 2, Schritt 2+3). Es wird angenommen, dass in der oxidativen Halbreaktion die zwei transferierten Elektronen voraussichtlich in zwei Schritten von FAD auf den von ScErv1 bevorzugten Elektronenakzeptor Cytochrom c übertragen werden, wodurch ScErv1 reoxidiert wird (Abbildung 2, Schritt 4+5) [62, 83, 86, 87].

1.4 Die evolutionäre Konservierung des mitochondrialen Proteinimports

1.4.1 Phylogenie der Eukaryoten

Die Phylogenie der Eukaryoten ist aufgrund neuer Erkenntnisse und Untersuchungsmethoden einem ständigen Wandel unterzogen. Eine sehr frühe Einteilung der Organismen in Tiere und Pflanzen durch Carolus Linnaeus war ausreichend für Vielzeller, jedoch zu eng gesteckt für die Vielzahl an einzelligen Organismen. 1959 fügte Robert Whittaker dieser Unterteilung drei weitere Reiche hinzu: Monera, Protista und Fungi. Dabei umfassen Monera, Organismen ohne Zellkern, die Prokaryoten [88]. Die Einteilung erfolgte anhand von Charakteristika des Aufbaus sowie der Ernährung. Neuere Ergebnisse, die z. B. auf der Untersuchung der ribosomalen RNS und einer stark erhöhten Datenmenge beruhen, zeigen, dass auch diese Unterteilung zu begrenzt ist. Ein neueres Modell teilt die Eukaryoten zusätzlich zu den prokaryotischen Archaeen und Eubakterien in sechs, wahrscheinlich monophyletische, also auf einen einzigen Vorfahren zurückgehende, Hauptgruppen ein: Ophisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria und Excavata [89]. Eine weiter differenzierte Variante nach Baldauf teilt die Eukaryoten basierend auf molekularen und ultrastrukturellen Daten in acht Gruppen ein: Opisthokonten, Amoebozoen, Plantae, Cercozoen, Alveolaten, Heterokonten, Excavata, Discicristaten (Abbildung 3) [90].

Die Opisthokonten haben in Reproduktionszellen ein einzelnes basales Flagellum sowie flache mitochondriale Cristae und umfassen sowohl Tiere als auch Pilze. Auch viele einzellige Organismen wie die Microsporidien gehören zu dieser Gruppe [89, 90].

Amoebozoen sind Amöben ohne äußere Schale, die oftmals zumindest für einen Teil ihres Lebenszyklus lobose Pseudopodien aufweisen. Zu ihnen gehören die Schleimpilze aber auch parasitäre Organismen wie *Entamoeba histolytica*, der Verursacher der Amöbenruhr [89, 90].

Sowohl die klassischen Landpflanzen als auch verschiedene Algen gehören zur Gruppe der Plantae. In diesen scheint die eukaryotische Photosynthese ihren Ursprung zu haben, da sie als Einzige Plastiden mit nur zwei Membranen besitzen [89, 90].

Cercozoen sind im Gegensatz zu Amoebozoen Amöben mit filösen Pseudopodien, welche häufig in harten äußeren Schalen leben [89, 90].

Die Alveolaten haben Systeme von kortikalen Alveoli direkt unterhalb der Plasmamembran. Zu ihren Vertretern zählen z. B. die parasitären Plasmodien, Erreger der Malaria. Die Plastiden dieser Gruppe wurden durch sekundäre Endosymbiose erworben [89, 90].

Die Gruppe der Heterokonten umfasst sowohl einzellige Organismen als auch multizelluläre Organismen wie Kelp. Sie zeichnen sich durch zwei unterschiedliche Flagellen aus, von denen eine mit hohlen Haaren besetzt ist. Ihre Chloroplasten wurden durch sekundäre Endosymbiose erworben [89].

Excavata sind einzellige, zum größten Teil heterotrophe Flagellaten und weisen häufig eine tiefe ventrale Ernährungsfurche auf. In frühen Studien wurden sie als separate frühe Äste des phylogenetischen Baums angesehen [89]. Ein Teil dieser Gruppe hat stark modifizierte Mitochondrien, welche nicht für die oxidative Phosphorylierung verwendet werden. Organismen mit diesen Modifikationen kommen gewöhnlich in Lebensräumen mit geringem Sauerstoffanteil wie dem Darm vor [89, 90].

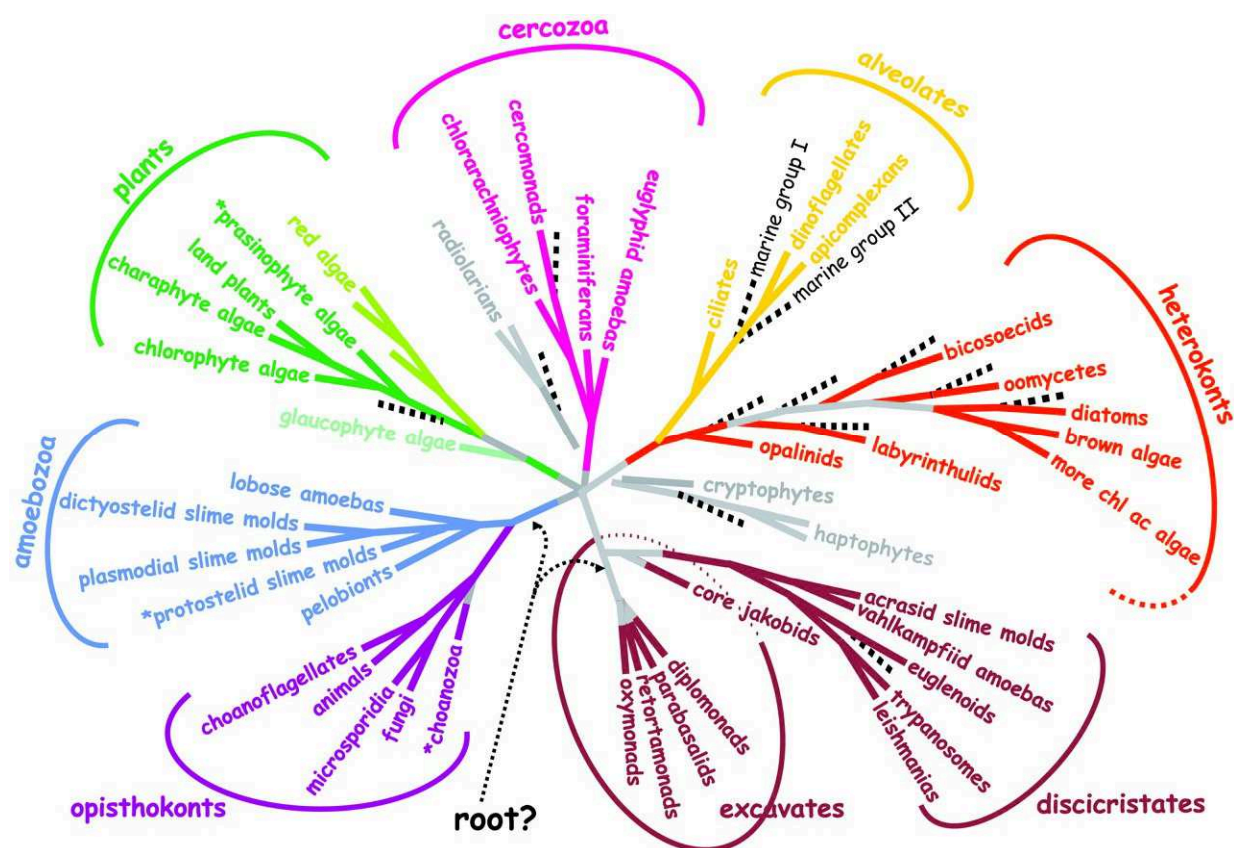


Abbildung 3: Dendrogramm der eukaryotischen Phylogenie.

Die bisher bekannten Eukaryoten sind in acht verschiedene Gruppen eingeteilt. Die verschiedenen Positionen des Ursprungs der Eukaryoten sind mit Pfeilen angedeutet. Unvollständig geklärte Bereiche sind grau markiert. Sternchen indizieren eine mögliche paraphyletische Gruppe. Variiert nach Baldauf [90].

Eine weitere Gruppe, die Discicristata, wird teilweise zu den Excavata gezählt und wurde aufgrund der scheibenartigen Form ihrer Cristae benannt. Diese Gruppe spaltete sich sehr früh in der evolutionären Entwicklung ab. Die Kinetoplastiden wie Leishmanien und Trypanosomen, Verursacher der Leishmaniose bzw. Schlaf- oder Chagaskrankheit sind ein Beispiel für die Discicristata [89, 90].

1.4.2 Kinetoplastiden

Die zu den Discicristata gehörenden Kinetoplastiden sind eine Gruppe von geißeltragenden, einzelligen Organismen. Viele molekularbiologische Entdeckungen, wie der Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) von Membranproteinen oder das trans-Splicing von Ribonukleinsäure (RNS), wurden erstmals an diesen Organismen gemacht und erst später in anderen Eukaryoten bestätigt. Daher ist es möglich, dass einige einzigartige Eigenschaften der Mitochondrien dieser Organismen auch in anderen Eukaryoten zu finden sind [91]. Kinetoplastiden wurden nach einer für diese Gruppe spezifischen Struktur, dem Kinetoplasten, benannt. Der Kinetoplast befindet sich in dem einzelnen Mitochondrium dieser Organismen und ist mit Filamenten am Basalkörper des Flagellums lokalisiert. Er besteht aus der mitochondrialen DNS [92, 93]. Die Anordnung der DNS in einer Vielzahl von vernetzten Maxi- (20-40 kb) und Minikreisen (0.7-2.5 kb) ist einzigartig für die Kinetoplastiden. Die proteincodierenden Regio-

nen der Kinetoplasten-DNS liegen vollständig auf den Maxikreisen. Viele dieser offenen Lese-rahmen sind jedoch unvollständig und müssen posttranskriptionell mittels RNS-Editierung bearbeitet werden [94]. Dabei werden die kleinen Leit-RNSs (Guide RNAs) als Matrize verwendet. Diese sind auf den Maxi-, aber auch auf den Minikreisen kodiert [95].

Zu den Kinetoplastiden zählen die Erreger einiger sehr schwerer Krankheiten, wie die Schlafkrankheit (*T. brucei*), Chagas-Krankheit (*T. cruzi*), und Leishmaniosen. In den Jahren 1896 bis 1906 starben während einer Epidemie in Afrika zwischen 300.000 und 500.000 Menschen an einer Infektion mit *T. brucei* und auch heute noch wird die Zahl der Infektionen auf etwa 30.000 geschätzt [96, 97]. Die Übertragung der *T. brucei* Erreger erfolgt durch den Stich von Tsetsefliegen. Die infektiösen metazyklischen Trypomastigoten werden in das Gewebe injiziert und vermehren sich im Zellzwischenraum. Anschließend wandern sie in die Lymphe und den Blutstrom ein. In diesem Stadium decken die Parasiten ihren Energiebedarf durch Glykolyse, welche zum größten Teil in speziellen, aus Peroxisomen entstandenen Organellen, den Glycosomen abläuft [98]. Viele Enzyme des Citratzyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung fehlen in diesem Stadium [99]. Im Blutstrom differenzieren einige Parasiten zu plumpen, teilungsunfähigen Formen, welche wiederum von den Tsetsefliegen aufgenommen werden. Diese Stadien sind im Darm der Fliege überlebensfähig sind und differenzieren dort zu prozyklischen Trypomastigoten. Der Stoffwechsel dieser Form des Parasiten unterscheidet sich aufgrund der geringen Glucosekonzentration stark von der Blutstromform, da bevorzugt Prolin für die Energiegewinnung metabolisiert wird. Im Darm differenzieren die Parasiten zu weiteren Formen, wandern in die Speicheldrüse der Tsetsefliege und wandeln sich dort in infektiöse metazyklische Trypomastigoten um [99-101].

Weitaus höher sind die geschätzten *T. cruzi* Infektionszahlen. Es wird angenommen, dass bis zu 10 Millionen Menschen weltweit infiziert sind und mehr als 10.000 jährlich an der Chagas-Krankheit sterben [102]. Der Parasit wird durch den Kot von Raubwanzen, den Triatominae, übertragen. Nach dem Biss wird der Parasit mechanisch in die Wunde eingebracht, aber auch der Kontakt mit den Augen führt zu Infektionen. Der Lebenszyklus unterscheidet sich stark von dem der nahe verwandten *T. brucei*. Zwar findet ebenfalls ein Wirtswechsel zwischen Insekt und Säugetier statt, jedoch bilden sich die infektiösen Stadien im Darm der Wanzen und nicht in den Speicheldrüsen. Nach der Übertragung der Parasiten auf den Menschen invasiert *T. cruzi* zunächst Lysosomen verschiedener Zelltypen des Wirtes und differenziert anschließend im Zytosol zu aflagellaten Amastigoten. Bei hoher Parasitendichte in der Zelle differenzieren diese wiederum zu flagellierten Trypomastigoten, welche in die Lymphe und Blutbahn freigesetzt werden und neue Zellen infizieren [103-105]. Die im Blut zirkulierenden Trypomastigoten und Amastigoten werden bei einem erneuten Biss auf die Wanze übertragen. In deren Darm differenzieren sie über amastigote und epimastigote Formen zu infektiösen metazyklischen Trypomastigoten, welche wiederum mit dem Kot ausgeschieden werden [106-108].

Die Zahl der mit Leishmanien infizierten Personen wird weltweit auf 12 Millionen geschätzt und jedes Jahr werden in etwa 2 Millionen Menschen neu infiziert. Bestimmte Formen der Leishmaniose sind durch eine hohe Morbidität gekennzeichnet und die Todesrate von geschätzten 70.000 Todesfällen pro Jahr wird nur von Malaria übertroffen [109]. Es gibt eine Vielzahl von Leishmaniosen, welche sich durch Wirt wie auch durch Krankheitsbild unterscheiden. Die für den Menschen gefährlichsten Leishmanien-Parasiten sind *L. donovani* und *L. infantum*. Diese

Formen verursachen die viscerale Leishmaniose, welche unbehandelt meist tödlich verläuft. Die häufigste Form, die kutane Leishmaniose, welche häufig spontan ausheilt, wird durch *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* übertragen. Die von *L. brasiliensis* verursachte mukokutane Leishmaniose führt zu starken Verunstaltungen des Gesichtes. Die Parasiten werden in Form von metazyklischen Promastigoten von Sandfliegen übertragen. In der Einstichstelle werden die Leishmanien von Neutrophilen sowie Makrophagen aufgenommen und wandeln sich dort in parasitophoren Vakuolen in aflagellate, runde Amastigoten um. Diese vermehren sich durch Teilung weiter. Bei einer erneuten Blutmahlzeit der weiblichen Sandfliegen werden die infizierten Makrophagen aufgenommen und differenzieren im Darm der Sandfliege in längliche, prozyklische Promastigoten mit Flagelle. In weiteren Prozessen werden infektiöse metazyklische Promastigote gebildet, welche bei einem erneuten Stich in die Wunde freigesetzt werden [110, 111]. Die Morphologie der Mitochondrien ist in Leishmanien weniger vom Stadium abhängig als in Trypanosomen. Sowohl in Promastigoten als auch Amastigoten ist die Atmungskette funktionell. Die für die Energiegewinnung bevorzugt verwendeten Substrate variieren jedoch. So werden in Promastigoten vermehrt Aminosäuren und Zucker umgesetzt, während in amastigoten Formen die β -Oxidation von Fettsäuren erhöht ist [112].

1.4.3 Mitochondrialer Proteinimport in Nicht-Opisthokonten

Die bisherige Erforschung des MPI beschränkt sich weitgehend auf Organismen der Opisthokonten wie Pilze und Tiere sowie auf Pflanzen und repräsentiert somit nur einen geringen Teil der Eukaryoten. Über Organismen, die nicht zu diesen beiden Gruppen gehören, ist bisher wenig bekannt. Die meisten bisherigen Erkenntnisse wurden in reinen *in silico*-Studien gewonnen. Einige Studien an Nicht-Opisthokonten, wie Kinetoplastiden und Amöben zeigen auf, dass sich viele Eigenschaften des Proteinimports dieser Gruppen deutlich vom für die Opisthokonten aufgestellten Modell unterscheiden. Gemeinsamkeit im Proteinimport besteht darin, dass repräsentative Organismen aller Supergruppen einen TOB-Komplex bzw. die zentrale Komponente des Komplexes, Tob55 enthalten [20, 21, 113]. Dieses Protein ist mit dem bakteriellen BamA verwandt, welches Teil eines bakteriellen Komplexes zur Integration von β -Barrel-Proteinen in die OM und zur Zusammensetzung dieser Proteine zu Komplexen ist [114]. Die weite Verbreitung von Tob55/BamA deutet auf eine sehr starke Konservierung dieses Importweges seit den Ureukaryoten hin [115]. Unterschiede zeigen sich beim Import von Proteinen mit N-terminalen Signalsequenzen, welche in Opisthokonten über die TOM und TIM17-Komplexe importiert werden. In vielen der untersuchten Nicht-Opisthokonten, wie gerade den Trypanosomatiden, sind die Signalsequenzen deutlich verkürzt [116-123]. So wurde ein konserviertes Motiv von 6-8 Resten mit einer spezifischen Verteilung von Serin, Leucin und basischen Resten bestimmt [123, 124]. In Einzelfällen wurde gezeigt, dass diese verkürzten Sequenzen ausreichend für den Import in Mitochondrien aus Opisthokonten sind und auch mitochondriale Tier- und Pflanzenproteine in die Mitochondrien anderer Supergruppen importiert werden [117, 118, 123, 125-129]. Ein weiterer Unterschied zeigt sich bei den TOM- und TIM-Komplexen. Nur drei Untereinheiten des TOM-Komplexes kommen üblicherweise in allen Eukaryoten inklusive Pflanzen, Tieren, Pilzen, Diatomeen und parasitischen Protisten wie Plasmodium vor: Tim40, Tom7 und Tom22 [130]. In Trypanosomatiden konnte *in silico* kein Teil des TOM-Komplexes inklusive der drei Grundkomponenten identifiziert werden [91, 131].

Die Komponenten der IM-Transportmaschinerie sind sogar in Protisten wie Giardia, Plasmodium und Trypanosomatiden stark konserviert [132]. Jedoch wurde auch in diesem Fall in *T. brucei*, dem am besten untersuchten Vertreter der Trypanosomatiden, nur ein Protein der Tim17-22-23-Familie identifiziert [91]. Dieses Protein ist vermutlich essentiell für den Proteintransport in Mitochondrien [91, 113]. Komponenten des TIM22-Komplexes wurden in diesem Organismus nicht identifiziert. Trotz der Abwesenheit des Komplexes werden *T. brucei* Metabolittransportproteine, welche in Opisthokonten über den TIM22-Komplex importiert werden, in die mitochondriale IM inseriert. Des Weiteren wurden humane Transportproteine in Leishmanien funktionell und korrekt in die IM transportiert [125]. Diese Punkte weisen auf die Konservierung der Funktion des TIM22-Komplexes hin.

Die Anzahl der kleinen-Tim-Proteine variiert stark zwischen verschiedenen Organismen. So verfügt *S. cerevisiae* über fünf kleine-Tim-Proteine, während im reduzierten Mitosom von *Encephalitozoon cuniculi* kein kleines-Tim identifiziert wurde. In Trypanosomatiden wurden durch *in silico*-Studien nur drei kleine-Tim-Proteine gefunden, während Plasmodien über komplette Sätze von fünf kleinen-Tim-Proteinen verfügen [133]. Homologe der Komponenten Oxa1 und Oxa2 des IM OXA-Komplexes sind in *T. brucei* konserviert [91]. Hingegen ist zu Beginn dieser Arbeit kein Teil der Mia-Erv-Maschinerie in Trypanosomatiden bekannt. Abgesehen von den hier erwähnten Komponenten war zu Beginn dieser Arbeit kein weiterer Teil des MPI in Trypanosomatiden bekannt.

1.5 Glutaredoxine

In jeder Zelle werden in verschiedenen Prozessen so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. So entsteht z. B. das hochreaktive Superoxidradikal als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und wird durch Superoxiddismutase in das weniger aktive Oxidationsmittel H_2O_2 umgewandelt [134]. Diese ROS reagieren mit ungesättigten Kohlen-Kohlen-Bindungen sowie funktionellen Gruppen, die Schwefel oder Sauerstoff enthalten. Die Produkte dieser Reaktionen sind schädliche Radikale, Sulfensäure, Disulfide und Peroxide [135-138]. Eine Überproduktion von ROS kann zur Beschädigung von DNS, Lipiden und Proteinen führen [139]. Daher gibt es eine Vielzahl von physiologischen Mechanismen, um die reduzierenden intrazellulären Bedingungen aufrecht zu erhalten [137, 138, 140-142].

Gerade Enzyme, die Cysteine als wichtige strukturelle Komponente oder im aktiven Zentrum nutzen, sind besonders empfindlich für eine Änderungen der Redoxumgebung und werden durch diese reguliert [134, 143-146]. In reduzierter Form können die Cysteine z.B. Metallionen koordinieren und werden für die Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern (FeS-Cluster) oder Hämgruppen benötigt. Die Oxidation der Cysteine kann zur Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken und dadurch zur Faltung von Proteinen führen. Dies sowie die Modifikation der Cysteine durch z. B. Glutathionylierung sind Möglichkeiten zur Regulation der Proteinaktivität. Insofern ist die Aufrechterhaltung eines bestimmten Redoxzustandes und die Entfernung von ROS in der Zelle essentiell. Diese Funktion erfüllt das ubiquitäre Glutathion-System in Kombination mit dem Thioredoxin (Trx)-System. Das Trx-System reduziert Disulfide ohne Zuhilfenahme von Glutathion. Reduziertes Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) bilden ein Redoxpuffersystem in der Zelle. Dabei unterscheidet sich sowohl die Gluta-

thionkonzentration (0.1-15 mM) als auch das Verhältnis von nucleophilem GSH zu GSSG in den verschiedenen Kompartimenten. Die GSSG Konzentration ist jedoch im Normalfall wesentlich geringer [147-149].

GSH kann Proteindisulfide in einer nichtenzymatischen Reaktion reduzieren, was zur Bildung eines gemischten Disulfids führt. Die Reaktion dieses gemischten Disulfids mit einem weiteren Molekül GSH führt zur Freisetzung des reduzierten Proteins und GSSG. Diese Reaktion verläuft ohne den Katalysator Glutaredoxin (Grx) jedoch sehr langsam [141, 150, 151].

Glutaredoxine sind kleine, in fast allen Organismen vorkommende Proteine von 10-16 kDa, die Thioloxidoreduktaseaktivität besitzen. Sie haben eine hochkonservierte Trx-ähnliche Struktur, die aus 4-5 β -Faltblättern besteht, welche von α -Helices umgeben sind. Die Grx grenzen sich durch ihre Spezifität für GSH von Trx ab und besitzen konservierte positiv geladene Aminosäuren, die mit den Carboxylatgruppen von Glutathion interagieren [152-155].

Obwohl die Proteine funktionell sehr divers sind, können sie anhand der Sequenz des redoxaktiven Motivs im aktiven Zentrum in zwei Gruppen eingeteilt werden: Dithiol-Grx mit dem Motiv CP(Y/F)C und Monothiol-Grx mit dem Motiv CGFS [151, 156]. Eine weitere Unterteilung der Proteine kann durch Vergleiche der Lokalisation, der Quartärstruktur, der Fähigkeit, FeS-Cluster zu binden und der Reduktion verschiedener Modellssubstrate vorgenommen werden [150, 151, 156-159]. So katalysieren einige, jedoch nicht alle Grx die GSH-abhängige Reduktion von Di-(2-hydroxyethyl)-disulfid (HEDS) zu zwei Molekülen β -Mercaptoethanol (2-ME) im Glutathion Reduktase (GR) gekoppelten, enzymatischen Assay. Viele Dithiol-Grx aus unterschiedlichen Spezies zeigen Aktivität in diesem Assay [160-164], jedoch keines der bisher getesteten Monothiol-Grx [165-169]. Dabei enthalten Monothiol-Grx theoretisch alle funktionellen Reste und Substratbindungsmotive, um die Reduktion von gemischten Disulfiden zu katalysieren. Für einige Monothiol-Grx wurde *in vitro* sogar gezeigt, dass deren Cystein im aktiven Zentrum glutathionylierbar ist. Trotz dieser Eigenschaft sind die entsprechenden Grx im HEDS-Assay inaktiv [156, 165, 170].

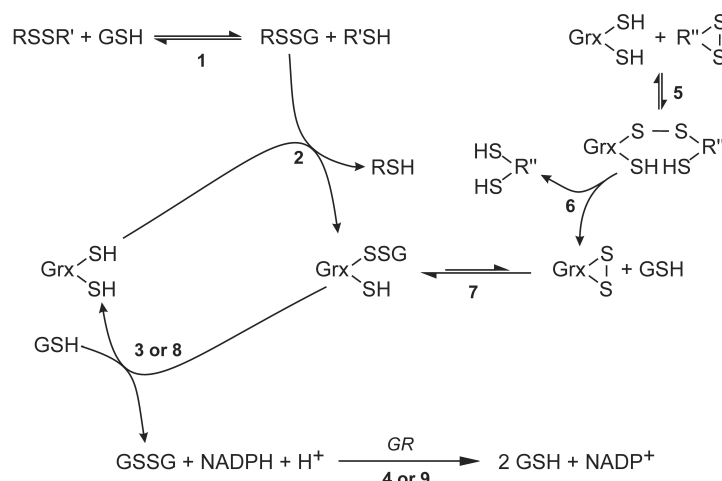


Abbildung 4: Traditioneller Grx-Katalysemechanismus.

Einerseits katalysieren Dithiol-Grx die Reduktion von glutathionylierten Thiolgruppen, (Schritt 2+3), welche in einer spontanen Reaktion entstanden sind (Schritt 1). Andererseits die Reduktion von intramolekularen Disulfidbrücken (Schritt 5-8). Das bei diesen Reaktionen entstehende GSSG wird durch GR reduziert wodurch 2 Moleküle GSH regeneriert werden (Schritt 4, 9) [157].

Die Reduktion von glutathionylierten Proteinen, die z. B. in einer nichtenzymatischen Reaktion gebildet wurden, (Abbildung 4, Schritt 1) startet nach dem traditionellen Katalysemechanismus der Glutaredoxine mit dem nukleophilen Angriff des N-terminalen Cystein im CPYC-Motiv. Dies resultiert in der Freisetzung des reduzierten Proteins und der Bildung eines gemischten Disulfids zwischen Grx und Glutathion (Abbildung 4, Schritt 2). Der nucleophile Angriff eines GSH im reduktiven Teil der Ping-Pong-Reaktion führt zur Bildung von GSSG und zur Rückführung des Enzyms in den reduzierten Zustand (Abbildung 4, Schritt 3). Die Reduktion von Disulfidsubstraten über den Dithiolmechanismus erfordert die Anwesenheit beider Cysteine des aktiven Zentrums. In diesem Fall entsteht durch den nucleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins ein gemischtes Disulfid zwischen Grx und dem Substratprotein (Abbildung 4, Schritt 5). Weitere Elektronentransferschritte im gemischten Disulfid führen zur Freisetzung des reduzierten Substrats und zur Bildung von oxidiertem Grx (Abbildung 4, Schritt 6). Hier besteht die reduktive Halbreaktion aus der in zwei Schritten ablaufenden Reduktion von Grx durch zwei Moleküle GSH, wobei GSSG gebildet wird (Abbildung 4, Schritt 7+8) [141, 142, 151, 152, 155, 160, 171-174]. Die Regeneration des reduzierten Glutathion erfolgt in einer GR-abhängigen Reaktion. Die Elektronen werden vom universellen Reduktionsmittel NADPH auf GSSG übertragen, wodurch zwei GSH freigesetzt werden. Als Relay fungiert hierbei Flavinadenin dinucleotid (FAD), der Cofaktor von GR (Abbildung 4, Schritt 4 bzw. 9) [82, 148, 175, 176].

1.6 Glutaredoxine aus Hefe

In *Saccharomyces cerevisiae* waren zu Beginn dieser Arbeit fünf unterschiedliche Grx bekannt. Grx1 und Grx2 sind Dithiol-Grx, welche beide ein konserviertes CPYC-Motiv im aktiven Zentrum haben und 64 % Sequenzidentität aufweisen [162]. Grx1 ist ein zytosolisches Protein, während Grx2 aufgrund von zwei unterschiedlichen Startcodons in zwei Isoformen exprimiert wird. Die Vollängenform wird dabei in die mitochondriale Matrix transportiert, während die kürzere Form zytosolisch ist [177, 178]. Des Weiteren wurde eine in der mitochondrialen OM lokalisierte Subpopulation vorgeschlagen [178, 179]. Die Deletion eines der beiden, bzw. beider Dithiol-Grx hatte keinerlei Auswirkung auf das Wachstum von Hefe sowohl auf fermentierbaren als auch auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen und Minimalmedium. Allerdings führte sie zu einer geringfügig erhöhten Sensitivität gegenüber externen Hydroperoxiden, bzw. stieg die Toleranz der Organismen gegenüber diesen Substanzen bei Überexpression von Grx1+2. Des Weiteren wurde beiden Proteinen GSH-Disulfid-Oxidoreduktase-, Glutathionperoxidase- und Glutathion-S-Transferase-Aktivität zugeschrieben. Daher wird angenommen, dass Grx1+2 am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt sind [162, 180, 181].

Die Monothiol Glutaredoxine Grx3-5 weisen im Gegensatz zu Grx1 und Grx2 ein CGFS-Motiv im aktiven Zentrum auf [182]. Für keines dieser Proteine wurde *in vitro* Glutaredoxinaktivität nachgewiesen. Grx3 und Grx4 besitzen eine zusätzliche N-terminale Thioredoxin-domäne und sind an der Regulation des eisenabhängigen Transkriptionsfaktors Aft1 im Nukleus beteiligt [183-185]. So wird die Lokalisation von Aft1 in Anwesenheit von Grx3+4 in Richtung des Zytosols verschoben. Dieser Prozess ist abhängig von Eisen und der Grx-Domäne der Proteine [185, 186].

Im Gegensatz zu Grx3 und Grx4, deren Deletion keine Auswirkung auf das Wachstum von Hefe in verschiedenen Medien ausübt, führt die Deletion von Grx5 zu einem stark einge-

schränkten Wachstum [182]. Des Weiteren resultiert die Deletion in einer Ansammlung von Eisen und reduzierter Aktivität von FeS-Cluster tragenden Enzymen [187]. Daher wird angenommen, dass Grx5 an der Bildung von FeS-Clustern in der mitochondrialen Matrix beteiligt ist [156, 187]. Die Komplementation von Grx5 durch die Monothiol-Grx3, bzw. 4 war im Gegensatz zu Dithiol-Grx erfolgreich, sofern sie mit mitochondrialen Signalsequenzen versehen und somit im Mitochondrium lokalisiert sind [188]. Dies lässt auf eine starke Konservierung der Funktion von Monothiol- bzw. Dithiol-Grx schließen.

1.7 Zielsetzung

Ein Großteil der mitochondrialen Proteine ist im Nukleus kodiert und wird erst nach der Translation in die Mitochondrien importiert. Die an diesem Vorgang beteiligte, hochkomplexe Importmaschinerie wurde bisher vorwiegend an Opisthokonten untersucht. Bioinformatische Untersuchungen von Kinetoplastiden, einer sehr entfernt verwandten Gruppe, deuten jedoch starke Unterschiede im Aufbau dieser Importkomplexe an. Daher sollen im ersten Teil dieser Arbeit Komponenten der Importmaschinerie von *Leishmania tarentolae* identifiziert, und der Organismus experimentell als Modellsystem zur Untersuchung des mitochondrialen Proteinimports in Nicht-Opisthokonten etabliert werden. Anschließend sollte die funktionale Konservierung der Importwege analysiert werden. Des Weiteren sollte ein ausgewählter Leishmanienimportkomplex im Detail untersucht und die Grundlagen für eine spätere, detaillierte Untersuchung der anderen Komplexe gelegt werden.

Glutaredoxine sind als sehr diverse Enzymklasse unter anderem an der zellulären Redoxhomöostase und am Eisenmetabolismus beteiligt. Auch in Hefe sind acht verschiedene Glutaredoxine bekannt. Frühere Studien ergaben eine Rolle der Monothiol-Glutaredoxine (ScGrx3-5) am Eisenstoffwechsel sowie der Dithiol-Glutaredoxine (ScGrx1 und 2) am Schutz der Zelle vor Oxidantien. Im Standardenzymassay waren auch in Hefe alle untersuchten Monothiol-Glutaredoxine in Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen inaktiv. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten drei neue Glutaredoxine aus Hefe, zwei Monothiol-Glutaredoxine (ScGrx6 und Grx7) sowie ein Dithiol-Glutaredoxine (Grx8) in Bezug auf ihre biochemischen Eigenschaften vergleichend analysiert werden. Hierzu zählen die Quartärstruktur, die Fähigkeit Disulfide auszubilden oder Eisen-Schwefel-Cluster zu binden sowie die katalysierte Reduktion von Modellsubstraten. Die Charakterisierung dieser drei neuen Proteine sollte somit zur weiteren Klärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen sowie des Katalysemechanismus dieser Enzymklasse beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien verwendet. Alle weiteren Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität bei Merck bezogen. Lösungsmittel wurden von der Universitätschemikalienausgabe bezogen.

Artikel	Firma	Artikel	Firma
100 bp und 1 kb DNS-Leiter	NEB	IgG-Sepharose 6 Fast Flow	GE-Healthcare
5-FOA	Lancaster	Imidazol	Applichem
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, 30 %	Serva	Iodacetamid	Sigma
Agar	Carl Roth	IPTG	Gerbu
Ammoniumchlorid	Merck	Kanamycin	Gibco
Ammoniumsulfat	Merck	Lactat	Sigma
Ampicillin	Applichem	L-Arginin	Sigma
Anti-Goat-HRP Konjugat	Biorad	LB (Luria/Miller)	Carl Roth
Anti-Mouse HRP Konjugat	Biorad	LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth
APS	Biorad	L-Leucin	Fluka
ATP, Di-Na	Roche	L-Lysin	Fluka
Bactopepton	USB	L-Cystein	Fluka
Bactotrypton	BD	Leucin	Fluka
BHI-Medium	BD	Leupeptin	Sigma
BMH	Pierce	L-Histidin	Sigma
Bradfordreagenz	Biorad	L-Methionin	Fluka
BSA, fatty acid free	Serva	Luminol	Sigma
CCCP	Sigma	Lysozym	Serva
Citraconsäure	Sigma	MBS	Pierce
CNBr-activated sepharose	Amersham	Mercaptoethanol	Fluka
Complete EDTA free	Roche	Methanol	Applichem
Creatinkinase	Roche	Methionin [³⁵ S]	MP Biomedicals
DFDNB	Pierce	Methylcellulose	Sigma
DNasel	Roche	Milchpulver	Carl Roth
dNTPs	Fermentas	MitoTrackerR Red CM-H2XRos	Invitrogen
DSG	Pierce	MOPS	Gerbu
D-Sorbitol	Sigma	MW Protein marker unstained	Fermentas
DSS	Pierce	Natriumcarbonat	Sigma
DTT	Gerbu	NAD+	Sigma
EDTA, Titriplex T	Serva	NADH	Gerbu
Ethanol	Sigma	NADPH	Gerbu
Ethidiumbromid	Carl Roth	NeXtal suites	Qiagen
FCS	Invitrogen	Ni-NTA	Qiagen
Fish Skin Gelatine	Sigma	Oligomycin	Sigma
Formamid	Sigma	Orange G	Sigma
G418	Fluka	Paraformaldehyd	Pierce
Galactose	Applichem	p-Coumarinsäure	Sigma
Glucose	Applichem	Pepton	USB
Glutaraldehyd	Carl Roth	Pfu DNS-Polymerase	Fermentas
Glutathion Reduktase	Sigma	Phosphocreatin	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	GE-Healthcare	Phusion Polymerase	NEB
Glycerol	Sigma	PMSF	Serva
GSH	Sigma	PonceauS	Serva
GSSG	Sigma	Primer	Metabion
GTP	Roche	Protein-A Sepharose	GE-Healthcare
Häminchlorid	Calbiochem	ProteinA Gold (10 nm)	Sigma
Harnstoff/Urea	Serva	Proteinase K	Roche
HEDS	Sigma	Protein-G-Sepharose	GE-Healthcare
Hefeextrakt	BD	Proteinmarker	Fermentas
HEPES	Gerbu	RbCl	Sigma
HMW/LMW Gelfiltrationsstandard	GE-Healthcare	Restriktionsenzyme	NEB
Hoechst 33258	Invitrogen	RNaseA	Sigma
IgG-Sepharose	ICN	RnasIn	Promega

Artikel	Firma	Artikel	Firma
SDS	Serva	Tris	Carl Roth
Sorbitol	Sigma	Trypton	BD
Sulfolink coupling gel	Pierce	Tween-20	Sigma
T4 DNS-Ligase	NEB	Uranylacetat	Sigma
T7-RNS Polymerase	Promega	Valinomycin	Sigma
Taq-Polymerase	NEB	Wasserstoffperoxid 30%	Appllichem
Thioredoxin Reduktase	Sigma	Xylencyanol	Sigma
TEMED	Serva	Yeast nitrogen base	Gibco
TEV-Protease	Invitrogen	Zymolyase	Seikagaku
Thioredoxin Reduktase	Merck		Biobusiness
TNT-Lysat	Promega		

Tabelle 1

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma	Artikel	Firma
0,5 - 2 ml Reaktionsgefäße	Greiner	Petrischalen	Sarstedt
15 bzw. 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner	Pipettenspitzen	Steinbrenner
Centriprep YM-10	Millipore	Polyprep Chromatography Columns	Biorad
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen	Quarzglasküvetten 104B QS und OS	Hellma
<i>E. coli</i> Novablue	Novagen	Serologische Pipetten	Sarstedt
<i>E. coli</i> Xl1-Blue	Qiagen	Spritzen	Braun
Halbmikroküvetten	Sarstedt	Spritzen Vorsatzfilter	Pall
Handschuhe	VWR	UV-Küvette-mikro	Brand
Kanülen	Braun	Westernblot Film Fuji Super RX	Fischer-Sehner
Kodak Biomax MR Film	Sigma	Whatmanpapier	Whatman
Kryoröhrchen	PAA	Zellkulturflaschen	Corning
Nitrocellulosemembran	Whatman		

Tabelle 2

2.1.3 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung, Firma
Autoklav	Varioclav® 400E, H + P Labortechnik
Blotapparaturen	PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter, Peqlab
Mini Trans-Blot®	Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad
Brutschränke	Infors AG, Heraeus, Thermo Scientific
Chromatographiesystem	Äkta Explorer, GE Healthcare
Elektronenmikroskop	EM900 Zeiss
Elektroporationssystem	Bakterien Transformation: Gene Pulser, Bio-Rad, Leishmanien Transfektion: Nucleofector, Amaxa
Entwicklermaschine	Curix 60®, Agfa-Gevaert
Feinwaagen	Sartorius TE124S-0CE
French Press 40K	Thermo Fisher Scientific
Geldokumentation	E.A.S.Y 440K + UV-Transilluminator UVT-28L, Herolab
Gelkammern	Pe-R.Tec Peter Reiser Werkstatt
ICP-AES-Spektrometer	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis Cell, Bio-Rad
Inkubatoren	Varian Vista RL CCD-Simultan AES-ICP Spektrometer und Software ICP expert Bakterienkultur: Heraeus, Infors HAT, Leishmanienkultur: BellcoBench Top Incubator, Memmert ICP 400-800
Inkubator Kristallisation	RUMED
Kolbenhubpipetten	PIPETMAN® P, Gilson
Magnetrührer	MR-Hei Standard, Heidolph Instruments
Multikanalpipetten	Research Pro, Eppendorf
Mikroskop	Axiovert200M, LSM 780, Carl Zeiss
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro, Brand
pH-Meter	Basic meter PB-11, pH-Glasmembranelektrode PY-P10, Sartorius
Peristaltische Pumpe	P-1, GE Healthcare
Reinstwasseranlage	PureLab Plus, ELGA Labwater
Rotator	PTR-30, Grant-bio
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments
Spannungsversorgung	Power Supply EPS 601, GE Healthcare
SPR-Photometer	Biacore X und Biacore X control software, GE Healthcare

Gerät	Gerätebezeichnung, Firma
Sterilbänke	Bakterienzellkultur: gelaire® BSB 3A, Leishmanien-Zellkultur: gelaire® BSB 6, Flow Laboratories
Thermostate	Thermomixer comfort, Eppendorf, MBT 250, Kleinfeld Labortechnik
Thermozykler	Mastercycler gradient, Eppendorf
Tischzentrifuge	5417R, Eppendorf
Transilluminator	Herolab UVT-28L mit Herolab E.A.S.Y. 440K Kamera
Ultraschallgerät	Sonoplus HD 2070, BANDELIN electronic
Ultrazentrifuge	Sorvall RCM120GX Ultracentrifuge, Beckmann L8-M
UV/Vis-Photometer	V-650 Spektrophotometer und SpectraManager, JASCO
Vortex-Schüttler	Heidolph Instruments
Wasserbad	Julabo 7A, JULABO Labortechnik
Zentrifugen	Beckman Coulter Instruments

Tabelle 3

2.1.4 Primer

Für Klonierungen, Mutagenesen und Sequenzierungen wurden die Primer in Tabelle 4 verwendet.

Name	Sequenz
LtTob55/s1	5' ATGACCGACACTATGCAACAAACGGTAAACATTTGTGAGG 3'
LtTob55/as1	5' CTAGAACGAGAAATTGGATGACCAAACCAAACCGGAACCGATC 3'
LtTob557/BamHI/s1	5' GACTGGATCCATGACCGACACTATGCAACAAACG 3'
LtTob55/Spel/as1	5' GACTACTAGTGAACGAGAAATTGGATGACCAAACC 3'
LtTob55/MfeI/as1	5' GACTCAATTGGAACGAGAAATTGGATGACCAAACC 3'
LtTom40/s1	5' ATGAGTGGCGAGGTCGACTTCTGGTCCGC 3'
LtTom40/as1	5' TCATATGACGAGCGCTTCTAGCTTGTC AATGAC 3'
LtTom40/s2	5' ATGAGTGGCGAGGTCGACTTCTGGTCCGCCACAATTGCGGCATATCAGCC 3'
LtTom40/as2	5' TCATATGACGAGCGCTTCTAGCTTGTC AATGACGCGGTCATTCTCGCTCAG 3'
LtTom40/BamHI/s1	5' GACTGGATCCATGAGTGGCGAGGTCGACTTCTGG 3'
LtTom40/Spel/as1	5' GACTACTAGTGACGAGCGCTTCTAGCTTGTC AATG 3'
LtTom40/EcoRI/as1	5' GACTGAATTCGACGAGCGCTTCTAGCTTGTC AATG 3'
LtErv1/s 3	5' ATGTCGGACGACGACGTACACGAACGCCTCACCACCATCCC 3'
LtErv1/as3	5' CTAGAGCTTGAGTTCTTCGTCCTCTGGGCAGTACACTTG 3'
LtErv (BamHI) s	5' CCCGGATCCATGTCGGACGACGACGTACACG 3'
LtErv (XhoI) as	5' CCCCTCGAGGAGCTTGAGTTCTTCGTCCTCTG 3'
pQE30 LtErv s (BamHI)	5' CCGGATCCTCGGACGACGACGTACACGAACGCCTCACCACCATCCC 3'
pQE30 LtErv as (HindIII)	5' CCAAGCTTTTAGAGCTTGAGTTCTTCGTCCTCTGGGCAGTACACTTG 3'
LtErv/BamHI/s1	5' GACTGGATCCATGTCGGACGACGACGTACACG 3'
LtErv/Spel/as1	5' GACTACTAGTGAGCTTGAGTTCTTCGTCCTCTG 3'
LtErv/MfeI/as1	5' GACTCAATTGGAGCTTGAGTTCTTCGTCCTCTG 3'
LtErv C17S pQE30 s	5' CCATCCCTGGTGAGAGCCCCACCCCGC 3'
LtErv C17S pQE30 as	5' GCGGGGTGGGGCTCTCACCAGGGATGG 3'
LtErv C63S s	5' GGCATACGTGTACGCGTCCAGCTGGTGTGCCTACC 3'
LtErv C63S as	5' GGTAGGCACACCAGCTGGACGCGTACACGTATGCC 3'
LtErv C66S s	5' CGCGTGCAGCTGGTCTGCCTACCACATGCG 3'
LtErv C66S as	5' CGCATGTGGTAGGCAGACCAGCTGCACGCG 3'
LtErv C92S s	5' CCGTCTCACGCTACGTGTCTGAGATGCACAACAACG 3'
LtErv C92S as	5' CGTTGTTGTGCATCTCAGACACGTAGCGTGAGACGG 3'
LtErv C109S s	5' CGGCAAAGAACTCTTTGATTCCACCCCTAGCGTGGTGC 3'
LtErv C109S as	5' GCACCACGCTAGGGGTGGAATCAAAGAGTTCTTTGCCG 3'
LtErv C300S s	5' CTCAAACGTCTCAAGCGTTCTCAAGTGTACTGCCC 3'
LtErv C300S as	5' GGGCAGTACACTTGAGAACGCTTGAGACGTTTGAG 3'
LtErv C304S s	5' CGTTGTCAAGTGTACTCCCCAGAGGACGAAGAACTC 3'
LtErv C304S as	5' GAGTTCTTCGTCCTCTGGGGAGTACACTTGACAACG 3'
LtErv C300S/C304S s	5' CGTCTCAAGCGTTCTCAAGTGTACTCCCC 3'
LtErv C300S/C304S as	5' GGGGAGTACACTTGAGAACGCTTGAGACG 3'
LtErv Kin.domäne (BamHI) s	5' CCCGGATCCAACAAGATGGAGGATACGCCAACGATCGAGG 3'
LtErv Domäne (HindIII) as	5' CGCAAGCTTTTAGTGCCACCGACGACGACACCACGCTAGGGG 3'
LtsmallTim/s1	5' ATGCAGCCGGTGCAGTCAATCCGAGCCTCATGGGGCTGACGC 3'
LtsmallTim/as1	5' TCACATTTTACCCGCTGCTGCGTCTTTCATCCACTGATACGG 3'
LtsmallTim/BamHI/s1	5' GACTGGATCCATGCAGCCGGTGCAGTCAATCC 3'
LtsmallTim/Spel/as1	5' GACTACTAGTCAATTTACCCGCTGCTGCGTCTTTC 3'

pQE30 ScGrx7	ScGrx7 (<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II) ab Aminosäure V34, N-terminaler His-Tag	N. Mesecke [158]
pQE30 ScGrx8	ScGrx8 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), N-terminaler His-Tag	M. Deponte [157]
pQE30 ScGrx8 ^{C25S}	ScGrx8 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), Punktmutation C25S, N-terminaler His-Tag	Diese Arbeit [157]
pQE30 ScGrx8 ^{C28S}	ScGrx8 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III), Punktmutation C28S, N-terminaler His-Tag	Diese Arbeit [157]
pQE30 LtErv ₁₋₁₁₉	LtErv Erv-Domäne, N-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ₁₂₃₋₃₁₄	LtErv Kinetoplastid-Domäne, N-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pQE30 LtErv	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C17S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C17S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C63S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C63S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C66S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C66S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C92S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C92S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C109S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C109S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C300S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C300S	Diese Arbeit
pQE30 LtErv ^{C304S}	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) N-terminaler His-Tag, Punktmutation C304S	Diese Arbeit
pX	Amp, NeoR, C-terminaler TAP Tag	L. Simpson [194]
pX LtErv	LtErv-CBP-mDHFR (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pX LtErv His	LtErv-CBP-mDHFR-His ₈ (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I) , C-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pX LtErv Flag	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Mfe</i> I) C-terminaler Flag-Tag	M. Deponte
pX LtErv TAP	LtErv (<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I) C-terminaler TAP-Flag-Tag	M. Deponte
pX LtHsp60 ₁	LtHsp60-CBP-mDHFR (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pX LtHsp60 ₁ His	LtHsp60-CBP-mDHFR-His ₈ (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I) , C-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pX LtHsp60 ₂	LtHsp60-CBP ₂ -mDHFR (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pX LtHsp60 ₂ His	LtHsp60-CBP ₂ -mDHFR-His ₈ (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I) , C-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pX LtsmallTim1 Flag	Lt smallTim1 (<i>Bam</i> HI/ <i>Mfe</i> I) C-terminaler Flag-Tag	M. Deponte
pX LtsmallTim1 TAP	Lt smallTim1 (<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I) C-terminaler TAP-Flag-Tag	M. Deponte
pX LtsTim	LtsTim-CBP-mDHFR (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pX LtsTim1 His	LtsTim1-CBP-mDHFR-His ₈ (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I) , C-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pX LtTim17 Flag	Lt Tim17 (<i>Bam</i> HI/ <i>Mfe</i> I) C-terminaler Flag-Tag	M. Deponte
pX LtTim17 TAP	Lt Tim17 (<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I) C-terminaler TAP-Flag-Tag	M. Deponte
pX LtTob55 Flag	Lt Tob55 (<i>Bam</i> HI/ <i>Mfe</i> I) C-terminaler Flag-Tag	M. Deponte
pX LtTob55 TAP	LtTob55 (<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I) C-terminaler TAP-Flag-Tag	M. Deponte
pX LtTom40 Flag	Lt Tom40 (<i>Bam</i> HI/ <i>Mfe</i> I) C-terminaler Flag-Tag	M. Deponte
pX LtTom40 TAP	Lt Tom40 (<i>Bam</i> HI/ <i>Spe</i> I) C-terminaler TAP-Flag-Tag	M. Deponte
pYX 232	Amp, 2 μ , TRP, TPI-Promoter	Invitrogen
pYX232 LtErv	LtErv (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	Diese Arbeit
pYX232 ScErv	ScErv1 (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	N. Mesecke [61]

Tabelle 5

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse [195]. Dazu wurde eine Einzelkolonie in 3 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Medium bei 37 °C über Nacht angezogen. Ein Volumen von 2 ml der Kultur wurde zentrifugiert (21000 g, RT, 1 min) und das Zellpellet in 100 μ l P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 μ l P2-Puffer zugegeben, die Probe durch fünfmaliges Invertieren gemischt, und die alkalische Lyse nach vollständiger Lyse der Zellen (maximal 7 min) durch Zugabe von 150 μ l P3-Puffer gestoppt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (21000 g, 4 °C, 10 min) abgetrennt, der klare Überstand abgenommen und die DNS durch Zugabe von 600 μ l 100 % Isopropanol gefällt. Die DNS wurde durch Zentrifugation (21000 g, 4 °C, 10 min) pelletiert und das Pellet mit

600 µl 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Die Zentrifugation wurde für 5 min wiederholt, die DNS unter Rotlicht für ca. 15 min getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O_{dd} gelöst. Alle Konstrukte wurden vor der Verwendung durch Sequenzieren kontrolliert.

LB Medium: 10 g/L Bacto Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, je nach Plasmid wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin versetzt.

P1-Puffer: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,1 mg/ml RNase A (Lagerung 4 °C)

P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat/HAc, pH 5,2 (Lagerung 4 °C)

2.2.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um spezifische DNS-Fragmente zu amplifizieren oder Punktmutationen in einen DNS-Strang einzuführen. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl Template, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, dNTPs, Puffer und Polymerase nach Angaben des Herstellers gemischt. Für die Amplifikation von DNS-Fragmenten größer als 500 bp bzw. bei Verwendung von genomischer- und cDNS als Template, wurde eine Polymerase mit Proofreading-Aktivität verwendet. Um Fehlbindungen der Primer zu verhindern, wurde die PCR auf Eis pipettiert und in den vorgeheizten Thermozykler gegeben. Nach einem einzelnen initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min wurden 20-30 Zyklen von Denaturierung (94 °C, 30 sec), Anlagerung (Temperatur primerbedingt, 30 sec) und Verlängerung (68-72 °C, Dauer polymerasebedingt) durchgeführt. Abschließend erfolgte ein finaler Schritt, bei welchem die Verlängerungszeit verdoppelt wurde. Variationen ergaben sich aus den Angaben des Herstellers und der Schmelztemperatur der Primer die nach folgender Formel bestimmt wurde:

$$T_m = 4 \times N(G,C) + 2 \times N(A,T) - 5 \text{ °C}$$

2.2.3 Reinigung von DNS mittels Mikrozentrifugationsröhrchen

PCR-Produkte und DNS-Verdaue wurden mit dem Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System nach Angaben des Herstellers gereinigt. Um DNS-Verluste zu verringern, wurde die Elution in zwei Inkubations- und Zentrifugationsschritten durchgeführt.

2.2.4 Restriktionsverdau von DNS

Der Restriktionsverdau von DNS wurde mit Enzymen und den entsprechenden Puffern von New England Biolabs durchgeführt. Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1 µg Plasmid-DNS in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 4-20 U Enzym, dem passenden Puffer und den nötigen Zusätzen versetzt und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsverdau-reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Dazu wurden 40 µl PCR Ansatz oder 1-5 µg Plasmid-DNS für 1-2 h mit einem Enzym bzw. 4-5 h mit zwei Enzymen inkubiert. Der ideale Puffer für den Doppelverdau wurde anhand der Herstellerangaben bestimmt. Die Verdaue wurden zum einen mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, zum anderen mit dem Promega Wizard® Gel and PCR Clean-Up System gereinigt.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse und Aufreinigung von DNS-Fragmenten erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde die DNS mit 6x Ladebuffer versetzt und je nach Größe der DNS auf 1-2 % Agarosegele mit 1 µg/ml Ethidiumbromid geladen. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, wurden ebenfalls DNS Größenstandards (100 bp bzw. 1 kb DNS-Leiter) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm (bezogen auf den Abstand der Elektroden). Die DNS wurde mit UV-Licht auf dem Transilluminator detektiert.

1x TAE: 40 mM Tris/HAc, 1 mM EDTA, pH 7,6

6x Ladebuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Orange G, 40 % (v/v) Glycerin

2.2.6 Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation von DNS-Fragmenten wurde T4-DNS-Ligase verwendet. In der Reaktion wurden 50 µg Plasmid-DNS eingesetzt. Das molare Verhältnis von Insert zu Plasmid betrug 10:1 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 10 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Das Gesamtvolumen betrug 20 µl. Die Inkubation erfolgte für 4-5 h bzw. üN bei 16 bzw. 4 °C.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNS

2.2.7.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von DNS-Proben zu ermitteln, wurden die Absorptionen bei 280 nm und 260 nm gemessen und die Konzentration über den Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer Gesetz bestimmt ($1A_{260}$ Unit dsDNS=50 µg/ml). Die Reinheit der DNS wurde anhand des Quotienten von $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ abgeschätzt. Dabei zeigen Werte deutlich unter 1,8 eine Verunreinigung mit Protein oder aromatischen Verbindungen und Werte deutlich über 2,0 eine Verunreinigung mit RNS an.

2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese

Eine weitere Methode zur Bestimmung der DNS-Konzentration war die Auftragung linearer Fragmente auf ein Agarosegel. Nach der Auftrennung der DNS-Fragmente wurde die Konzentration durch Vergleich der Bandenintensität mit den Markerbanden bekannter Konzentration ermittelt.

2.2.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Alle Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden vor Gebrauch entweder steril filtriert oder autoklaviert. *E. coli* XL1-Blue wurde in Anwesenheit von 10 g/ml Tetracyclin angezogen, während *E. coli* BL-21 ohne Antibiotikum inkubiert wurde.

2.2.8.1 Chemisch kompetente Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 250 ml LB mit dem entsprechenden Stamm inokkuliert und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert.

Die Zellen wurden für 5 min in einem Eis-Wasser-Gemisch gekühlt, in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher gegeben und abzentrifugiert (2600 g, 4 °C, 5 min). Das Pellet wurde in 75 ml eiskaltem TFB I resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem TFB II resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die in 50 µl aliquotierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB I: 30 mM Kaliumacetat/HAc pH 5,8, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin
TFB II: 10 mM HEPES/KOH pH 6,5, 10 mM RbCl, 15 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

2.2.8.2 Elektrokompetente Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 100 ml LB mit dem entsprechenden Stamm inokkuliert und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min in einem Eis-Wasser-Gemisch gekühlt, in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher gegeben und abzentrifugiert (2600 g, 4 °C, 5 min). Das Pellet wurde zweimal in 100 ml eiskaltem H₂O_{dd} gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.9 Transformation und Selektion von *E. coli*

2.2.9.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschritt von 45 sec bei 42 °C, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Selektion erfolgte durch 16 h Inkubation auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C.

SOC Medium: 5 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Trypton, 0,6 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

LB Agar: 10 g/L Bacto Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/L Agar, nach Bedarf wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin versetzt.

2.2.9.2 Transformation elektrokompetenter Zellen

Für die Elektroporation von *E. coli* wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5-1 µl Plasmid-DNS versetzt und in sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand überführt. Nach der Elektroporation (I: 2,5 kV, R: 400 Ω, Kapazität: 25 µF) wurden 500 µl SOC Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Die Selektion erfolgte durch 16 h Inkubation auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum.

2.3 Methoden der Hefekultur und Genetik

2.3.1 Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303a	<i>ade2-1 his3-1,155 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Rothstein [196]
YPH499 a	<i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1</i>	Sikorski und Hieter [197]
YPH501ΔErv1	<i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, erv1:His3 [pRS426MET25ScErv1, URA3]</i>	Mesecke
YPH501ΔErv1, ScErv1	<i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, erv1:His3 [pRS426MET25ScErv1, URA3], [pYX232, ScErv1]</i>	Diese Arbeit
YPH501ΔErv1, LtErv	<i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, erv1:His3 [pRS426MET25ScErv1, URA3], [pYX232, LtErv]</i>	Diese Arbeit
YPH501ΔErv1, pYX232	<i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, erv1:His3 [pRS426MET25ScErv1, URA3], [pYX232, ScErv1]</i>	Diese Arbeit

Tabelle 6

2.3.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Flüssigkulturen erfolgte, falls nicht anders vermerkt, bei 30 °C, 140 rpm in verschiedenen Voll-, bzw. S (Selektiv)-Medien. Als Kohlenstoffquelle diente je nach Bedarf Glucose, Galactose oder Lactat. Auxotrophe Mutanten wurden in mit entsprechenden Markern komplettiertem S-Medium [198] angezogen. Die Lagerung von Flüssigkulturen erfolgte in 15 % (v/v) Glycerin bei -80 °C. Das Auftauen erfolgte durch Ausstreichen kleiner Mengen der gefrorenen Kultur auf selektiven Agarplatten und anschließender Inkubation für 2-3 Tage bei 30 °C. Die Platten wurden bei 4 °C für mehrere Monate gelagert und einzelne Kolonien für die Inokulation von Flüssigkulturen verwendet.

YP Medium: 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton, pH 5,5 mit HCl, 2 % (w/v) Glucose (YPD), bzw. 2 % (w/v) Galactose (YP_{Gal})

Lactat Medium: 3 g/L Hefeextrakt, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L NH₂PO₄, 0,5 g/L CaCl₂, 0,5 g/L NaCl, 0,6 g/L MgSO₄, 0,3 mg/L FeCl₃, 2 % (v/v) Lactat/KOH, pH 5,5

S-(Selektiv) Medium: 0,17 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5 % (w/v) (NH₄)₂ SO₄, 2 % Glucose (S_D), bzw. 0,1 % (w/v) Glucose mit 2 % (w/v) Galactose (S_{Gal}). Je nach Bedarf wurde das S-Medium mit folgenden Basen und Aminosäuren versetzt: 20 mg/L Adeninsulfat, 20 mg/L L-Uracil, 20 mg/L L-Tryptophan, 20 mg/L L-Histidin, 30 mg/L L-Leucin, 30 mg/L L-Lysin

2.3.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die zu transformierenden Stämme wurden auf Agarplatten angezogen und für 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Eine Spatelspitze der Zellen wurde in 1 ml H₂O resuspendiert und abzentrifugiert (21000 g, RT, 30 sec). Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert, erneut abzentrifugiert und mit 240 µl sterilem 50 % Polyethylen-glycol 3350 überschichtet. Darauf wurden 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl Lachssperma-DNS (10 mg/ml) sowie die zu transformierende Plasmid-DNS (5-10 µl) und 65 µl H₂O abzüglich des Plasmidvolumens pipettiert und für 1 min bei maximaler Einstellung gevortext. Anschließend wurde die Probe für 20 min bei 42 °C inkubiert und die Zellen daraufhin abzentrifugiert (21000 g, RT, 10 sec). Das Zellpellet wurde durch vorsichtiges Pipettieren in 200 µl sterilem H₂O aufgenommen und auf Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für mehrere Tage bei 30 °C, bis deutliche Einzelkolonien zu erkennen waren. Die Lagerung erfolgte auf der Platte bei 4 °C bzw. als Kryoflüssigkultur bei -80 °C.

2.3.4 Wachstumsphänotypanalyse von *S. cerevisiae*

Um den Einfluss genetischer Veränderungen auf den Organismus zu untersuchen, wurden die entsprechenden Stämme in 20 ml Flüssigmedium üN angezogen, die Kultur morgens auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 weiter bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von exakt 1,0 eingestellt und daraus Verdünnungsreihen in 1:10 Verdünnungsschritten erstellt. Ein 10 µl Aliquot der Verdünnungsansätze wurde auf Agarplatten mit und ohne entsprechenden Selektionsmarker aufgetragen und je eine Platte bei 24, 30 und 37 °C inkubiert, bis deutliche Kolonien erkennbar waren.

2.3.5 Komplementationsstudien in *S. cerevisiae*

Um die funktionelle Komplementation essentieller homologer Proteine zu testen, wurde das zu untersuchende Hefegen auf einem Plasmid eingeführt und die endogene Kopie durch eine Markerkassette ersetzt. Das Plasmid trug zudem das Gen *URA3* für Orotidin 5-Phosphat Decarboxylase. Das homologe Gen wurde mittels eines weiteren Plasmides in den Organismus eingeführt. Die Klone wurden wie unter 2.3.4 beschrieben angezogen und auf Agarplatten mit und ohne 1 g/L 5-Fluororotat (5-FOA) aufgetragen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 24, 30 und 37 °C wurde das Wachstum kontrolliert. Eine abschließende Begutachtung des Wachstums erfolgte nach bis zu 20 d Inkubation.

2.4 Methoden der *Leishmania tarentolae* Kultur und Genetik

2.4.1 Verwendete *L. tarentolae* Stämme

In dieser Arbeit wurde der *Leishmania tarentolae* UCLA WT Stamm von André Schneider verwendet.

2.4.2 Kultivierung von *L. tarentolae*

Die Kultivierung von *L. tarentolae* Promastigoten erfolgte in BHI-Flüssigmedium. Bei Bedarf wurde dem Medium 0,01 % (w/v) G418 als Selektionsmarker zugegeben. Die Kulturen wurden bei 27 °C, Rotationsstufe 50 % der maximalen Geschwindigkeit kultiviert. Die Zelldichte wurde täglich bestimmt und die Kultur so verdünnt, dass eine Zelldichte von 1×10^8 Z/ml nicht überschritten wurde. Die Verdoppelungszeit betrug 7-12 h.

BHI Medium: 37 g/L BHI Medium, 10 mg/L Hämin

2.4.3 Anlegen von *L. tarentolae* Kryokulturen

L. tarentolae Stammkulturen wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden 0,7 ml in der logarithmischen Phase befindlicher Kultur ($5-9 \times 10^7$ Zellen/ml) in Kryogefäßen mit 0,7 ml sterilfiltriertem BHI, 30 % Glycerin versetzt. Die Gefäße wurden in Papiere eingeschlagen und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryokulturgefäße in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

BHI Gefriermedium: 37 g/L BHI Medium, 30 % (v/v) Glycerin, 10 mg/L Hämin

2.4.4 Auftauen von *L. tarentolae* Kryokulturen

L. tarentolae Kryogefäße (2.4.3) wurden im Wasserbad auf 27 °C erwärmt, in 10 ml BHI gegeben und abzentrifugiert (1500 g, 25 °C, 10 min), um das Glycerin zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem BHI-Medium aufgenommen und in Kulturflaschen bei 27 °C stehend für 48 h inkubiert. Falls eine Selektion erforderlich war, wurde den Kulturen erst nach 24 h Inkubation G418 zugegeben. Nach 48 h wurden die Kulturen nach Standardprotokoll weiterbehandelt.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von *L. tarentolae* Kulturen

Um die Konzentration von *L. tarentolae* Kulturen zu bestimmen wurden diese 1:1 mit Fixierungslösung versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden gründlich resuspendiert, in eine Neubauer Zählkammer gegeben, 10 min zum Absetzen der Zellen stehen gelassen und die Zellzahl bestimmt.

Fixierungslösung: 10 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,15 M NaCl, 15 mM Na₃Citrat, NaOH, pH 7,4

2.4.6 Transfektion von *L. tarentolae*

Leishmanien in der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 5×10^7 Z/ml) wurden mit Plasmid-DNS transfiziert. Dazu wurden 5×10^7 Zellen in sterilen Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (1500 g, RT, 3 min), mit 1 ml Transfektionspuffer gewaschen und in 100 µl Nucleofector Lösung (Amaxa® Basic *Parasite Nucleofector*® Kit) resuspendiert. Pro Ansatz wurden 10 µl DNS einer Konzentration von 1-3 µg/µl zugegeben, die Suspension in Transfektionsküvetten überführt und im Nucleofector mit Program U-033 transfiziert. Die Zellen wurden sofort mit 500 µl temperiertem BHI Medium versetzt und in 9,5 ml Medium überführt. Anschließend wurde die Kultur üN bei 27 °C stehend inkubiert, zentrifugiert (1500 g, RT, 10 min) und auf sehr feuchte BHI-Agar Platten mit entsprechendem Selektionsmarker (G418, 40 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden luftdicht mit Parafilm oder in Plastiktüten verpackt, um Feuchtigkeitsverlust zu vermindern. Die Kolonien wuchsen nach 2-3 Wochen Inkubation bei 27 °C.

Transfektionspuffer: 21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM NaH₂PO₄, 6 mM Glucose, pH 7,4

BHI-Agar: 3,7 % (w/v) BHI-Pulver, 0,08 % (w/v) Folsäure, 0,8 % (w/v) Agar, 10 % (v/v) FCS, 40 mg/ml Hämin

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von Mitochondrien aus *L. tarentolae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus *L. tarentolae* Zellen erfolgte nach Eckers [190]. Für die Isolierung von Mitochondrien aus *L. tarentolae* wurden promastigote Zellen die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($5-9 \times 10^6$ Z/ml) geerntet (4000 g, 4 °C, 10 min) und in 250 ml eiskaltem SET-Puffer pro Liter Kultur gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 0,83 ml frischem, mit complete EDTA free versetztem, DTE-Puffer pro 1×10^9 Zellen resuspendiert, hypotonisch geschwollen und durch Scheren mit einer Nadel (0,4 mm Ø) bei 6 bar aufgeschlossen. Das Lysat

wurde sofort mit 7,5 % (w/v) Saccharose supplementiert und zentrifugiert (16000 g, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 5 ml STM pro 30 ml Lysat resuspendiert, mit 1 M MgCl₂ bis zu einer finalen Konzentration von 3 mM versetzt und mit 30 U/ml DNaseI für 45 min verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Volumina STE gestoppt und die Suspension zentrifugiert (16000 g, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 4 ml 50 % Histodenz pro Liter Kultur resuspendiert, unter einen Histodenzgradienten (31,6 %, 28,3 %, 25 %, 21,7 %) geladen und zentrifugiert (103864 g, 4 °C, 2 h). Die Mitochondrienfraktion wurde mit einer Nadel aus dem Gradienten entfernt, in 5 Volumina STE verdünnt und pelletiert (32500 g, 4 °C, 10 min). Die Mitochondrien wurden in 0,25 ml STE pro Liter Kultur resuspendiert und die Proteinkonzentration nach Bradford (2.6.1) bestimmt. Die Reinigungsschritte wurden mikroskopisch verfolgt.

SET: 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,9

DTE: 1 mM EDTA, 1 mM Tris pH 7,9

STM: 0,25 M Saccharose, 2 mM MgCl₂ 20 mM Tris pH 7,9

STE: 0,25 M Saccharose, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,9

x % Histodenz: x % (w/v) Histodenz, 0,25 M Saccharose, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,9

2.5.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte weitgehend nach Daum [199]. Hefezellen wurden bei 30 °C entweder in Lactat Medium (W303, YPH499) oder S_D Selektivmedium mit entsprechenden Selektionsmarkern (Transformanden) über mehrere Tage in der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, was durch mehrmalige Verdünnung und simultane Erhöhung des Kulturvolumens erfolgte. Dabei überstieg die OD₆₀₀ der Kultur nie 1,5. Die Ernte erfolgte sobald 4-10 L Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8-1,5 erreichten. Die Zellen wurden zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 5 min), in 0,5 L H₂O pro 2 L Kultur gewaschen und erneut zentrifugiert (1500 g, RT, 5 min). Nach Bestimmung des Zellgewichts wurden die Zellen in 2 ml PufferA je 1 g Feuchtwicht resuspendiert und unter leichtem Schütteln (140 rpm) für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 1 ml PufferB je 0,15 g Feuchtwicht resuspendiert. Die Lyse der Zellwände erfolgte durch Zugabe von 1 ml PufferC pro 0,15 g Feuchtwicht und Inkubation bei 30 °C unter leichtem Schütteln für 30-60 min. Die Lyse wurde durch hypotones Schwellen eines Aliquots in Wasser kontrolliert. Dabei wurde ein Tropfen der Zellsuspension in 1 ml H₂O gegeben und sofort die OD₆₀₀ gemessen. Die Zellwände waren lysiert wenn die OD₆₀₀ innerhalb von 30 sec stark abnahm. Ab diesem Punkt wurden eiskalte Puffer verwendet und alle Schritte auf Eis durchgeführt. Für den Aufschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 g, 5 min), das Pellet in 1 ml PufferD je 0,15 g Feuchtwicht resuspendiert und die Suspension in einem Glashomogenisator (60 ml für PTFE Kolben, Sartorius) 10x auf und ab homogenisiert. Anschließend wurde das Volumen mit PufferD verdoppelt und die Zellen erneut 10x homogenisiert. Die Abtrennung großer Zellfragmente erfolgte durch Zentrifugation (2000 g, 2 °C, 5 min). Die Zentrifugation des Überstandes wurde wiederholt und dieser anschließend erneut zentrifugiert (13000 g, 12 min). Das Mitochondrienpellet wurde in 10 ml SH Puffer resuspendiert und zentrifugiert (2000 g, 5 min) und nochmals in 10 ml SH-Puffer resuspendiert und pelletiert (13000 g, 12 min). Die Mitochondrien wurden in 100 µl SH Puffer je 1 g Feuchtwicht resuspendiert, und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (2.6.1) bestimmt. Die aliquotierten Mitochondrien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert.

PufferA: 100 mM Tris/Base, 10 mM DTT

PufferB: 1,2 M Sorbitol, 20 mM $K_xH_xPO_4$, pH 7,4

PufferC: 1,2 M Sorbitol, 20 mM $K_xH_xPO_4$, pH 7,4, 6 mg Zymolyase 20T /1 g Zellgewicht

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

SH Puffer: 20 mM HEPES, 0,6 M Sorbitol, pH 7,2)

2.5.3 Subfraktionierung von Mitochondrien

2.5.3.1 Alkalische Proteinextraktion

Die Membranassoziation mitochondrialer Proteine wurde mittels alkalischer Extraktion untersucht [190]. Dazu wurden zwei Proben je 50-100 μ g isolierte Mitochondrien bei 12000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das eine Mitochondrienpellet wurde als "komplett Kontrolle" direkt in 20 μ l 1x Laemmli Puffer + β -Mercaptoethanol (2.6.3) aufgenommen. Das andere Mitochondrienpellet wurde in 50 μ l 20 mM Tris, pH 7,2 resuspendiert. Zu diesem Pellet wurden 50 μ l frisch in Wasser angesetztes Natriumcarbonat (200 mM) gegeben, die Suspension 15 sec gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (125000 g, 4 °C, 30 min). Das Membranpellet wurde in 20 μ l 1x Laemmli Puffer (2.6.3) aufgenommen, die im Überstand enthaltenen Proteine denaturierend gefällt (2.6.2) und in der gleichen Menge 1x Laemmli Puffer aufgenommen. Äquivalente Volumina der Proben wurden mittels Westernblot (2.6.6) analysiert.

2.5.3.2 Mitoplasten und Proteasesuszeptibilitätsassay

Um Proteine in isolierten Mitochondrien zu lokalisieren, wurde deren Zugänglichkeit für proteolytischen Verdau durch Proteinase K (PK) untersucht [190]. In vier verschiedenen Ansätzen wurden unterschiedliche Mitochondrienkompartimente durch hypotones Schwellen bzw. Denaturierung mit TritonX-100 zugänglich gemacht. Je 100 μ g Mitochondrien wurden 1 min bei 21000 g und 4 °C abzentrifugiert, zwei Mitochondrienpellets in je 500 μ l ST-Puffer, eines in Tris- und eines in TX-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde die OM der Mitochondrien in Tris-Puffer durch Schwellen geöffnet, bzw. wurden alle Membranen in TX-Puffer solubilisiert. Eine ST Probe verblieb unbehandelt als Referenz, während die anderen Proben mit 5 μ l PK versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5 μ l PMSF gestoppt, und die Proben wurden weitere 5 min auf Eis inkubiert. Mitochondrienfragmente aller Proben wurden dann abzentrifugiert (21000 g, 4 °C, 20 min) und in 500 μ l ST Puffer resuspendiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt (2.6.2), in je 20 μ l 1x Laemmli (2.6.3) aufgenommen und 5 min auf 94 °C erhitzt. Die Analyse des Proteaseverdaus erfolgte mittels Westernblot (2.6.6).

ST: 20 mM Tris, pH 7,2, 0,6 M Sorbitol

Tris: 20 mM Tris, pH 7,2

TX: 20 mM Tris, pH 7,2, 1% (v/v) TritonX-100

PK: 10 mg/ml in H₂O

PMSF: 200 mM in wasserfreiem EtOH (-20 °C)

2.5.4 Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in Hefemitochondrien wurden diese mit homo- und heterodifunktionalen Crosslinkern (DSS, DSG, DFDNB, MBS) inkubiert. Dabei wurden sowohl die Crosslinker als auch die Reaktionsbedingungen variiert. Die im evakuierten Exsikkator gelagerten Crosslinker wurden erst kurz vor Verwendung in wasserfreiem DMSO gelöst, um die Inaktivierung der reaktiven Gruppen zu verhindern. Je Ansatz wurden 50 µg isolierte Mitochondrien zur Aktivierung in 100 µl Importpuffer S.c. (2.5.5) aufgenommen, für 3 min bei 25 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Ansätze wurden mit 400, 100 bzw. 20 µM Crosslinker versetzt, kurz gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Die aktiven Gruppen der Crosslinker wurden durch Zugabe von Glycin (finale Konzentration 130 mM) inaktiviert. Die Mitochondrien wurden in 500 ml SH Puffer (2.5.2) gewaschen, abzentrifugiert (21000 g, 4 °C, 10 min) und in 25 µl 1x Laemmli (5 % 2-ME) aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C aufgekocht und mittels Western Blot (2.6.6) analysiert.

Glycin: 1 M in H₂O

2.5.5 *In organello*-Import radioaktiv markierter Vorläuferproteine

Der Import radioaktiv markierter Vorstufenproteine (2.6.14) erfolgte in 100 µl Importpuffer mit 50-100 µg Mitochondrien aus Hefe (gelagert bei -80 °C) bzw. *L. tarentolae* (frisch). Isolierte Mitochondrien wurden mit 1-3 µl radioaktiv markierten Proteinen versetzt, und 1-45 min bei 25 °C inkubiert. Um das Membranpotential zu zerstören wurden separate Ansätze vor Zugabe der radioaktiv markierten Proteine mit 2 µl Valinomycin, 0,8 µl Oligomycin und 2 µl CCCP versetzt. Die Importreaktion wurde nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 400 µl kaltem SEMK80 gestoppt und die Proben auf Eis überführt. Die Ansätze wurden mit jeweils 5 µl PK versetzt, 15 min inkubiert, mit 5 µl PMSF versetzt, 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (21000 g, 4 °C, 15 min). Das Mitochondrienpellet wurde mit 20 µl 1x Laemmli (2.6.3) versetzt und unter Schütteln gelöst. Die Analyse der Proben erfolgt mittels Western Blot (2.6.6).

ImportPuffer L.t.: 50 mM MOPS, pH 7,2, 1 mg/ml BSA, 0,6 M Sorbitol, 75 mM KCl, 2,5 mM MnCl₂, 10 mM MgAc, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 5 mM NADH, 0,08 mg/ml Creatinkinase, 6 mM Phosphocreatin, 1 mM ATP, 5 mM Succinat

ImportPuffer S.c.: 50 mM HEPES pH 7,2, 1 mg/ml BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM MgAc, 2 mM K₃PO₄, 2,5 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 2 mM NADH, 0,1 mg/ml Creatinkinase, 6 mM Phosphocreatin, 2 mM ATP

SEMK80: 10 mM MOPS, pH 7,2, 250 mM Succrose, 1 mM EDTA, 80 mM KCl

PK: 10 mg/ml in H₂O

PMSF: 200 mM in 100 % EtOH

Valinomycin: 0,1 mM in 100 % EtOH

Oligomycin: 2 mM in 100 % EtOH

CCCP: 2,5 mM in H₂O 25 % DMSO

2.5.6 Elektronenmikroskopie von *L. tarentolae*

Die Fixierung von logarithmischen *L. tarentolae* Promastigen (ca. 5x10⁷ Z/ml) erfolgte nach Tokuyashu [200]. Für die Fixierung wurden ca. 4 ml Zellen abzentrifugiert (1500 g, RT, 15 min), das Zellpellet in einer seinem Volumen gleichen Menge an Fix1 resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pellettiert, in 2 ml Fix2 resus-

pendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in 2 ml PBS gewaschen und anschließend freie Aldehydgruppen durch 10 min Inkubation in Glycin geblockt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml 37 °C warmer Gelatine resuspendiert, ca. 4 sec bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge abzentrifugiert und erneut in einem kleinen Volumen Gelatine resuspendiert. Um Blasen zu entfernen, wurde die Probe weitere 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 1 h auf Eis gestellt, um die Gelatine erstarren zu lassen. Die Gelatine wurde in kleine Blöcke geschnitten, in Succrose inkubiert und nach dem Aufbringen auf Pins in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von den Blöcken wurden mit einem Leica EM UC6 Ultramicrotome 100 nm dicke Sektionen geschnitten, welche auf mit Carbon beschichtete Kupfersiebe aufgebracht und getrocknet wurden. Um die Gelatine zu entfernen wurden die Gitter mit der Probe nach unten auf 37 °C warme 2 % Gelatine PBS aufgelegt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Gitter nacheinander auf fünf Glycin Tropfen aufgelegt und jeweils 15 min inkubiert. Freie Bindungen der Proben wurden durch 30 min Inkubation auf Block-Lösung geblockt, woraufhin die Gitter auf 5 Tropfen PBS je 5 min gewaschen wurden. Die Gitter wurden für 30 min auf in Block-Lösung verdünnten Erstantikörper tropfen inkubiert und anschließend erneut in PBS gewaschen. Äquivalent erfolgte die Inkubation mit Protein A Gold (10 nm Ø, 1:70 Verdünnung in Block-Lösung). Die Waschschriffe wurden erneut wiederholt und anschließend zehn Waschschriffe von je 2 min auf H₂O Tropfen durchgeführt. Die letzten 3 Tropfen waren Eis gekühlt. Die Kontrastierung erfolgte durch kurzes Auflegen der Proben auf 2 Tropfen gekühltes Uranylacetat und 7 min Inkubation auf einem dritten Tropfen Uranylacetat. Anschließend wurden die Gitter für 10 min bei RT getrocknet. Die Bilder wurden an FEI-F30 und Zeiss 900 EM Elektronenmikroskopen mit einer Slow-Scan 2kx2k CCD Kamera aufgenommen.

Fix1: 8 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,2 % (w/v) Glutaraldehyd in 120 mM Pipes, 50 mM Hepes, 4 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, pH 6,9

Fix2: 4 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,1 % (w/v) Glutaraldehyd in 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 6,9

PBS: 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 2,68 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄/HCL, pH7,4

Glycin: 50 mM Glycin in PBS

Gelatine: 10 % (w/v) in PBS

Succrose: 2,3 M Succrose in PBS

Block-Lösung: 0,8 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) Fischhautgelatine, 1 % (w/v) Glutaraldehyd, 50 mM Glycin, PBS

Uranylacetat: 0,45 % (w/v) Uranylacetat, 1,7 % (w/v) Methylcellulose in H₂O

2.5.7 Immunfluoreszenzanalyse von *L. tarentolae*

Für die Markierung bestimmter Leishmanienproteine wurden pro Probe 5x10⁶ Zellen abzentrifugiert (1500 g, RT, 15 min) und in 1 ml PBS gewaschen. In speziellen Fällen wurden die Zellen anschließend für 20 min in mit 1 µM Mitotracker versetztem BHI-Medium inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Das Pellet wurde in 4 % PFA resuspendiert und die Zellen bei RT für 20 min unter Schütteln fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 min mit 1 ml PBS gewaschen (I) und die Membranen unter Schwenken für 15 min in 1 ml 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen (II) und für 30 min mit 1 ml 3 % BSA geblockt. Die Markierung mit 1:10 und 1:100 in 3 % BSA verdünnten Antikörpern erfolgte für 1 h bei RT. Nach Wiederholung der Waschschriffe (III) wurden die Zellen im

Dunkeln für 1 h mit 200 µl 1:3000 in PBS verdünntem AlexaFluor 495 α rabbit inkubiert. Anschließend wurde 10 µg/ml Hoechst zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben und die Zellen erneut für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden wie zuvor gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert, 5 min bei 3000 g auf Deckgläschen aufzentrifugiert und in Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Bei den Schritten I-III wurden Kontrollen entnommen und ebenfalls eingebettet. Für alternative Fixierungen mit Lösungsmitteln wurden die Zellen in einer dünnen Schicht auf Deckgläser aufgebracht, getrocknet und für 15 min in -20 °C kaltem Lösungsmittel fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser getrocknet und in Mowiol eingebettet. Die verwendeten Lösungsmittel waren: 100 % Aceton, 100 % Methanol, 20 % (v/v) Aceton mit 80 % (v/v) Ethanol. Die Auswertung erfolgte einerseits an einem Zeiss Axiovert200M mit der Software Axiovision, andererseits an einem Zeiss LSM780 und der Software ZEN 2010. Folgende Filter wurden für das Axiovert200M verwendet:

Filter	Nr.	Anregung	Strahlteiler	Emission
Dapi	49	G365	FT395	BP445/50
Rot	20	BP546/12	FT560	BP575-640
GFP	37	BP450/50	FT480	BP510/50

Tabelle 7

4 % PFA: 4 % (w/v) PFA in PBS

0,1 % Triton X-100: 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

3 % BSA: 3 % (w/v) BSA in PBS

Mowiol: 25 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) Mowiol, 100 mM Tris/HCl pH 8,5

Hoechst: 10 mg/ml Hoechst 3342

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration von Proteinproben wurde modifiziert nach Bradford [201] bestimmt. Eine Kalibriergerade mit 0-14 µg/ml BSA wurde für jede Messung erstellt. Die Küvetten wurden mit 800 µl H₂O abzüglich des Proteinlösungsvolumens befüllt, die Proteinlösungen zugegeben und die Reaktionen in 15 sec Abständen durch Zugabe von 200 µl Bradford Reagenz und gründlichem Mischen gestartet. Nach exakt 10 min Inkubation bei RT wurde die Absorption der einzelnen Probe bei 595 nm photometrisch bestimmt, wobei die Werte zwischen 0,1 und 1,0 lagen. Die Kalibrierkurve wurde in SigmaPlot hyperbolisch gefittet und damit die Kurvenparameter mit folgender Formel ermittelt.

$$y = a * x / (b + x)$$

Die Proteinkonzentration wurde aus der Absorption berechnet.

2.6.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 12 % (w/v) TCA) und anschließender Inkubation bei -80 °C für mindestens 30 min gefällt. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert (21000 g, 4 °C, 20 min) und das Pellet in 1 ml 100 % Aceton (-20 °C) resuspendiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, die Pellets anschließend bei offenem Deckel

für 15 min bei RT getrocknet, in 1x Laemmli Puffer (2.6.3) aufgenommen und bis zur vollständigen Resuspendierung geschüttelt.

TCA: 72 % (w/v) TCA in H₂O

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische wurden durch vertikale SDS PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Je nach Probenanzahl und Proteingröße wurden Minigele (10 Taschen, 8 cm x 6 cm x 0,1 cm) bzw. Standard Gele (bis zu 21 Taschen 14 cm x 9 cm x 0,1 cm) verwendet. [202]. Die Proben wurden mit 1x Laemmli versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Bei Bedarf wurde dem 1x Laemmli Puffer 5-30 % 2-ME zugefügt, um Disulfidbrücken zu spalten. Um die Neubildung von Disulfidbrücken während des Aufkochens zu verhindern, wurden die Proben teilweise vor der Zugabe von 1x Laemmli mit Iodacetamid (2 mM final) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 35 mA pro Gel. Anschließend wurden die Proteinbanden entweder mit Coomassie-Blau-Färbung (2.6.4) analysiert, oder mittels Westernblott (2.6.6) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

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

Trenngel: 10-20 % (w/v) Acrylamid, 0,1 % (w/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS (zur Polymerisation 0,05 % (w/v) APS und 0,15 % (v/v) TEMED)

Harnstoffgel: 20 % (w/v) Acrylamid, 0,27 % (w/v) Bisacrylamid, 4,17 mM NaCl, 0,625 M Tris, pH 8,8, 0,25 % (w/v) SDS, 0,364 g/ml Urea (zur Polymerisation 0,03 % (w/v) APS und 0,1 % (v/v) TEMED)

Bodengel: 1 % Agar in SDS-Laufpuffer

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3

1x Laemmli: 2 % (w/v) SDS, 0-30 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

2.6.4 Coomassie-Blau-Färbung

Der Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Blau (modifiziert nach Fairbanks [203]). Dazu wurde das Gel in Färbelösung gelegt, in der Mikrowelle kurz aufgekocht und unter Schwenken für 20 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, das Gel in Entfärbelösung erneut erhitzt und für 20 min unter Schwenken inkubiert. Dieser Schritt wurde bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes wiederholt. Das entfärbte Gel wurde mit der Kamera E.A.S.Y. 440 fotografiert und in Wasser gelagert.

Färbelösung: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,05 % (w/v) Coomassie Blau R bzw. G

Entfärbelösung: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig

2.6.5 Silberfärbung

Um Proteinbanden geringer Konzentration in SDS Gelen anzufärben wurde die Silberfärbung verwendet. Das SDS Gel wurde 30 min unter Schwenken in TCA-Fix und dann 30 min in Lösung 1 inkubiert. Anschließend wurde das Gel 20 min in Lösung 2 inkubiert. Das Gel wurde fünfmal für je 5 min in Wasser gewaschen und darauf in Lösung 3 bis zur gewünschten Intensität der Banden entwickelt. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser abgestoppt. Abgesehen von TCA-Fix wurden alle Lösungen vor Verwendung frisch angesetzt.

TCA-Fix: 24 % (w/v) TCA, 50 % Methanol

Lösung 1: 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Lösung 2: 1 g/L Natriumthiosulfat, 0,5 % (w/v) Glutaraldehyd,
Lösung 3: 0,075 % (w/v) NaOH, 0,35 % (v/v) NH₃, 0,8% (w/v) AgNO₃

2.6.6 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen bzw. zur Detektion radioaktiver Signale wurden die zuvor elektrophoretisch getrennten Proben aus dem Polyacryl-amidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [204]. Dazu wurden Whatmanpapiere sowie die Nitrozellulosemembran auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde auf die Nitrozellulosemembran und diese zwischen 2 Whatmanpapiere gelegt. Der Transfer erfolgte einerseits im Semidry-Verfahren bei 250 mA pro großem Gel für 1 h im Elektrolotter (Peqlab) bzw. bei 100 V pro kleinem Gel für 1 h im Wetblot-Verfahren in einem Tank (Bio-RadMini Trans Blot). Die Proteine wurden durch 5 min Inkubation in Ponceau-Lösung angefärbt, die Membran gescannt und durch kurzes Schwenken in H₂O entfärbt.

Transferpuffer (Wet-Blot): 20 % (v/v) Methanol, 150 mM Glycin, 20 mM Tris
Transferpuffer (Semi-Dry-Blot): 20 % (v/v) Methanol, 150 mM Glycin, 20 mM Tris,
 0,08 % (w/v) SDS
Ponceau-Lösung: 0,2 % (w/v) PonceauS, 3 % (w/v) Trichloressigsäure

2.6.7 Autoradiographische Detektion von Proteinen.

Nach dem Transfer radioaktiv markierter Proteine auf Nitrozellulose wurden diese ebenfalls mit Ponceau-Lösung angefärbt, die Membranen getrocknet, und die Strahlung für bis zu 8 Wochen mit Kodak Biomax MR Film detektiert.

2.6.8 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis der auf Nitrozellulose immobilisierten Proteine erfolgte durch Immundetektion. Dabei wurden freie Bindungen der Membran durch 1 h Inkubation in Milch (alle individuell gefertigten Antikörper) oder BSA (alle von Firmen bezogenen Standard Antikörper) blockiert. Der spezifische Primärantikörper wurde 1:500 – 1:10000 ebenfalls in Milch oder BSA verdünnt und die Membran für 1-2 h bei RT oder üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST/T und einmal mit TBS gewaschen und 1 h bei RT in 1:10000 mit Milch oder BSA verdünntem, HRP-konjugiertem Sekundärantikörper gegen Kaninchen bzw. Maus inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal in TBST/T und einmal mit TBS gewaschen und anschließend mit frisch mit H₂O₂ versetzter ECL Lösung benetzt. Die Lumineszenz wurde mit Fuji Röntgenfilm für 1 sec bis 30 min detektiert.

BSA: 3 % (w/v) BSA fettsäurefrei in TBS
Milch: 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
TBS: 10 mM Tris-HCl, 0,9 % (w/v) NaCl, pH 7,4
TBST/T: 10 mM Tris-HCl, 0,9 % (w/v) NaCl, pH 7,4, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100
ECL: 100 mM Tris pH 8,5, 33 µg/ml Coumarin, 220 µg/ml Luminol, 0,03 % H₂O₂

2.6.9 Expression und Reinigung rekombinater Proteine mit Ni-NTA

Für die Expression von Proteinen wurde eine LB_{Amp} Vorkultur mit einer *E. coli* Einzelkolonie beimpft und üN bei 37 °C (ScGrx6-8), bzw. 30 °C (LtErv) und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zwei Liter Medium in fünf Liter Kolben 1:20 (ScGrx6-8) bzw. 1:40 (LtErv) be-

impft. Im Fall von ScGrx6-8 wurde die Kultur bei 37 °C weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Für die Expression von LtErv wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 25 °C inkubiert und anschließend auf 16 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 für eine weitere Stunde inkubiert. In beiden Fällen wurde die Proteinexpression durch anschließende Zugabe von 0,5 mM (ScGrx6-8) bzw. 0,1 mM (LtErv) IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 4 h (ScGrx6-8) bzw. üN (LtErv). Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 min) und in eiskaltem Aufschlusspuffer gewaschen. Je nach Protein und Bedarf wurden die Pellets sofort verwendet oder bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden in 10 ml Aufschlusspuffer pro Pellet von 2 L Kultur resuspendiert (gefrorene Pellets für 1 h auf Eis gelöst), mit 10 mg/ml Lysozym und einer Spatelspitze DNaseI versetzt und für 1 h auf Eis gerührt. Der Zellaufschluss erfolgte durch sechs 10 sec Ultraschallpulse bei 70 % Power und Cycle 5, mit 10 sec Pause nach jedem Puls. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30500 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand bei Geschwindigkeit 10 der peristaltischen Pumpe P1 auf eine mit Aufschlusspuffer equilibrierte 1 ml Ni-NTA Säule gegeben. Das gebundene Protein wurde mit 10 SV Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Im Fall von LtErv wurde das Zelltrümmerpellet nochmals in 10 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, für 30 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert und erneut mit Ultraschall aufgeschlossen und über die Säule gereinigt, da viel Protein scheinbar membranassoziiert im Pellet verblieben war.

Aufschlusspuffer/Waschpuffer ScGrx6-8: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

Aufschlusspuffer LtErv: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,25 % (v/v) Tween-20, pH 8,5

Waschpuffer LtErv: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 67 mM Imidazol, 0,25 % (v/v) Tween-20, pH 8,0

Elutionspuffer Grx: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer LtErv: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 8,0

2.6.10 Analytische Gelfiltration

Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse der gereinigten rekombinanten Proteine erfolgte mit einer Hi Load 16/60 200 Superdex Gelfiltrationssäule. Die Kalibrierungsgeraden wurden mit HMW und LMW Gelfiltrationsstandards in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0 erstellt. Das Protein wurde vor der Auftragung abzentrifugiert (21000 g, 4 °C, 30 min), um Präzipitate zu entfernen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Unicorn 3,21. Die Größe der Proteine wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$k_{AV} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) = c - b \times \log Mw$$

$$\log Mw = (k_{AV} - c) / -b$$

2.6.11 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Die SPR wurde von Thorsten Pirch (Service Unit Bioanalytics, Mikrobiologie, LMU) durchgeführt. Rekombinantes ScGrx8 wurde wie in 2.6.9 beschrieben gereinigt, in SPR Puffer gepuffert, 1:1 mit NaAc verdünnt und auf den Sensorchip aufgebracht. Als Referenz diente eine nicht proteingekoppelte Zelle.

SPR-Puffer: 50 mM Na_xHPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,4

NaAc: 10 mM NaAc, pH 5,5

2.6.12 Metallionenanalyse

Der Metallionengehalt wurde von Helmut Hartl (Zentrale Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU) mittels optischer Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES) durchgeführt. Proteine wurden wie in 2.6.9 beschrieben gereinigt. Elutionspuffer diente als Negativkontrolle.

2.6.13 Proteinkristallisation

Die Kristallisationsexperimente im Sitting Drop Verfahren wurden mit frisch aufgereinigtem (2.6.9), rekombinanten ScGrx8, ScGrx8^{C28S} und ScGrx7 durchgeführt. Alle Proteine wurde mittels Gelfiltrationschromatographie in 10 mM Tris bzw. 10 mM Na_xH_xPO₄ Puffer, pH 8,0, weiter gereinigt und die Eluate in CentriPrep 10K Filtrationsröhrchen aufkonzentriert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation (186000 g, 4 °C, 30 min) des Eluats entfernt und anschließend die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Um geeignete Kristallisationsbedingungen zu bestimmen, wurden die Reservoirs von 96 Well Platten mit je 200 µl Puffer der entsprechenden NeXtal Suites befüllt, 1 µl Protein in unterschiedlichen Konzentrationen in die Platten pipettiert und mit je 1 µl der Pufferlösungen gemischt. Die Reservoirs wurden luftdicht mit Klebefolie verschlossen, und die Kristallisation erfolgte bei konstant 20 °C. Die Morphologie der Kristallansätze wurde sofort nach dem Pipettieren und anschließend in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Folgende NeXtalSuites wurden verwendet: Classics, Classics Lite, pH clear I, pH clear II, AmSO₄, PEG. Zusätzlich wurden die Proben mit Supplements versetzt.

2.6.14 *In vitro*-Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Alle Vorstufenproteine wurden mit TNT-Reticulozytenlysat nach dem Protokoll des Herstellers für 1 h bei 30 °C hergestellt. Als radioaktiver Marker wurde [³⁵S] Methionin verwendet. Als Template für die *in vitro* Translation dienten pGEM4 Konstrukte (Tabelle 5).

2.6.15 Pulldown-Assays

Pulldown von ScGrx8 Interaktionspartnern

Um potentielle Interaktionspartner von Hefeproteinen zu identifizieren, wurde frisch gereinigtes, rekombinantes ScGrx8 bzw. ScGrx8^{C28S} verwendet. Als Negativkontrolle diente ein Parallelansatz dem statt rekombinatem Protein Elutionspuffer zugefügt wurde. Sechs Liter YPD wurden mit W303 zu einer OD₆₀₀ von 0,025 angeimpft und üN bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 4,2 und 8,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 min) und in 600 ml P₀-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 35 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und in einer French Press 40K bei 22000 psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30500 g, 4 °C, 1 h), der Überstand mit 0,3 mg/ml Diamid versetzt und weitere Zellfragmente und Organellen abgetrennt (230000 g, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde mit aufgereinigtem Protein versetzt und üN bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Reinigung des an putative Interaktionspartner gekoppelten Proteins erfolgte wie in 2.6.9 beschrieben bei einer Flußgeschwindigkeit von 6. Der Waschpuffer wurde mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 versetzt. Die Eluate wurden mit 1x Laemmli mit und ohne 2-ME versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert.

P_x-Puffer: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, x mM Imidazol , pH 8,0

Aufschlusspuffer: 50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0, complete EDTA free Protease Inhibitor Mix

Pulldown von LtErv Interaktionspartnern

Um potentielle Interaktionspartner von LtErv zu identifizieren wurde am Vortag über Ni-NTA gereinigtes, His-getagtes LtErv verwendet. Eine 3 Liter *L. tarentolae* Kultur wurden bis zu einer Konzentration von $5 \cdot 9 \cdot 10^7$ Z/ml angezogen, durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 15 min) geerntet und in 0,05 ml TKM pro $1 \cdot 10^9$ Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 6x 10 sec, unterbrochen von 10 sec Pause, mit einer Intensität von 0,5 und 70 %, auf Eis sonifiziert. Die Zellfragmente wurden durch Ultrazentrifugation (151000 g, 4 °C, 30 min) abgetrennt, anschließend in der Hälfte des anfänglichen Volumens an TKM resuspendiert, erneut sonifiziert und nochmals zentrifugiert. Die beiden Ultrazentrifugations-Überstände wurden vereinigt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Ein Volumen von 150 µl Ni-NTA wurde mit 3 ml P₀-Puffer äquilibriert und mit 16-64 nmol am Vortag gereinigtem LtErv in P₂₀, beladen. Die Geschwindigkeit der peristaltischen Pumpe war 1. Anschließend wurde die Säule 3x mit 1 ml P₀-Puffer gewaschen. Eine weitere 150 µl Ni-NTA Säule wurde parallel behandelt, jedoch nicht mit Protein beladen und diente als Negativkontrolle. Je die Hälfte des Zellysates wurde auf eine Säule aufgetragen, für 1 h bei 4 °C inkubiert und diese anschließend mit 10 ml P₅₀-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch 10 min Inkubation mit 150 µl P₃₇₅-Puffer. Dieser Schritt wurde wiederholt. Um den Reinigungsverlauf zu kontrollieren wurden von jedem Schritt des Versuches Proben genommen, die einerseits mit 1x Laemmli mit 2-ME, andererseits mit 1x Laemmli mit 50 mM IAc versetzt wurden. Die Proben wurden mittels Westernblot (2.6.6) analysiert.

TKM: 20 mM Tris/HCl, 1 % (v/v) TritonX-100, pH 7,6

2.6.16 Immunoaffinitäts-Chromatographie

Diese Methode wurde verwendet, um Bindungspartner von LtErv zu identifizieren. Die Spezifität des Versuches wurde mittels zweier parallel durchgeführter Versuche kontrolliert, wobei ungekoppeltes Säulenmaterial als Negativkontrolle verwendet wurde. Ein Volumen von 10 µl (2,9 mg) CNBr-Sepharose wurde durch dreimalige Zugabe von 1 mM HCl aktiviert und anschließend mit 0,14 nmol Antikörper in Coupling Puffer für 2 h bei RT inkubiert. Da CNBr-Sepharose mit primären Aminen reagiert, wurde dieser Puffer gewählt. Das Säulenmaterial wurde bei 16100 g und RT für 30 sec abzentrifugiert und dreimal mit 100 µl Coupling Puffer und anschließend dreimal abwechselnd mit NaAc Puffer und Tris Puffer gewaschen. Isolierte Mitochondrien (1 mg) wurden abzentrifugiert (16100 g, 4 °C, 5 min) in 950 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 0,1 % (w/v) SDS und 0,5 % (w/v) DDM versetzt. Die Lyse erfolgte im Überkopfschüttler für 1,5 h bei 4 °C. Je 900 µl des Lysates wurden auf die vorbereiteten CNBr-Sepharosen gegeben und für 4 h im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (16000 g, 4 °C, 2 min) und dreimal mit 500 µl Lysepuffer mit 0,01 % (w/v) DDM und ohne Proteaseinhibitor gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, die Sepharose in 20 µl 1x Laemmli ohne 2-ME aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und dem Säulenmaterial 1 µl 2-ME zugegeben. Beide Laemmli

Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE (2.6.3) und Westernblot (2.6.6) analysiert. Zusätzlich wurden von jedem Schritt des Versuches Proben genommen, die mit 1x Laemmli mit bzw. ohne 2-ME versetzt wurden um den Reinigungsverlauf zu kontrollieren. Die Proben wurden ebenfalls mittels Westernblot (2.6.6) analysiert.

Coupling Puffer: 100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3

NaAc Puffer: 100 mM, NaCl 500 mM, pH 4,0

Tris Puffer: 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0

Lysepuffer: 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5, complete EDTA free Protease Inhibitor Mix

2.6.17 Glutaredoxin-Assay

Dieser Assay wurde zur *in vitro* Charakterisierung der Enzymaktivität von ScGrx6-8 verwendet. Er beruht auf der Oxidation von GSH durch Grx. GSSG wird durch GR reduziert, welche NADPH oxidiert. Durch diese Reaktion wird die GSH Konzentration im Assay konstant gehalten. Die Verringerung der NADPH Konzentration wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden in auf 25 °C vortemperiertem Grx-Assaypuffer 0,1 mM NADPH, 0,2 mM GSH und 74 µM HEDS vorgelegt, gemischt und für 2 min vorinkubiert, um die Bildung von gemischten Disulfiden zwischen HEDS und GSH zu ermöglichen. Anschließend wurde 0,25-1 U/ml GR zugegeben, die Messung nach insgesamt 2,5 min gestartet und eine 30 sekündige Basislinie in Abwesenheit des Grx aufgenommen. Anschließend wurde das zu untersuchende Enzym zugefügt, und die Messung für eine weitere Minute durchgeführt. In den Messungen wurden sowohl die Substrat- und Enzymkonzentrationen als auch die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien, welche kurz vor Verwendung in Grx-Assaypuffer gelöst wurden variiert. Es wurden 30-50 nM ScGrx7 bzw. 25 µM ScGrx8 im Assay eingesetzt. Alternativ wurde entweder die initiale GSH-Konzentration (ScGrx7: 50 µM und 5 mM, ScGrx8: 0,1-4 mM) bei fixer initialer HEDS-Konzentration (ScGrx7: 0,18, 0,37, 0,55 oder 0,74 mM, ScGrx8: 0,74 mM), bzw. die initiale HEDS-Konzentration (ScGrx7: 74 µM and 2,2 mM, ScGrx8: 0,1-1,0 mM) bei fixer initialer GSH-Konzentration (ScGrx7: 0,5, 1,0 oder 1,5 mM, ScGrx8: 2,0 mM) variiert. In einigen Assays wurde Grx vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von HEDS gestartet. Um Hintergrundreaktionen auszuschließen wurde bei allen Messungen die Absorption einer parallel behandelten Referenzküvette mit allen Reagenzien, außer dem zu untersuchenden Enzym, bestimmt.

Grx-Assaypuffer: 0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Stammlösungen: NADPH: 4 mM, GSH: 40-100 mM, GR: 25-125 U/mL, HEDS: 29,4-74 mM, GSSCys: 10 mM. Alle Lösungen wurden mit Grx-Assaypuffer hergestellt.

2.6.18 Thioredoxinreduktase-Assay

In diesem Assay wurde die Reduzierbarkeit der internen Disulfidbrücken von ScGrx8 Disulfid, ScGrx8^{C28S}-SSG und ScGrx7-SSG durch Thioredoxinreduktase anhand der Absorptionsänderung von NADPH untersucht. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde TrxR-Assaypuffer mit 100 µM frisch gelöstem NADPH und 0,2-0,6 µM TrxR versetzt und eine Basislinie bei 340 nm für 30 sec bei 25 °C aufgezeichnet. Anschließend wurde 0-25 µM des zu untersuchenden, oxidierten Proteins zugefügt und die Absorption für weitere 70 sec gemessen. Die Aktivität und Funktionalität der TrxR wurde mit NADPH und DTNB als Kontrollsubstraten bestätigt.

TrxR-Assaypuffer: 100 mM $K_xH_xPO_4$, 1 mM EDTA, pH 7,0

2.6.19 Insulin-Assay

Die Thioredoxinaktivität von Proteinen wurde durch Inkubation mit Insulin untersucht. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde 170 μ M Insulin mit 25 bzw. 100 μ M Redoxprotein versetzt und das Ausfallen des Insulins durch Reduktion turbidimetrisch bei 600 nm für 90 min in 3 min Schritten verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM Dithiothreitol (DTT) gestartet. Zur Kontrolle wurden parallele Ansätze ohne Protein bzw. mit und ohne Elutionspuffer vermessen.

Assay-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4

Insulin: 17 mM in Assay Puffer

DTT: 200 mM in Assay Puffer

2.6.20 Cytochrom c-Assay

Der Cytochrom c Assay wurde von C. Petrongaro nach Bihlmaier [87] durchgeführt. In einem finalen Volumen von 1 ml wurden 2 μ M LtErv, 40 μ M EqCytochrom c und 2,5 μ M EDTA in auf 25 °C temperierten Cyt c-Assay-Puffer vorgelegt und der Assay durch Zugabe von 0-1 mM DTT gestartet. Die Reduktion von EqCytochrom c wurde 5 sec nach der Zugabe von DTT photometrisch bei 550 nm verfolgt.

Cyt c-Assay-Puffer: 50 mM NaPi pH 8,0, 50 mM NaCl

2.6.21 Reinigung von Antikörpern

Für die Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern wurde SulfoLink Coupling Gel (Pierce) verwendet. Die Voraussetzung für die Verwendung dieses Materials war mindestens ein Cystein in der Peptidsequenz, um eine kovalente Bindung an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Das Peptid (1 mg) wurde in Puffer1 gelöst, auf 1 ml mit Puffer1 äquilibriertes Säulenmaterial gegeben und für 15 min bei RT im Rotator inkubiert. Da-raufhin wurde die Probe für weitere 30 min ohne Rotieren inkubiert. Das Säulenmaterial wurde mit 3 SV Puffer1 gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 15 min Inkubation im Rotator mit 1 SV 50 mM frisch in Puffer1 gelöstem Cystein geblockt. Die Säule wurde erneut für 30 min ohne Schütteln inkubiert und anschließend mit 16 SV 1 M NaCl gewaschen. Vor der Verwendung wurde die Säule nacheinander mit je 10 ml Puffer2, Puffer3, Puffer4, Puffer5 und erneut mit Puffer2 gewaschen. Für die Bindung der Antikörper wurden 6 ml Serum mit 24 ml mit complete EDTA free protease inhibitor Mix versetztem Puffer2 gemischt, um mögliche Proteaseaktivitäten zu unterbinden. Die Lösung wurde dreimal mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 10 ml Puffer2, dann mit 10 ml Puffer6 gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch Zugabe von je 10 ml Puffer7, Puffer8 und Puffer5. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt, welche mit 100 μ l 1 M Tris Base (bei Citrat- und Glycinelution) bzw. 1 M Glycin/HCl (pH 2,5) (bei Natriumphosphatelution) neutralisiert wurden. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford (2.6.1) bestimmt, wobei die Fraktionen 2-4 der Glycinelution meist die höchsten Antikörpermengen

enthielten. Die entsprechenden Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert. Zur Aufbewahrung der Säule wurde diese nach jedem Gebrauch mit 10 SV Puffer9 gewaschen, mit 1 ml des gleichen Puffers überschichtet und bei 4 °C gelagert.

Puffer1: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,5

Puffer2: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Puffer3: 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5

Puffer4: 10 mM Tris/HCl, pH 8,8

Puffer5: 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5

Puffer6: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl

Puffer7: 100 mM Citrat, pH 4,0

Puffer8: 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5

Puffer9: 0,02 % (w/v) Natriumazid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5

2.6.22 DTNB-Assay

Der DTNB-Assay wurde zum Nachweis von reduzierten Thiolen verwendet. Um Variationen des Assays zu vermeiden, wurde der Elutionspuffer des zu untersuchenden Proteins als Assaypuffer verwendet. In ein Gesamtvolumen von 800 µl wurde 600 µM DTNB vorgelegt, 40 µM Protein zugegeben und nach exakt 5 min die Absorption bei 412 nm gemessen. Zur Bestimmung der Anzahl an Thiolgruppen, bzw. des pufferabhängigen Extinktionskoeffizienten, wurde eine Kalibriergerade mit 2-ME oder DTT angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit SigmaPlot.

3 Ergebnisse

3.1 *In silico*-Vergleich mitochondrialer Proteinimportkomplexe von Nicht-Opisthokonten

Um einen Überblick über die Konservierung der mitochondrialen Importkomplexkomponenten in parasitischen Protisten zu erhalten, wurden umfangreiche Sequenzanalysen in den Genomen von Apikomplexa und Kinetoplastiden durchgeführt. Dabei wurden sowohl vorherige Sequenzanalysen bestätigt [113, 205], als auch neue Kandidaten der Importkomplexe sowie eine neue Klasse von kleinen-Tim-Proteinen identifiziert und stark konservierte MPI-Protein-Sequenzmotive bestimmt.

Protein	<i>P. falciparum</i> ^a	<i>L. major</i> ^b	<i>T. cruzi</i> ^b
Tob55	PFF0410w ^c ?	Q4FXM0	Q4CQ17, Q4CQX2
Tom40	PFF0825c	Q4FYU6?	Q4DKQ4?
Tom22	PFE1230c	-	-
Tom70	?	?	?
Tim17	PF14_0328	Q4QHR2	Q4DWJ1, Q4E545
Tim23	PF13_0300	?	?
Tim50	PF07_0110	Q4Q9N6?	Q4DGU0?
Tim22	PFF1330c	?	?
Tim9/10	PF13_0358 / PFL0430w	Q4QBW9, Q4Q9T6	Q4E1C1, Q4DQZ7
Tim8/13	PF14_0208 / PFL2065c	Q4QID6, Q4QAR1	Q4D9I4, Q4DJ63
Erv1	PFA0500w	Q4QF88	Q4CWP6
Oxa1	MAL8P1.14	Q4QGW4	Q4E0N8

Tabelle 8

Die Tabelle zeigt in Apikomplexa und Kinetoplastiden identifizierte potentielle Kandidaten des MPI. Strittige Proteineigenschaften sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. ^a Annotationen nach PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>), ^b Annotationen nach UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), ^c Der N-terminale Teil des Proteins könnte falsch vorhergesagt sein und evtl. mit den AS MNTTEL beginnen [190].

In Kinetoplastiden wurden homologe Proteine mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu den aus der Supergruppe der Opisthokonten bekannten Proteinen Tob55/Sam50, Erv1, kleine-Tim-Proteine, Tim17 und Oxa1 identifiziert. Zusätzlich wurden in Apikomplexa zu Tom40, Tim22, Tim23 und Tim50 homologe Proteine bestimmt (Tabelle 8). Die Kandidaten für Tim50 in Kinetoplastiden wurden durch die Suche nach speziellen Sequenzmotiven identifiziert (Tabelle 9). Auch diese Methode identifizierte keine eindeutigen Kandidaten für Tom70. Weitere Unterschiede der mitochondrialen Importkomplexe in Nicht-Opisthokonten im Vergleich zu Opisthokonten ergaben sich, da in keinem der untersuchten Organismen zu dem IMS-Protein Mia40 sowie zu vielen Rezeptorproteinen der Importkomplexe homologe Proteine gefunden wurden [190]. In den Genomen der analysierten Kinetoplastiden wurden einige Kandidaten von kleinen-Tim Proteinen identifiziert. Deren Sequenzvergleich führte zu einer Einteilung in vier Gruppen von klassischen kleinen-Tim-Proteinen. Zusätzlich wurde eine weitere Gruppe von kleinen-Tim-ähnlichen Proteinen bestimmt, welche sich durch die Abwesenheit der Cysteine C1 und C4 auszeichnet (Abbildung 5) [190].

		C1	C2	
ScTim9	-----MDALNSKEQQEFQKVVEQKQMKDFMRLYSNLVER	C	F T D	C V N D F T
ScTim8	-----MSSLSTSDLASLDDTSKKEIATFLEG	E N S K Q K V Q M S I H Q F T N I	C F K C V E S V N	
ScTim12	-----MSFFLNSLRGNQEVSQEKLVDVAG-VQFDAMCSTFNNILST	C L E K C I P H E G		
ScTim10	-----MSFLGFGGGQPQLSSQQKIQAEEAELDLVTD MFNKL VNN	C Y K C I N T S Y		
ScTim13	MGLSSIFGGGAPSQQKEAATAKTPNP IAKELKNQIAQ	E L A V A N A T E L V N K I S E N	C F E K C L T S	
Tb927.3.1600	-----MQPPQTPNQLAGMAQRDVVLA	E	R Q L I S N E G F N Y	C M R R C I T H Y G
TcQ4DQZ7	-----MQPPQANPQLAGLPQRDAVLA	E	K L Q L I T Y D G F M R	C A R Q C I T H Y G
LmQ4Q9T6/sTim1	-----MQPVQSNPSLMGLTQSEAVIL	S E	K L Y H I S N E G F M Y	C T K C I T H Y G
Tb11.02.3065	-----MNOSSS---LWGEEFEVLKQM	Q E	D R M N F A N N M T	C H E R C V S Q Y W
TcQ4DJ63	-----MAYNTP---AWNEEFGVLKQM	Q E	D R M N F A N S M T	C H E R C V S H Y W
LmQ4QAR1	-----MNPQP PRRKTA FN EEFDMQAI	Q E	D R M A Y H A S I A	C H E R C V H N Y F
Tb927.7.2200	-----MRLAVKQ	E S F	R L E V L M S R L Q S E	C F T F C C K N L S
TcQ4E1C1	-----MQL	E V K Q E	S F R I E M L M S R L Q S E	C F N L C C K D L R
LmQ4QBW9	-----MNL	G V K Q E	S F R I E A M M S S L R E E	C F N L C C K E L Y
Tb927.5.3340	-----MQSQMMLMQAME		R Y G M L D L A N S A L E Q	C W D I C Y D R N L
TcQ4D9I4	-----MQGQMMVMHAME		H Y S M L D L A N D V L E K	C W N I C F D V N L
LmQ4QID6	-----MQAQMMLGQALE		H Y A M M D F A N L V L E Q	C W D I C Y D S Q L
Tb927.4.3430	-----MGQDQSMAFANDTISGE		Q Y R A H Q V S R Q D I I R R A	F Q K V V P L N
TcQ4DDD2	-----MGQSNWALASDTIKGE		Q Y R A Y H A A R Q N I V H R A	F Q K V A P S S
LmQ4Q3B2	-----MGQSNGAALAKDTIASE		Q F L K Y Q E A R H R I V H R A	F V K V V P S S

		C3	C4	
ScTim9	TS-----	K L T N K E Q T	C I M K S E K F L	K H S E R V G Q R F Q E Q N A L G Q G L G R
ScTim8	DS-----	N L S S Q E E Q	C L S N C V N R F L D	T N I R I V N G L Q N T R
ScTim12	FGEP-----	D L T K G E Q C	I D R C V A K M H	Y S N R L I G G F V Q T R G F G P E N Q L R H S R F V A K E
ScTim10	SEG-----	E L N K N E S S	C L D R C V A K Y F	E T N V Q V G E N M Q K M G S F N A A G K F
ScTim13	-----	P Y A T R N D A	C I D Q C L A K Y M	R S W N V I S K A Y I S R I Q N A S A S G E I
Tb927.3.1600	EDS-----	I P Y H P G E K A	C L D R C V N K I H	N G L D L S C T I R K E F E E K I K G D M P Y R
TcQ4DQZ7	EDS-----	I P Y H P G E K S	C L D R C I S K V Y	N G L E L S R Q L K K E F E E K V K R G E M P Y R
LmQ4Q9T6/sTim1	DDA-----	I P Y H P G E K A	C L D R C I S K V Y	N G M Y M A I D H K K E F E Q K L R S G D L P Y Q
Tb11.02.3065	FN-----	N F Y G P E H R	C M R N C L E K L N	Q V G V I T N I V F T K H E Q G K T G S K P K
TcQ4DJ63	FN-----	D F Y A G E Y R	C M R N C L E K L N	Q V G I I T N V N F N K Y E Q E K T A R K R K
LmQ4QAR1	FN-----	N F Y W R E K T	C M D N C L D K I N	Q A T V I T N I N Y G K F E D V E S E K K
Tb927.7.2200	SK-----	E L T M D E V K	C V E R C A V K Y L	Q A S D I I N
TcQ4E1C1	SN-----	E L S M Q E V R	C V D R C S Q R Y L	R T H D I I A
LmQ4QBW9	KDA-----	E L T K D E V H C	I D R C S W R Y L	H T N K I I S
Tb927.5.3340	TRHELVEGVLPDAKLQKMEA		C Q R K C I A R H F	E V M R L M N A S R E Q R E K E M L Q L P P G S
TcQ4D9I4	TRKELVEGDLPDSKLRKMEA		C Q R K C I A R H F	E V M K L M N G A R E L R E K E A L Q L P P G S
LmQ4QID6	TRPELAGGALPDVKAQKMDA		C A R K C V A R H F	E V L T L L S A T R E L R E K E R M Q L P P G T
Tb927.4.3430	GGAGDKNG---	L G L D S G E R A C	V E E F A L L Y S A Y G K N G F A Q F S Q L Y E Q Y Q R D M F E K A R V E M	M T Q Q
TcQ4DDD2	TEVSDF-----	N L T K D E Q T	C V E E F A L L Y A A F A K N G F A Q L S Q L Y E Q H Q R E M Y E K A R L E M	M A Q Q
LmQ4Q3B2	KGKDDGY-----	D L T P E E R V	C V E E F A L L Y A G F A K F E F L H F S S L Y E Q Y Q R D Q Y E K M R L E V	M Q Q Q

ScTim12	IADDSKK
Tb927.3.1600	VLSENE-
TcQ4DQZ7	MTAAAT-
LmQ4Q9T6/sTim1	AAAGKM-
Tb927.4.3430	ARKELSR
TcQ4DDD2	ARKELKH
LmQ4Q3B2	ARKDIQH

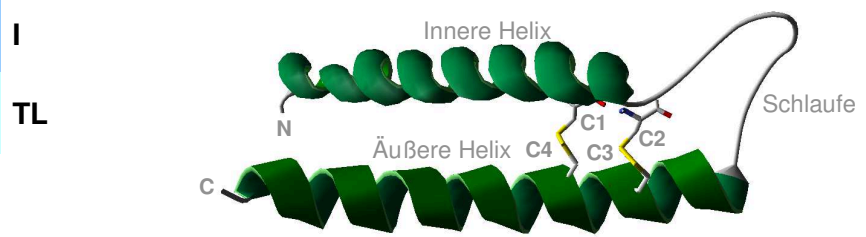


Abbildung 5: Alignment der kleinen-Tim-Proteine aus Hefe und parasitischen Kinetoplastiden. In den Genomen der Kinetoplastiden wurden vier unterschiedliche Gruppen (I-IV) von kleinen-Tim Proteinen und eine neue Gruppe (TL) von kleinen-Tim-ähnlichen Proteinen identifiziert [190]. In den Proteinen dieser Gruppe fehlen die Cysteine C1 und C4 und wurden durch Alanin bzw. Phenylalanin ersetzt. Charakteristische Aminosäuren wurden farblich hervorgehoben. Die Struktur von monomerem ScTim10 dient als Vergleich (PDB Eintrag 3DXR [206]) [190].

Um die weitere Identifizierung von MPI-Proteinen in Eukaryoten zu verbessern, wurden multiple Alignments durchgeführt, mit welchen konservierte Sequenzmotive gefunden wurden (Tabelle 9). Die Verwendung dieser Motive bestätigte einerseits die Ergebnisse früherer *in silico*-Studien, andererseits wurden putative Homologe neuer kleiner-Tim-Proteine, Tim50 und Tom40 identifiziert.

Protein	Nr.	Peptidsequenz	Vorraussichtliche Position
Tob55	1	Hy R G F	
	2	(H/F/Q) Hy (F/Y) x ₃ G Po Hy	
	3	G Hy (G/A/V) Hy	
	4	Po Hy E Hy x Hy x ₂ P	
	5	Hy Po Hy G (L/A/I/V/F) x Hy	
Tim17	1	(D/E) (x ₃ /x ₅) (D/E) P	N-terminaler Arm ^a
	2	(G/A) x ₂ (F/Y) x ₃ G x ₂ F	Transmembransegment 2 ^a
	3	R (x/x ₂) (R/K) Po D x (W/Hy) N	Schlaufe / Transmembransegment 3 ^a
	4	G x ₃ G (G/A) x ₄ R	Transmembransegment 3 ^a
Tim23	1	R x ₃ (D/E) x (L/A) x (F/Y) x ₂ G	Schlaufe / Transmembransegment 1 ^b
	2	K x ₅ Hy L N x ₅ G x ₂ Hy (A/G) N	Schlaufe / Transmembransegment 2 ^b
	3	(D/E) x ₃ Po x ₂ A G x ₃ G x Hy (F/Y) (K/R)	Transmembransegment 3 ^b
Tim50	1	L L P (D/E/P/L)	
	2	(E/D) (Y/W) x ₄ G (W/Y) (R/K) x ₂ K R P	
	3	(F/Y) E Hy Hy Hy (W/Y/F) Po	
	4	(R/K) D Hy x ₂ L x R	
Tim22	1	G x ₂ Hy G x ₂ Hy G Hy Hy	Transmembransegment 1
	2	R (x ₂ /x ₃) Po D x ₂ Po x ₃ (A/S) x ₄ G x ₇ G	Schlaufe / Transmembransegment 3
	3	(S/G/A) F (A/G) Hy F x ₂ Hy Hy (D/E)	Transmembransegment 4
Tim8,9, 10,12,13	1	C (x/F) x (K/D/x) C	Innere Helix (α1)
	2	(E/x) x ₂ C (Hy/x) (D/x) (R/x) C x ₂ (K/R/x)	Äußere Helix (α2)
Erv1	1	G x ₃ W x ₂ Hy H x ₅ (F/Y)	Helix α1
	2	Y (A/P) C x ₂ C	Aktives Zentrum
	3	H N x Hy N	Helix α4
Oxa1	1	W x ₃ Hy x ₆ Hy R	Transmembransegment 1 ^c
	2	W Hy x Po L Po x ₂ D (P/x) x ₃ L	Schlaufe / Transmembransegment 3 ^c

Tabelle 9

Hy: hydrophobe Aminosäure, Po: polare Aminosäure, x: nicht definierte Aminosäure. ^a Daten von Meier (2005) [207] bilden die Grundlage für die Positionsbestimmung mittels Alignments. ^b Daten von Rassow (1999) [208] bilden die Grundlage für die Positionsbestimmung mittels Alignments. ^c Daten von Herrmann (1997) [209] bilden die Grundlage für die Positionsbestimmung mittels Alignments [190].

3.2 Etablierung von Leishmanien als Modellsystem des mitochondrialen Proteinimports

Für die Untersuchung des MPI in Nicht-Opisthokonten wurde der Organismus *Leishmania tarentolae* ausgewählt. In diesem phylogenetisch sehr weit von Opisthokonten entfernten Organismus wurden homologe Proteine der Importmaschinerien aller Kompartimente identifiziert (Abbildung 6): in der OM: Tob55, ein Teil des TOB-Komplexes, in der IM, Tim17, eine Komponente des TIM23-Komplexes, und Oxa1, in der Matrix ein Homolog zu Hsp60 und im IMS Erv1 und kleine-Tim-Proteine. Diese Proteine wurden zur weiteren Untersuchung des MPI in Nicht-Opisthokonten verwendet. Deutliche Unterschiede zu den MPI-Komplexen in Opisthokonten zeigten sich durch die Abwesenheit von weiteren Homologen der Tim17/22/23-Familie, von

Mia40 im IMS, Rezeptoren der einzelnen Komplexe und besonders durch das Fehlen homologer Proteine des TOM-Komplexes in *L. tarentolae*.

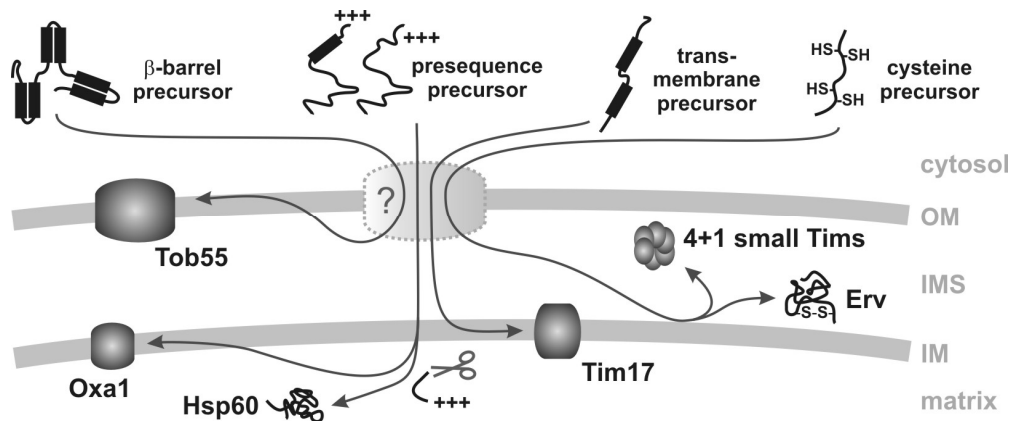


Abbildung 6: Potentielle Transportwege des MPI in Kinetoplastiden.

Das Schema zeigt alle Komplexe des MPI in Kinetoplastiden, von welchen *in silico* Komponenten identifiziert wurden. Potentielle Importwege der klassischen MPI-Substrate sind angezeigt. Unklare Punkte sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet [190].

3.2.1 Komponenten des mitochondrialen Proteinimports in Leishmanien

Um die identifizierten Komponenten des MPI in *L. tarentolae* für die Etablierung des Organismus als Modellsystem zu verwenden, wurden im ersten Schritt polyklonale Antikörper (Tabelle 10) gegen Peptide von LtTob55, LtTim17, LtErv und LtsTim1 in Kaninchen produziert und wie unter 2.6.21 beschrieben gereinigt.

Protein	Annotation	Position	Sequenz
LtTob55	JN380346	AS 182-200 von 473	H ₂ N-CRVEEVKATTTNRKGLASE-CONH ₂
LtTim17	JN380349	AS 61-78 von 152	H ₂ N-CTADFFRHSLRSAHRLGGS-CONH ₂
LtErv	JN380347	AS 115-133 von 312	H ₂ N-CLRRWHPGYPNKMEDTPTIE-CONH ₂
LtsTim1	JN380348	AS 40-57 von 102	H ₂ N-CITHYGDDAIPYHPGEKA-CONH ₂

Tabelle 10

Die Annotationen verschiedener MPI-Proteine aus Leishmanien sowie die Sequenzen der für die Herstellung polyklonaler Kaninchenantikörper verwendeten Peptide sind angegeben. Zusätzlich für die Antikörperreinigung eingefügte Cysteine sind unterstrichen [190].

Jede der vier Antikörperaufreinigungen wies eine deutliche Aufkonzentrierung der Antikörper und Reduktion unspezifischer Reaktionen auf (Abbildung 7). Die Dekoration des Mitochondrienextraktes mit α LtTob55 und α LtErv resultierte in einer einzelnen definierten Bande. Im Fall von α LtTim17 waren zusätzlich schwache Banden von ca. 33 und 40 kDa zu erkennen. Der Antikörper gegen LtsTim1 interagiert zusätzlich zu LtsTim1 noch mit einem weiteren Protein mit einer Größe von ca. 43 kDa. Die unspezifischen Interaktionen behinderten nicht die Dekoration der spezifischen Banden, deren Laufverhalten in SDS-Gelelen den berechneten Größen der jeweiligen Proteine von 52,6 kDa (LtTob55), 16,3 kDa (LtTim17), 34,6 kDa (LtErv) und 11,6 kDa (LtsTim) entsprach [190]. Antikörper gegen einen potentiellen Tom40-Kandidaten aus *L. tarentolae* dekorierten ein wesentlich kleineres Protein als erwartet, welches zudem nicht in den Mitochondrien aufkonzentriert wurde. Daher wurde dieses Protein

nicht weiter untersucht. Die erfolgreiche Herstellung von spezifischen Antikörpern ermöglichte die Untersuchung der zellulären Lokalisierung der *in silico* identifizierten Proteine.

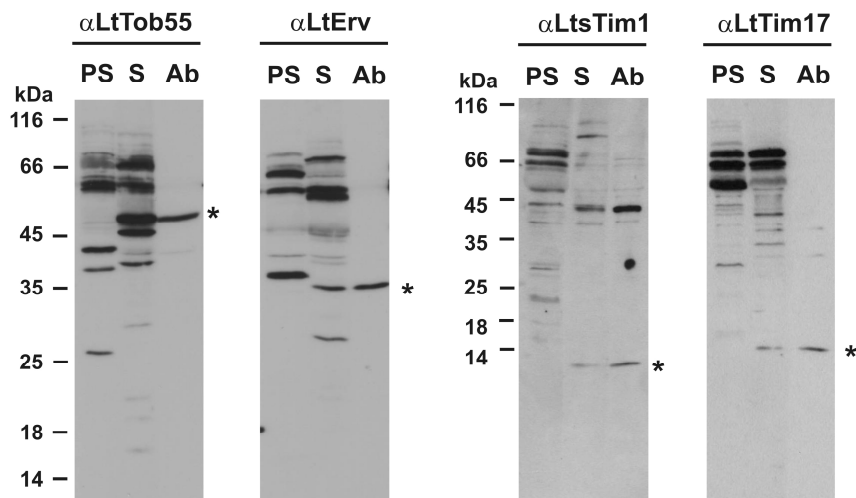


Abbildung 7: Kontrolle der Antikörper αLtTob55, αLtErv, αLtsTim1 und αLtTim17.

Die Spezifität der gereinigten polyklonalen Antikörper (AB), und die Qualität der Reinigung wurde mit isolierten Mitochondrien aus *L. tarentolae* getestet. Als Kontrollen wurden 1:500 in 5 % Milchpulver, PBS-verdünntes Präimmunsereum (PS) und Serum (S) verwendet. Sterne markieren die spezifischen Proteinbanden [190].

In einem ersten Schritt wurde die Isolierung von Mitochondrien aus Leishmanien basierend auf Arbeiten von L. Simpson im Labor etabliert [210]. Dabei wurden Zellen in der mittlogarithmischen Wachstumsphase hypoton geschwollen und durch Scheren geöffnet. Anschließend wurden alle löslichen Anteile entfernt, die DNS verdaut und die festen Bestandteile über einen Dichtegradienten in Fraktionen aufgetrennt. Alle untersuchten Proteine waren in der Mitochondrienfraktion stark angereichert (Abbildung 8a). Dies ließ auf eine mitochondriale Lokalisation der Proteine schließen, wobei prozessiertes Hsp60 als Positivkontrolle diente [211]. Um die Lokalisation genauer zu bestimmen wurden Membranproteine alkalisch extrahiert (Abbildung 8b). Es zeigte sich, dass LtTim17 und LtTob55 wie erwartet membranständige Proteine sind, während sowohl LtsTim1 als auch LtErv membranassoziiert sind. Sowohl in der löslichen Fraktion als auch in der pelletierten Membranfraktion waren beide Proteine nachweisbar. Dabei waren die Anteile an membrangebundenem und löslichem Protein äquivalent. LtHsp60 wurde aufgrund seiner Verteilung im Überstand wie erwartet als lösliches Protein definiert. Die submitochondriale Lokalisierung wurde durch fraktionelle Proteolyse isolierter Mitochondrien untersucht (Abbildung 8c). Das Protein LtTob55 wurde in intakten Mitochondrien deutlich von PK abgebaut und nach der Öffnung der OM durch hypotones Schwellen komplett verdaut. Im Gegensatz dazu wurde LtTim17 erst nach Öffnung der OM für PK zugänglich. Ein großer Anteil an LtsTim1 wurde nach der Öffnung der OM prozessiert, jedoch erst nach der Lyse aller Membranen mit TritonX-100 komplett verdaut. LtHsp60 wurde erst bei Lyse der IM durch TritonX-100 abgebaut und ist daher ein Matrixprotein. Die Lokalisation von LtErv in diesem Experiment zeigte keine eindeutige Verteilung des Proteins. Daher und um eine Lokalisation im ER auszuschließen, wurde die Lokalisation von LtErv mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Lokalisation von LtErv an der mito-

chondrialen IM (Abbildung 8d). Diese Ergebnisse zeigen, dass alle Proteine in den Mitochondrien lokalisiert sind. LtTob55 und LtTim17 sind Membranproteine der mitochondrialen OM bzw. IM. LtHsp60 ist ein in der Matrix lokalisiertes, lösliches Protein und LtsTim1 sowie LtErv sind im IMS lokalisierte, membranassoziierte Proteine.

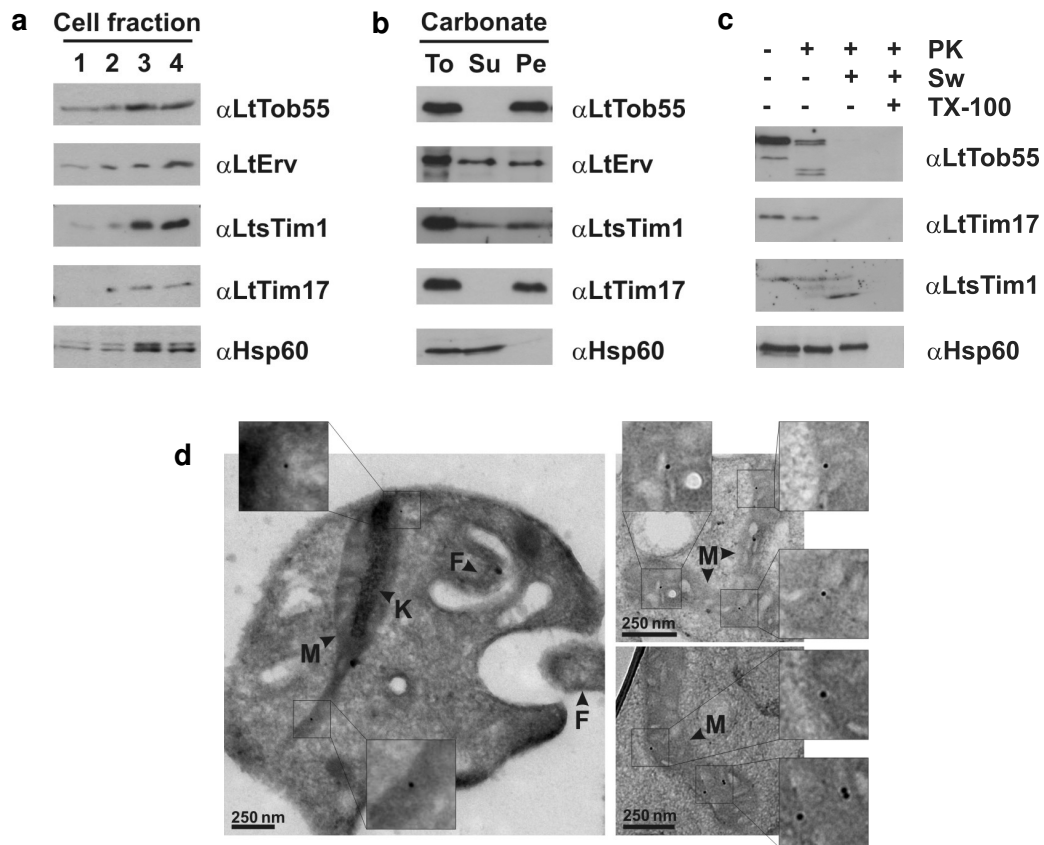


Abbildung 8: Zelluläre Lokalisation der *L. tarentolae*-MPI-Proteine.

a) Reinigungsfraktionen der Mitochondrienisolierung aus *L. tarentolae*: 1: ganze Zellen, 2: lysierte Zellen, 3: sedimentierte Fraktion des Aufschlusses, 4: Isolierte Mitochondrien. b) Alkalische Proteinextraktion aus isolierten *L. tarentolae* Mitochondrien. To: komplette Mitochondrien, Su: Überstand, Pe: pelletierte Fraktion der Extraktion. c) Subfraktionierung von isolierten Mitochondrien. PK: Behandlung mit Proteinase K, Sw: hypotones Schwellen der Mitochondrien, TX-100: Lyse der Zellmembranen mit Triton X-100. d) Elektronenmikroskopische Aufnahmen immunogoldmarkierter Sektionen von *L. tarentolae* WT-Zellen. Der verwendete Primärantikörper war α LtErv. K: Kinetoplast, M: Mitochondrium, F: Flagellum [190].

3.2.2 Leishmanienmitochondrien zeigen eine distinkte Autofluoreszenz

Die Untersuchung der *L. tarentolae* Zellen mittels Immunfluoreszenzanalysen zeigte, dass bereits in fixierten Zellen, die nicht mit Fluorophor behandelt waren, eine distinkte Autofluoreszenz subzellulärer Strukturen auftrat [212]. Diese wiesen in Form und Verteilung eine starke Ähnlichkeit zu Mitochondrien auf [213]. Unterschiedliche Morphologien sind in Abbildung 9a zu sehen. Um die Fluoreszenz als potentiellen mitochondrialen Marker nutzen zu können wurde sie näher untersucht.

Zum einen sollte festgestellt werden, ob das Signal durch die Art der Fixierung und die beteiligten Chemikalien bedingt war. Daher wurden Leishmanien mit unterschiedlichen Methoden fixiert und die Fluoreszenz der Proben untersucht. Weder die Methode der Fixierung noch die

dabei verwendeten Chemikalien hatten signifikant Einfluss auf die Morphologie oder Intensität der fluoreszierenden Strukturen (Abbildung 9a) [212].

Zum anderen wurde untersucht, ob die Autofluoreszenzsignale durch Kolokalisation mit etablierten mitochondrialen Markern (Mitotracker-Red CM-H₂XRos) als mitochondrial verifiziert werden können. Es zeigte sich, dass das Autofluoreszenzsignal und das Signal des Mitotrackers in der gleichen Struktur angereichert waren. Damit wurde bewiesen, dass *L. tarentolae*

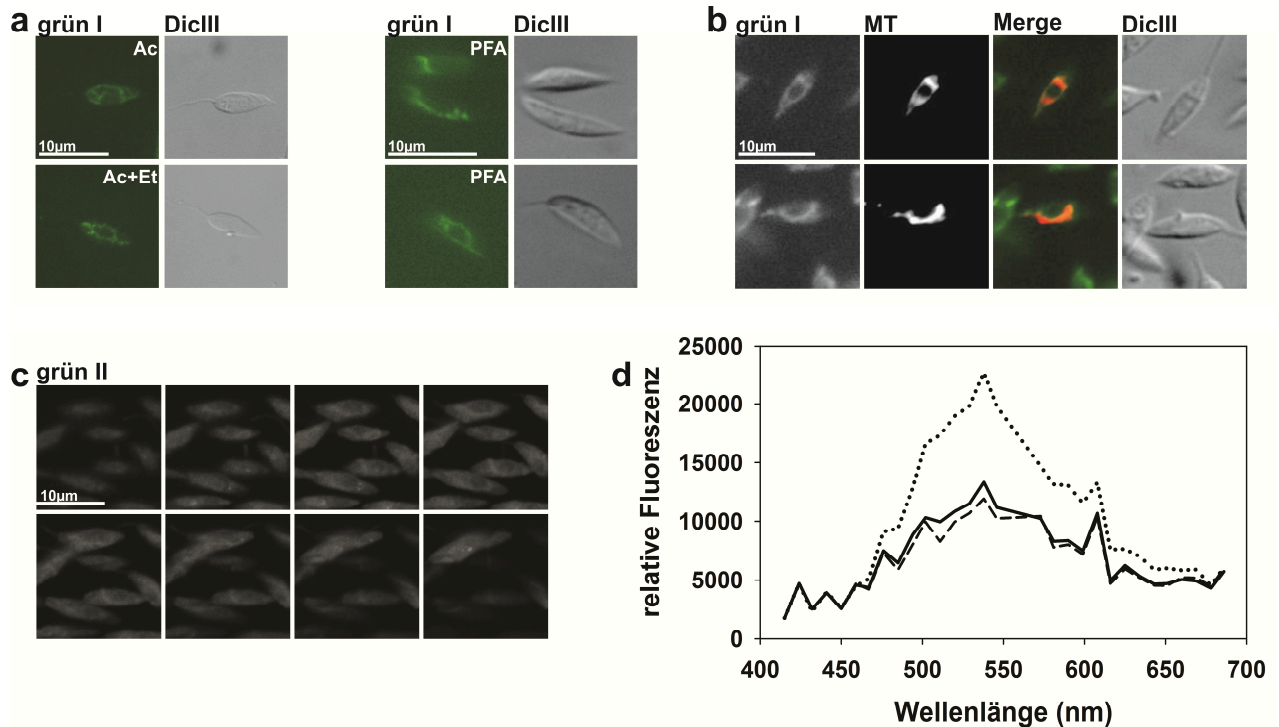


Abbildung 9: Mitochondriale Autofluoreszenz in *L. tarentolae*.

Charakterisierung der Autofluoreszenz von *L. tarentolae*-WT-Mitochondrien. a) Die Zellen wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln fixiert: Ac: 100 % Aceton, Ac+Et: 20 % (v/v) Aceton, 80 % (v/v) Ethanol, PFA: 4 % (w/v) PFA in PBS. b) Leishmanienzellen wurden 30 min mit Mitotracker behandelt, anschließend mit 4 % (w/v) PFA fixiert und die Fluoreszenz mit verschiedenen optischen Filtern untersucht. c) z-Stack Aufnahmen von 4 % (w/v) PFA-fixierten Leishmanien-WT-Zellen, der Abstand zwischen den Aufnahmen beträgt 0,41 µm und die Anregung erfolgte mit 458 nm, grünII Strahlteiler 458/561 nm. grünI: GFP-Filter (Tabelle 7). DICIII: Durchlicht Aufnahme, MT: Mit Mitotracker markierte Zellen wurden mit Rot-Filter (Tabelle 7) aufgenommen. d) Emissionsspektren von Mitochondrien (gepunktete Linie), Zytosol (gestrichelte Linie) und kompletten Zellen (durchgezogene Linie) von 4 % (w/v) PFA-fixierten Leishmanien-WT-Zellen bei Anregung mit 458 nm und Verwendung eines 458/561 Strahlteilers. Für die Bilder wurden die Mikroskope Axiovert 200M (a, b) sowie LSM780 (c, d) verwendet. Variiert nach Eckers [212].

Mitochondrien autofluoreszieren (Abbildung 9b) [212]. Die Verteilung des Mitochondriums in der Zelle wurde in z-Stack-Aufnahmen gezeigt (Abbildung 9c). Das intensivste Autofluoreszenzsignal wurde mit dem Mikroskop Axiovert 200M bei Anregung zwischen 425 und 475 nm, bei einer Emissionswellenlänge zwischen 485 und 535 nm detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung des Mikroskops LSM780 erzielte bei Anregung von 458 nm ein Emissionsmaximum bei 538 nm (Abbildung 9d) [212]. Der Fluorophor war bei Messung mit diesem Mikroskop jedoch sehr labil und wurde durch längere Belichtung gebleicht. Die Verwendung einer XBO-Lampe (Axiovert 200M) verringerte die Bleicheffekte und resultierte in den am deutlichsten abgegrenzten und intensivsten Signalen. Die Verwendung eines Lasers bei 485 nm (LSM780)

führte auch bei geringer Intensität (1,5 %) innerhalb weniger Sekunden zum vollständigen Bleichen des Fluorophors. Die Analyse der Emissionsspektren der Mitochondrien sowie der umgebenden Zelle zeigte, dass die Spektren nahezu identisch waren. Daraus resultiert, dass es sich in beiden Fällen um den gleichen Fluorophor handelt, welcher in den Mitochondrien angereichert ist [212]. Die Ergebnisse zeigen, dass *L. tarentolae*-Mitochondrien eine deutliche Autofluoreszenz aufweisen, welche als Marker für die Lokalisation von Proteinen verwendet werden kann.

3.3 Funktionelle Konservierung der klassischen Importwege

Wie in 3.1 und 3.2.1 bereits festgestellt, unterscheiden sich die MPI-Komplexe von Opisthokonten und Leishmanien deutlich in ihrer Komposition. In Opisthokonten essentielle Komponenten der Importmaschinerie wie z. B. der TOM-Komplex, Mia40 und Rezeptormoleküle der Komplexe wurden bei der *in silico*-Analyse von Leishmanien nicht identifiziert. Um weitere Informationen über den MPI in Leishmanien zu erhalten, wurde die funktionelle Konservierung des MPI untersucht. Dazu wurden *in vitro* exprimierte Präproteine in isolierte Mitochondrien importiert.

3.3.1 Import von Opisthokontenproteinen in isolierte Leishmanienmitochondrien

Die funktionelle Konservierung des MPI wurde zuerst durch Import von Hefeproteinen in isolierte Leishmanienmitochondrien untersucht (Abbildung 10). Für alle getesteten Proteine wurde ein zeitabhängiger Import festgestellt. Der Import von Proteinen in die OM wurde anhand von ScPorin, einem β -Barrel-Protein der OM, untersucht. Dieses Vorläuferprotein wurde sowohl in Hefe- als auch Leishmanienmitochondrien importiert (Abbildung 10a), jedoch war die Importgeschwindigkeit in Leishmanienmitochondrien geringer. Zudem wurde gezeigt, dass der Import in beiden Fällen vom Membranpotential unabhängig ist. Als Markerproteine für die Importwege der MPI-Komplexe der IM dienten Su9, DLD und AAC. Su9, ein Protein mit N-terminaler Signalsequenz, wird in Opisthokonten über den TIM23-Komplex in die Matrix importiert und dort prozessiert. Das Protein wurde ebenfalls in Leishmanienmitochondrien importiert, wobei sowohl die Importgeschwindigkeit als auch die Prozessierungsrate deutlich verringert war (Abbildung 10b). Es zeigte sich, dass dieser Importvorgang wie in Hefemitochondrien von einem intakten Membranpotential abhängig ist. DLD, ein IMS Protein wird ebenfalls über den TIM23-Komplex importiert, jedoch lateral in die IM eingefügt und durch Prozessierung löslich in den IMS entlassen. Der Import in Leishmanienmitochondrien war wiederum konserviert und membranpotentialabhängig. Allerdings erfolgte der Import stark verzögert und es wurde keine Prozessierung des importierten Proteins festgestellt (Abbildung 10c). AAC, ein integrales Protein der IM, diente als Marker für den Import über den TIM22-Komplex. Dieses Vorläuferprotein wurde ebenfalls membranpotentialabhängig in Leishmanienmitochondrien importiert, wobei die Importgeschwindigkeit erneut verringert war (Abbildung 10d). Der Import von Präproteinen mit konservierten Cysteinmotiven in den IMS über Mia40 und Erv1 wurde anhand des Markerproteins ScTim9 untersucht. Dieses Protein wird sowohl in Hefe als auch in Leishmanien unabhängig vom Membranpotential importiert. Auch die Importrate von ScTim9 war in Leishmanien deutlich reduziert (Abbildung 10e). Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz deutli-

cher kompositioneller Unterschiede alle untersuchten Markerproteine aus Hefe in Leishmanienmitochondrien importiert werden.

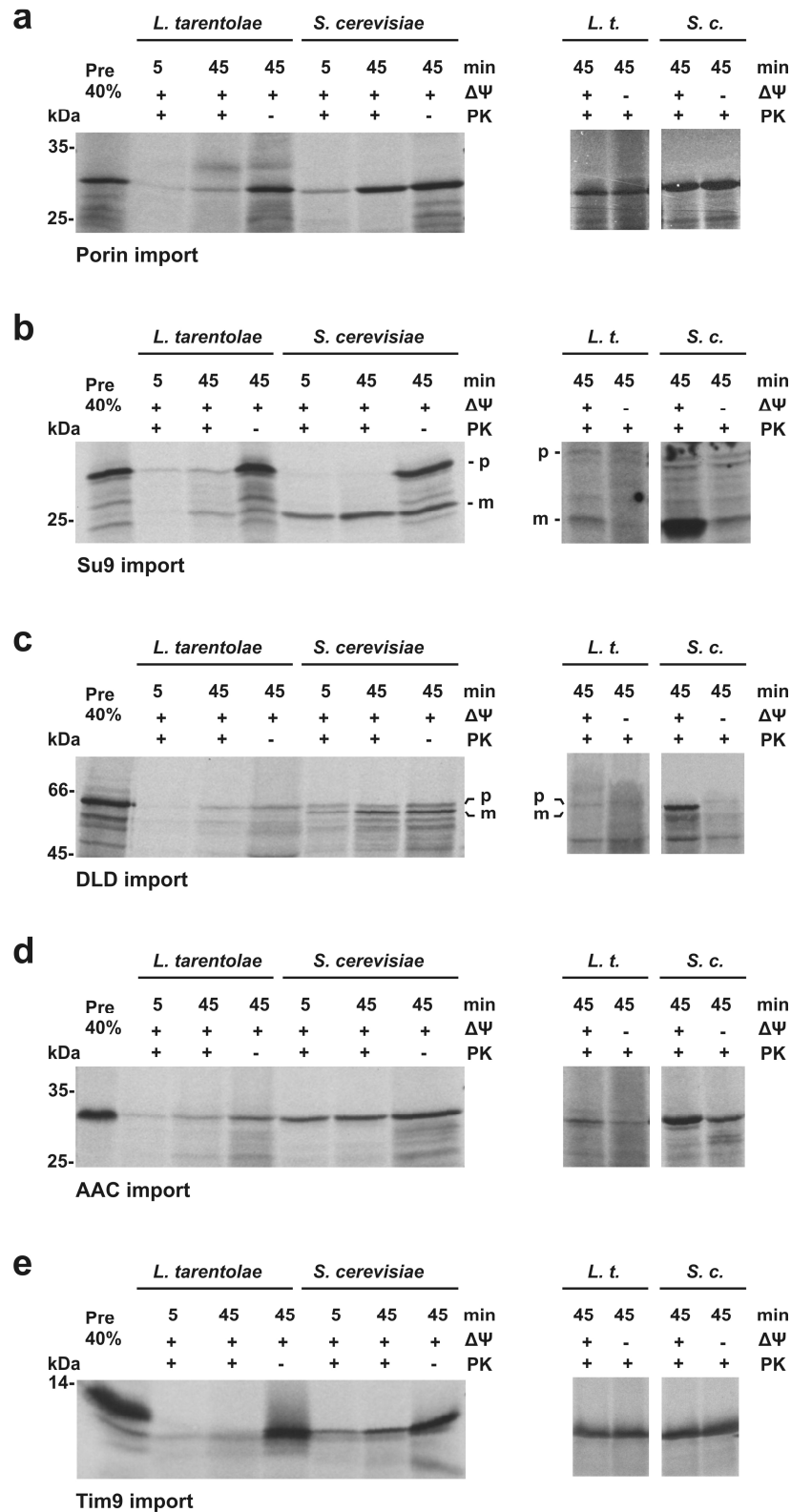


Abbildung 10: Import von Opisthokonten-Präproteinen in Hefe- und Leishmanienmitochondrien. Import verschiedener mitochondrialer Hefeproteine in isolierte Hefe- sowie Leishmanienmitochondrien in Abhängigkeit der Importzeit und des Membranpotentials. Pre 40%: 40% des für den Import verwendeten Lysats. $\Delta\Psi$: Membranpotential, p: Präprotein, m: prozessiertes Protein. Details siehe Text [190].

3.3.2 Import von Discicristatenproteinen in isolierte Hefemitochondrien

Um weitere Erkenntnisse über die funktionelle Konservierung des MPI zu erhalten, wurde der Import der etablierten Leishmanienmarkerproteine in isolierte Hefemitochondrien untersucht.

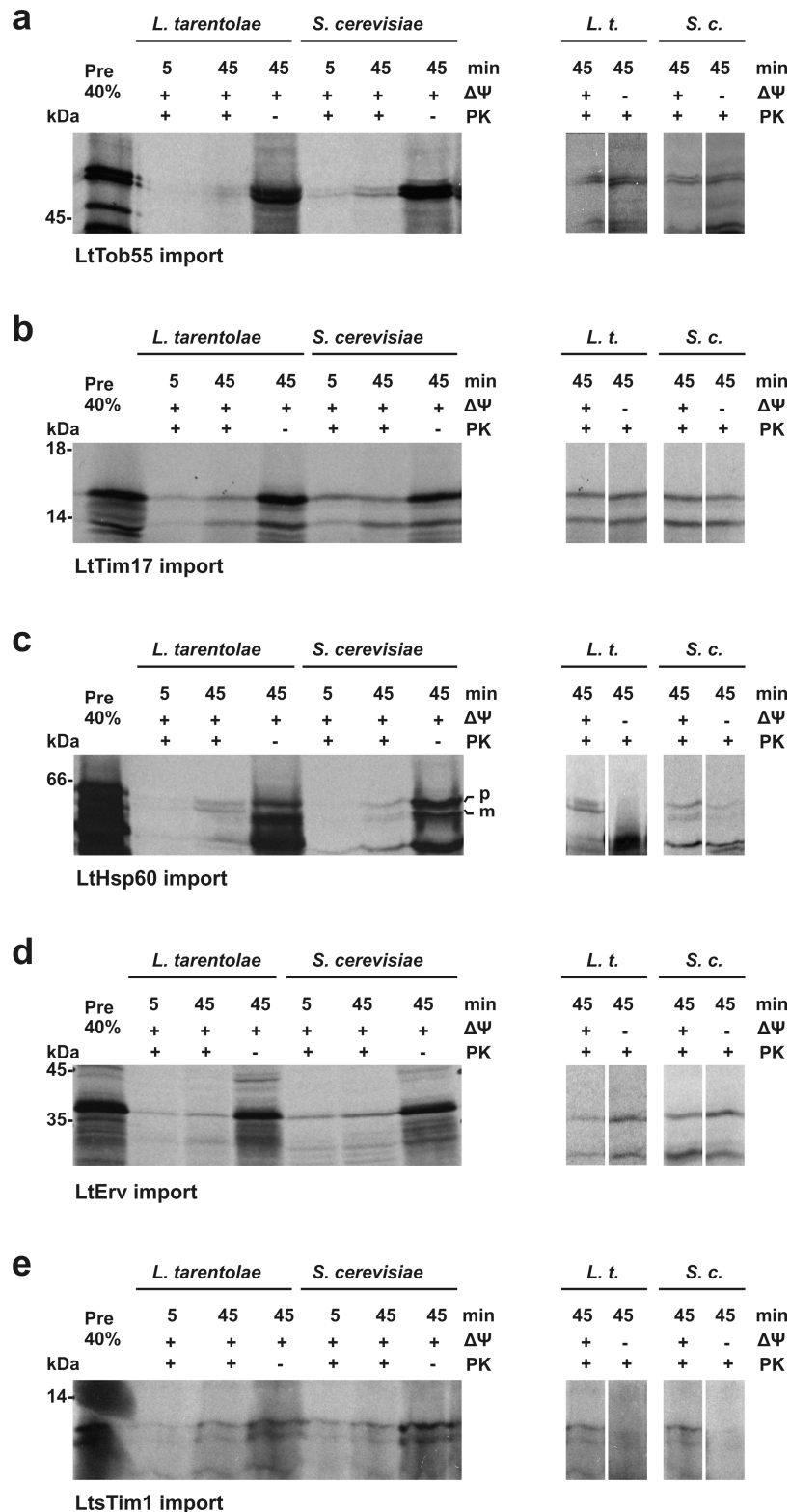


Abbildung 11: Import von Leishmanien-Präproteinen in Hefemitochondrien.

Import der etablierten mitochondrialen Leishmanienproteine in isolierte Hefe- sowie Leishmanienmitochondrien in Abhängigkeit von der Importzeit oder des Membranpotentials. $\Delta\Psi$: Membranpotential, p: Präprotein, m: prozessiertes Protein. Details siehe Text [190].

Alle Proteine wurden wiederum zeitabhängig sowohl in Hefe- als auch Leishmanienmitochondrien importiert (Abbildung 11).

Der Import in die mitochondriale OM über den TOB-Komplex wurde anhand von LtTob55 untersucht (Abbildung 11a). Das Präprotein wurde unabhängig vom Membranpotential sowohl in isolierte Hefe- als auch Leishmanienmitochondrien importiert, wobei die Importgeschwindigkeit in Leishmanienmitochondrien ggf. geringer war. LtTim17 wurde als Markerprotein für den Import von Proteinen in die IM verwendet. Es wurde unabhängig vom Membranpotential sowohl in Hefe- als auch Leishmanienmitochondrien importiert (Abbildung 11b). Der Import von Leishmanienmatrixproteinen wurde anhand von LtHsp60 untersucht. Das Protein wurde membranpotentialabhängig in beide Mitochondrienarten importiert (Abbildung 11c), jedoch nur in Leishmanienmitochondrien prozessiert, nicht in Hefemitochondrien. Der Import von Leishmanienproteinen in den IMS wurde anhand der Markerproteine LtErv und LtsTim1 untersucht. Beide Proteine wurden sowohl in Hefe- als auch Leishmanienmitochondrien importiert, jedoch war der Import von LtsTim1 im Gegensatz zu LtErv membranpotentialabhängig (Abbildung 11d, e).

Anhand dieser Versuche wurde gezeigt, dass der MPI funktionell konserviert ist. Es bestehen jedoch Unterschiede zwischen Hefe und Leishmanien, z. B. bei der Prozessierung importierter Proteine.

3.4 Charakterisierung von LtErv

In Opisthokonten werden cysteinreiche Proteine durch das Mia-Erv-System in den IMS importiert. Dabei sind beide Proteine für diesen Vorgang essentiell [214, 215]. In Leishmanien wurde nur LtErv identifiziert, jedoch kein zu Mia40 homologes Protein [190]. Trotzdem wurden IMS-Proteine aus Hefe erfolgreich in Leishmanienmitochondrien importiert. Um diesen Widerspruch zu klären und genauere Informationen über diesen Prozess zu erhalten, wurde LtErv, die vorhandene Komponente des Systems in Leishmanien, näher untersucht.

3.4.1 Strukturvergleich

Die Primärstruktur von LtErv gleicht bisher bekannten Proteinen der Erv-Elektronentransferase-Familie. Besonders die Erv-Domäne ist stark konserviert. Die 3D-Struktur des Proteins ließ sich *in silico* auf der Kristallstruktur von Ratten-ALR basierend modellieren (Abbildung 12). Nach diesem Modell dimerisiert LtErv über nichtkovalente Bindungen und weist eine Bindungsstelle für den Cofaktor FAD auf [216]. Die Cysteine C63 und C66 sind im aktiven Zentrum, in direkter Nähe zu FAD gelegen und C66 kann mit diesem interagieren. Die Cysteine C300 und C304 sind am Ende des C-terminalen vermutlich flexiblen Armes gelegen. Durch diese exponierte Position könnten die Cysteine C300 und C304 mit Substraten interagieren und andererseits Elektronen auf das aktive Zentrum übertragen. Die Cysteine C92 und C109 bilden in diesem Modell eine wahrscheinlich strukturstabilisierende Disulfidbrücke aus [216]. Die Funktion von C17 ist unklar, da im Gegensatz zu Ratten-ALR kein weiteres Cystein als Interaktionspartner in der Struktur vorhanden ist. Allerdings sind die beiden C17 des Dimers im Modell in räumlicher Nähe gelegen, weshalb eine Interaktion nicht ausgeschlossen werden kann.

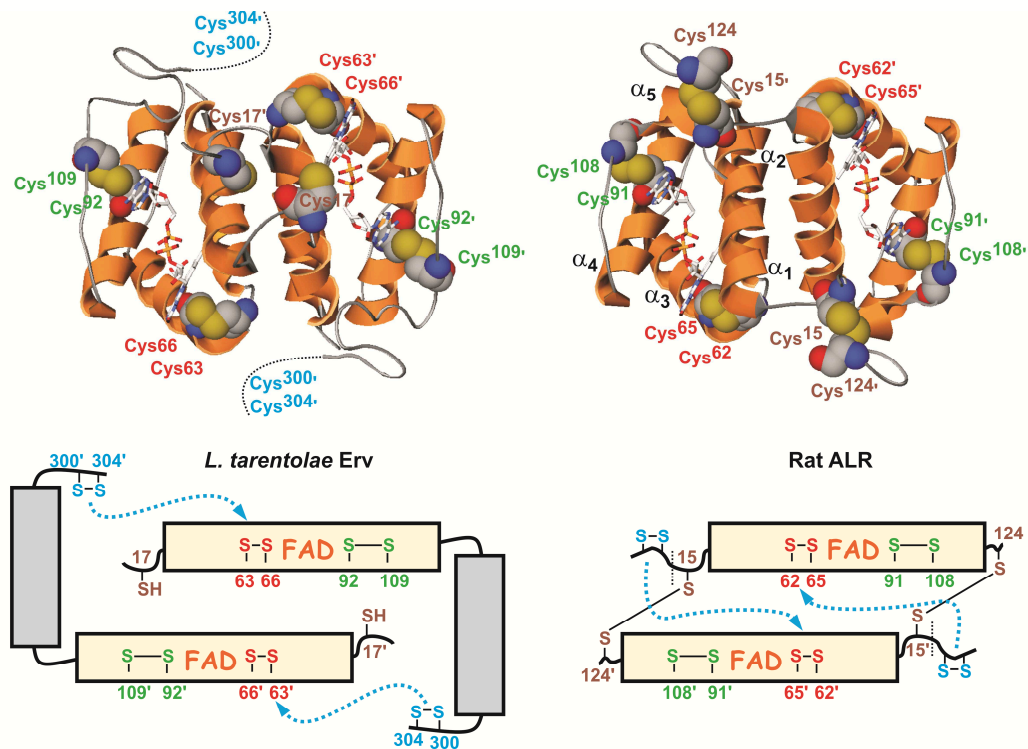


Abbildung 12: Struktur- und Funktionsmodell von LtErv.

Das LtErv-Dimer-3D-Modell wurde anhand der Kristallstruktur von Ratten-ALR erstellt. Die Struktur des C-Terminus konnte nicht mit dieser Kristallstruktur berechnet werden und ist daher verkürzt dargestellt. Cysteine sind hervorgehoben und nummeriert. Die putative Lage des Cofaktors FAD wird angezeigt. Die mögliche Interaktion von Cysteinen verschiedener Untereinheiten wurde im Domänenmodell mit Pfeilen angedeutet. Variiert nach Eckers [216].

Die Funktion und Struktur der C-terminalen Hälfte des Proteins ist unklar, da LtErv in diesem Bereich eine zusätzliche, für Kinetoplastiden charakteristische Domäne aufweist [216]. Die in silico-Analyse des Proteins bestätigte, dass LtErv eine potentielle Erv-Elektronentransferase ist. LtErv weist sowohl Charakteristika von ScErv1 als auch ScErv2 auf, jedoch ist der e-Wert für ScErv1 von $1e^{-24}$ wesentlich geringer als der für ScErv2 von $1e^{-16}$. Im Strukturvergleich mit ScErv1 zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proteinen (Abbildung 13): Zum einen ist die Verteilung der N- und C-terminalen Cysteine deutlich verschieden. LtErv hat drei Cysteine außerhalb der Erv-Domäne, eines am N-Terminus (C17) und ein C_{x3}C-Motiv (C300, C304) am vermutlich flexiblen C-Terminus, während ScErv1 nur ein C_{xx}C-Motiv am flexiblen N-Terminus aufweist.

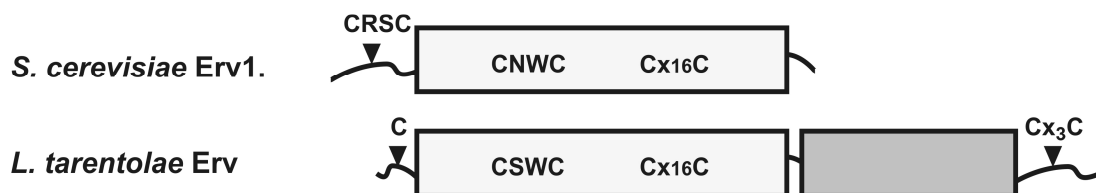


Abbildung 13: Vergleich der Domänenstruktur von LtErv und ScErv1.

Die Domänen von LtErv und ScErv1 wurden schematisch dargestellt sowie alle Cysteine der Proteine hervorgehoben. weiß: Erv-Domäne, grau: kinetoplastiden-spezifische Domäne.

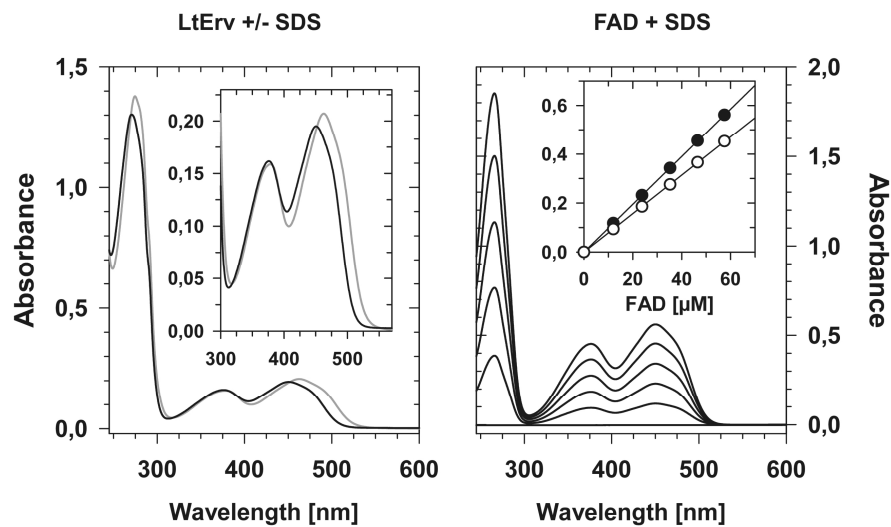


Abbildung 14: Vergleich der LtErv- und FAD-Absorptionsspektren.

Das Absorptionsspektrum von frisch gereinigtem LtErv wurde zwischen 250 und 600 nm gemessen (schwarze Linie). Anschließend wurde das Protein mit 0,25 % (w/v) SDS behandelt wodurch der gebundene Cofaktor freigesetzt wurde (graue Linie). Die Konzentration des freigesetzten FAD wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden von 0-57 μM freiem FAD (rechts) ermittelt. Weiße Punkte: Absorption bei 376 nm, schwarze Punkte: Absorption bei 450 nm. Variiert nach Eckers [216].

Zum anderen unterscheidet sich LtErv durch die zusätzliche C-terminale Domäne von ScErv1. Um die potentielle Bindung eines Cofaktors an LtErv zu untersuchen, wurde rekombinantes Protein über Ni-NTA aufgereinigt. Die intensiv gelbe Farbe des Proteineluates war ein Indiz für die Bindung von FAD. Das Absorptionsspektrum dieses Eluates war ähnlich zum Spektrum von freiem FAD, was auf die Bindung von FAD als Cofaktor schließen lässt. Um das Verhältnis von Protein zu FAD im Komplex zu bestimmen und die Bindung von FMN auszuschließen, wurde das Protein mit SDS behandelt. Durch die Denaturierung des Proteins wurde der gebundene Cofaktor freigesetzt. Das Spektrum des freigesetzten Cofaktors stimmt mit FAD überein, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wurde. Anhand der eingesetzten Proteinkonzentration wurde in zwei separaten Versuchen ein LtErv zu FAD Verhältnis von 1,0 bzw. 0,98 ermittelt. Dies zeigt, dass pro Untereinheit ein Molekül FAD gebunden ist.

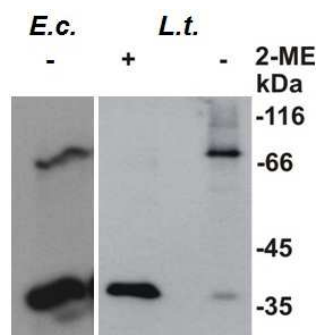


Abbildung 15: LtErv bildet kovalent verknüpfte Dimere.

Es wurden sowohl LtErv-exprimierende *E. coli*-Zellen (*E.c.*) als auch isolierte Leishmanienmitochondrien mit nicht reduzierender SDS-PAGE (-) und Westernblot analysiert. Zur Untersuchung der Dimerisierung wurden die Mitochondrien zusätzlich mit 2-ME (+) behandelt.

Viele Proteine der Erv-Familie bilden nichtkovalent verknüpfte Dimere deren Untereinheiten meistens über kovalente Disulfidbrücken miteinander interagieren [78]. Die Interaktion der Untereinheiten ist für die enzymatische Aktivität dieser Proteine nötig [73, 78, 79]. Daher wurde die Oligomerisierung von LtErv untersucht. Die Analyse von isolierten Leishmanienmitochondrien mittels SDS-PAGE und Westernblot zeigt, dass LtErv unter denaturierenden Bedingungen sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegt (Abbildung 15) [216]. Die Reduktion durch 2-ME lässt auf eine Verknüpfung über kovalente Disulfidbrücken schließen. Das in *E. coli* überexprimierte Protein bildet ebenfalls kovalent über Disulfidbrücken verknüpfte Dimere [216]. Diese Ergebnisse zeigen, dass LtErv wie andere Erv-Elektronentransferasen in verschiedenen Organismen kovalent verknüpfte Dimere bildet.

3.4.2 Charakterisierung der einzelnen Cysteine in LtErv

Im vorherigen Kapitel (3.4.1) wurde bestätigt, dass LtErv die strukturellen Eigenschaften einer Elektronentransferase aufweist. Jedoch bestehen deutliche Unterschiede in der Verteilung der Cysteine im Vergleich zu ScErv1 (Abbildung 13). Um die Funktion der einzelnen Cysteine und damit den Elektronentransfer in LtErv zu untersuchen, wurden die einzelnen Cysteine gegen Serine ausgetauscht. Das WT-Protein wies im nicht reduzierenden SDS-Gel zwei unterschiedliche Dimerbanden auf (D1, D2), die aus dem Laufverhalten unterschiedlich verknüpfter Proteine resultierten (Abbildung 16).

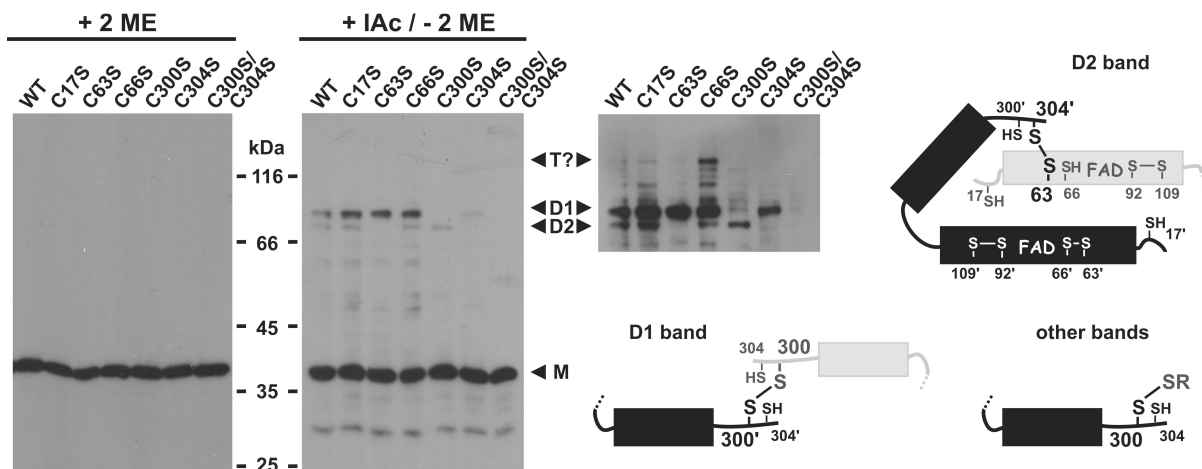


Abbildung 16: Dimerisierung von LtErv Mutanten.

Die Expression der Proteine wurden für 2 h in *E. coli* induziert und diese anschließend komplett in 1x Laemmli mit und ohne 2-ME aufgenommen. Um eine unspezifische Dimerisierung der Proteine beim Aufkochen zu verhindern, wurden die Proben mit Iodacetamid (IAC) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit SDS-PAGE und Westernblot analysiert. M: Monomer, D1: Dimer1, D2: Dimer2, T?: eventuelles Trimer [216].

Das Dimerisierungsmuster der Mutanten C17S, C66S sowie C92S und C109S (Daten nicht gezeigt) entsprach dem des WT-Proteins. Dies zeigt, dass diese Cysteine nicht an der Dimerisierung beteiligt sind. Die Mutation C300S verhinderte als einzige Einzelmutation die Bildung von D1. Dies zeigt, dass nur Cys300 an der Bildung dieses Dimers beteiligt ist [216]. Das Dimer D2 wurde weder von C63S, noch von C304S gebildet, was eine Interaktion zwischen den beiden Cysteinen indiziert. Die Mutation beider C-terminalen Cysteine, C300S und C304S verhinderte die Dimerisierung von LtErv vollständig. Da die Versuche mit *E. coli* Extrakt durch-

geführt wurden ist kann allerdings eine Interaktion mit *E. coli* Proteinen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Interaktion der Cysteine untereinander und der Elektronentransfer auf FAD wurden mittels FAD-Spektren der einzelnen Mutanten weiter untersucht (Abbildung 17). Die Elektronenumgebung von FAD im Protein beeinflusst dessen Elektronenverteilung und daher auch dessen Absorptionsspektrum. Diese Änderungen geben Aufschluss über den Redoxzustand des Cofaktors [82, 217, 218]. In Kapitel 3.4.1 wurde bereits gezeigt, dass das Absorptionsspektrum des WT-Proteins ähnlich zu freiem FAD ist. Daher wird angenommen, dass keine direkte Interaktion eines Cysteinthiols des Proteins mit FAD vorliegt. Der gleiche Sachverhalt wurde für das Absorptionsspektrum von LtErv^{C304S} und die Doppelmutante LtErv^{C300S, C304S} festgestellt (Abbildung 17). Die Mutation C300S dagegen hatte starke Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum [216].

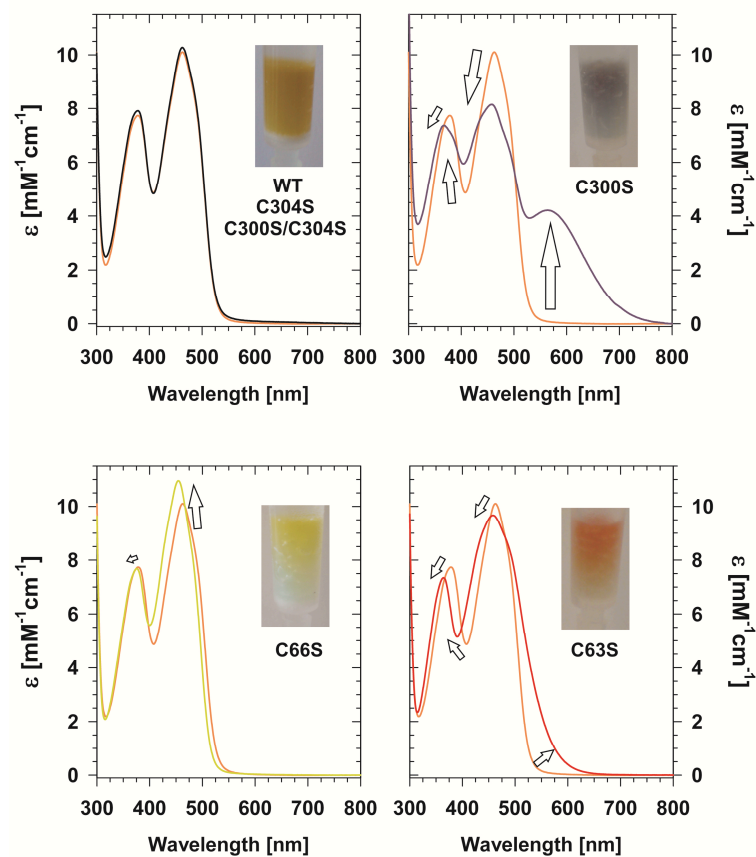


Abbildung 17: Absorptionsspektren von LtErv-Cystein-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die Absorptionsspektren verschiedener Cysteinmutanten von LtErv. Als Vergleich ist in jedem Spektrum das Absorptionsspektrum von WT-LtErv gezeigt (orange). Die Unterschiede zwischen den Mutanten und WT-Spektren sind durch Pfeile verdeutlicht. Die Farbe der gereinigten Proteine ist anhand von Bildern, beladener Ni-NTA Säulen, gezeigt [216].

Zum einen war die Farbe des gereinigten Proteins lila statt gelb, zum anderen war eine deutliche Blauverschiebung und Verringerung der Absorptionsmaxima zu erkennen. Dies lässt auf die partielle Reduktion des Chromophors schließen [217]. Des Weiteren entstand ein zusätzlicher Absorptionspeak bei ca. 560 nm, welcher die Existenz eines delokalisierten Charge-Transfer-Komplexes (CTC) zwischen FAD und einem Cysteinthiolat des Proteins anzeigt [217]. Das Absorptionsspektrum des roten LtErv^{C63S} wies ebenfalls eine Blauverschiebung und

Verringerung der Absorptionsmaxima. Zusätzlich wurde eine Schulter im Absorptionbereich > 500 nm festgestellt. Diese deutet ebenfalls die Existenz eines partiellen CTC an [82] [216]. Die Mutation C66S hatte nur sehr geringe Auswirkungen auf das Absorptionsspektrum. Es zeigte sich eine leichte Blauverschiebung, allerdings ohne Absorptionzunahme bei > 500 nm, und eine Vergrößerung des Peaks bei ca. 450 nm. Auch das Spektrum von denaturiertem WT-Protein, in welchem freies FAD vorliegt, weist eine Absorptionzunahme des Peaks bei ca. 450 nm auf (Abbildung 14). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von FAD und LtErv aufgrund der Mutation C66S verringert ist. Da der Cofaktor des mutierten LtErv jedoch weiterhin im Protein gebunden ist, unterscheidet sich die Lage des Absorptionsmaximums von freiem FAD.

3.4.3 LtErv Elektronenübertragung von DTT auf Cytochrom c

In Hefe überträgt Erv1 Elektronen von Mia40 auf Cytochrom c [61, 62, 87, 214]. Um zu untersuchen, ob LtErv ebenfalls als Elektronentransferase wirkt und damit Elektronen von einem Substrat auf Cytochrom c übertragen kann, wurde es in Kooperation mit J. Riemer und C. Petrangaro in einem Assay-System getestet, in welchem Elektronen von DTT über das Enzym auf Cytochrom c übertragen werden. Dabei wurde auch der Einfluss einzelner Mutationen auf die Aktivität im Assay untersucht (Abbildung 18).

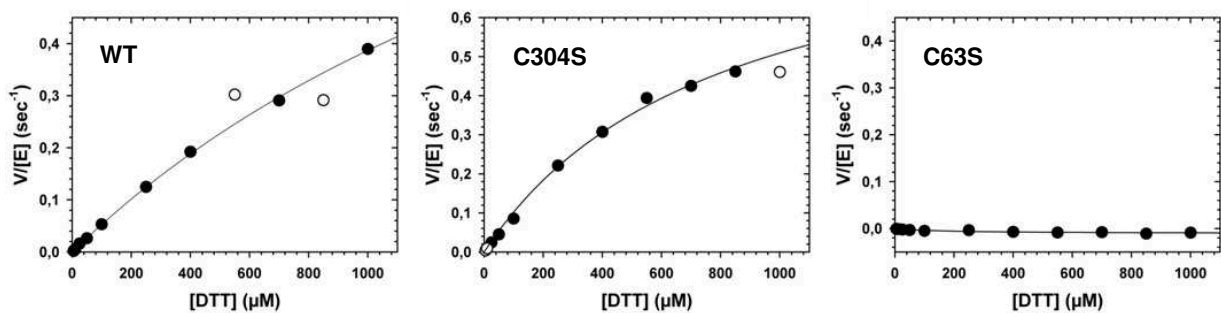


Abbildung 18: DTT-Cytochrom c-Elektronentransferase-Assay.

In diesem Assay wurde getestet, ob Elektronen durch rekombinantes LtErv von DTT auf EqCytochrom c übertragen werden können. Die Reduktion von Cytochrom c wurde spektrophotometrisch bei 550 nm verfolgt.

Das WT-Protein wies eine deutliche, von der Substratkonzentration abhängige Aktivität auf (Abbildung 18) und bestätigt damit die Elektronentransferase-Aktivität [216]. Das mutierte Protein LtErv^{C304S} war in diesem Assay ebenfalls aktiv, jedoch wies es eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit als der Wildtyp auf (Abbildung 18), was auf eine direkte Interaktion von DTT mit dem aktiven Zentrum unter Umgehung des C-terminalen Cysteinmotivs und dessen gekoppelter Konformationsänderung hindeutet. Die Mutation von C63S, dem mit C304 interagierenden Cystein, führte zum vollständigen Verlust der Aktivität (Abbildung 18). Dies zeigt, dass DTT Elektronen nicht direkt auf C66 bzw. FAD übertragen kann. Durch diesen Assay wurde bestätigt, dass LtErv sowohl strukturell als auch funktionell eine Elektronentransferase der Erv-Familie ist.

3.4.4 LtErv lokalisiert in Hefemitochondrien im IMS

In vitro-Experimente bestätigten LtErv als Elektronentransferase der Erv-Familie. Im nächsten Schritt wurde die Funktion des Proteins *in vivo* untersucht. Dazu wurde LtErv in einem Δ ScErv1-Hefestamm exprimiert um zu kontrollieren, ob das strukturell sehr unterschiedliche LtErv (Abbildung 13) die Funktion des Hefeproteins übernehmen kann. Zuerst sollte jedoch die mitochondriale Lokalisation des Leishmanienproteins in Hefe verifiziert werden. Mitochondrien wurden deshalb aus den Stämmen YPH501 Δ Erv1-pYX232LtErv sowie YPH501 Δ Erv1-pYX232ScErv1 isoliert und die Kompartimente durch schrittweise Öffnung der Membranen einer Behandlung mit PK zugänglich gemacht. Zur Kontrolle des Prozesses wurden bekannte Markerproteine der einzelnen Kompartimente untersucht (Abbildung 19a).

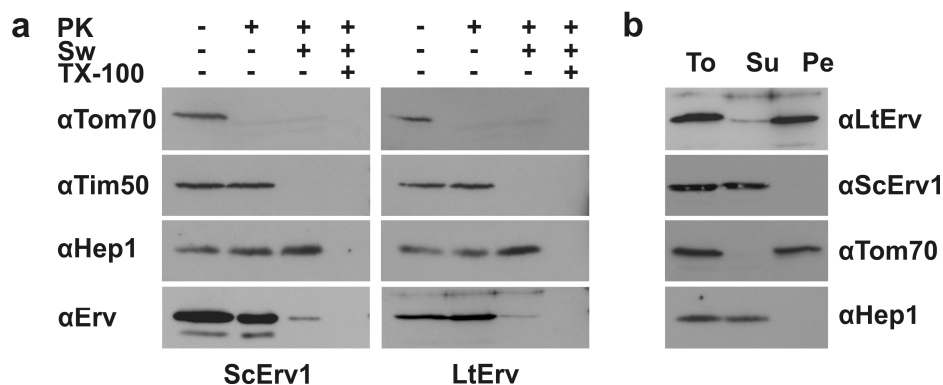


Abbildung 19: Analyse von YPH501 Δ Erv1-pYX232LtErv- und -pYX232ScErv1-Mitochondrien.

Die beiden Stämme wurden auf SD-Medium bei 30 °C angezogen und die Mitochondrien isoliert. Die Qualität der Mitochondrienisolation und die Lokalisation der Proteine wurden mittels alkalischer Proteinextraktion und Subfraktionierung der Mitochondrien untersucht. Die verwendeten Antikörper sind spezifisch für Proteine der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente. Tom70: OM, ScErv1: IMS, Tim50: IM, Hep1: Matrix. a) Subfraktionierung von isolierten Mitochondrien und Behandlung mit Proteinase K, b) Alkalische Proteinextraktion von Membranproteinen beider Mitochondrienspezies. ScErv1: YPH501 Δ Erv1-pYX232ScErv1-Mitochondrien, LtErv: YPH501 Δ Erv1-pYX232LtErv-Mitochondrien. Beschriftung siehe Abbildung 8b und c. Variiert nach Eckers [216].

Die äußere Mitochondrienmembran beider Isolate war intakt, da Tim50 der unbehandelten Mitochondrien nicht für PK zugänglich war. Die Mitoplastierung der Mitochondrien durch hypotones Schwellen war erfolgreich, da Tim50 in diesem Schritt vollständig abgebaut wurde. Die IM war weiterhin intakt, da das Matrixprotein Hep1 stabil blieb. Sowohl ScErv1 als auch LtErv wurden im IMS der isolierten Mitochondrien nachgewiesen [216]. Beide Proteine unterscheiden sich in der Assoziation zu den Membranen (Abbildung 19b): ScErv1 war in der alkalischen Proteinextraktion komplett in der löslichen Fraktion enthalten. LtErv hingegen wurde hauptsächlich in der Membranproteinfraction nachgewiesen, was auf eine starke Assoziation des Proteins mit der Membran hindeutet [216].

3.4.5 Nichtfunktionelle Komplementation von ScErv1 durch LtErv

Die submitochondriale Lokalisation von LtErv im IMS von Hefe wurde im vorherigen Kapitel bestätigt. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob LtErv die Funktion von ScErv1 komplementieren kann, um Informationen über die Funktion von LtErv *in vivo* zu erhalten. Das Wachstum aller verwendeten Stämme wurde bei 24, 30 und 37 °C auf S_D-Agar überprüft. Dabei waren

keine Wachstumsdefekte feststellbar. Unter Negativselektion mit 5-FOA wuchs allein der Stamm YPH501 Δ Erv1-pYX232ScErv1, bei welchem eine zusätzliche Kopie von ScErv1 in den Organismus eingeführt wurde. Weder die Negativkontrolle, noch der Stamm YPH501 Δ Erv1-pYX232LtErv waren unter diesen Bedingungen überlebensfähig. Dies konnte auch bei einer Inkubationstemperatur von 24 und 37 °C bestätigt werden und zeigt, dass LtErv ScErv1 funktionell nicht komplementieren kann [216].

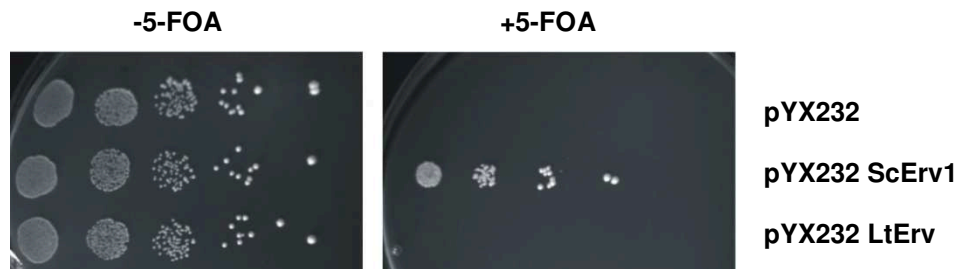


Abbildung 20: Komplementation von ScErv1 durch LtErv.

Die Stämme YPH501 Δ Erv1-pYX232 (Negativkontrolle), YPH501 Δ Erv1-pYX232 LtErv und YPH501 Δ Erv1-pYX232 ScErv1 (Positivkontrolle) wurden in 1:10 Verdünnungsschritten auf SD-Medium mit bzw. ohne den Selektionsmarker 5-FOA aufgebracht und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Variiert nach Eckers [216].

3.4.6 Interaktionspartner von LtErv

Der Funktionsmechanismus von LtErv in Leishmanienmitochondrien in der Abwesenheit von Mia40 oder einem homologen Gen ist bisher unbekannt. Daher wurde versucht, mittels Immunoaffinitäts-Chromatographie und Pulldown-Experimenten Disulfid-verbrückte Interaktionspartner von LtErv zu identifizieren, welche Aufschluss über die Funktion von LtErv liefern könnten. Da die Solubilisierung von sowohl LtErv als auch dessen Interaktionspartner eine Voraussetzung für die Durchführung der Immunoaffinitäts-Chromatographie war, wurden in einem Vorversuch die effektivsten Methoden zur vollständigen Solubilisierung von LtErv aus Leishmanienmitochondrien etabliert. Sowohl 30-sekündiges Erhitzen auf 94 °C in 0,1 % (w/v) SDS und anschließende, einstündige Inkubation in 0,002 % (w/v) SDS, als auch eine einstündige Inkubation in 0,5 % TritonX-100 solubilisierete LtErv vollständig (Daten nicht gezeigt). Diese Methoden wurden für die Suche nach Interaktionspartnern und deren Aufreinigung über ProteinA-Sepharose verwendet. Die Immunopräzipitation wurde sowohl mit Leishmanienzell-extrakt als auch aufgereinigten Mitochondrien durchgeführt. Weiterhin wurden α LtErv-Antikörper nach Bindung an Protein A Sepharose mittels Crosslinkern am Säulenmaterial fixiert, um die vom Säulenmaterial abgelöste Antikörpermenge in Westernblots zu verringern. Zusätzlich wurden isolierte Mitochondrien teilweise vor dem Aufschluss mit verschiedenen Crosslinkern behandelt, um den LtErv-Interaktionspartnerkomplex zu stabilisieren. In keinem dieser Versuche konnten spezifische Interaktionsbanden im Westernblot bestimmt werden.

In weiteren Experimenten wurde α LtErv auf CnBr-Sepharose fixiert und für Immunoaffinitäts-Chromatographie mit lysierten Mitochondrien verwendet. Diese wurden zur Stabilisierung des LtErv-Interaktionspartnerkomplexes mit dem Crosslinker MBS behandelt. Es wurden einige potentielle Interaktionsbanden identifiziert, welche mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Es wurde jedoch nur Keratin nachgewiesen.

In einem weiteren Versuch wurde rekombinantes, His-getagtes LtErv in Kombination mit Leishmanienzellysat zur Identifizierung von LtErv-Interaktionspartnern verwendet. Hier wurden unterschiedliche LtErv-Mutanten eingesetzt. Einerseits die Doppelmutante LtErv^{C300,304S}, welche als Negativkontrolle diente, da alle substratbindenden Cysteine mutiert waren, andererseits LtErv^{C304S}, um die Bindung zwischen LtErv und Interaktionspartnern zu stabilisieren. Zusätzlich wurde LtErv-WT verwendet. In keiner Variation der Versuche konnten interaktions-spezifische Banden identifiziert werden.

3.5 Vorbereitende Arbeiten zur Identifizierung des Leishmanien TOM-Komplexes

Einer der interessantesten Aspekte des MPI in Leishmanien ist die Abwesenheit des TOM-Komplexes, welcher eine Voraussetzung für den Import der meisten mitochondrialen Proteine in Opisthokonten ist [15, 30, 48, 49, 219]. Keine der bisher *in silico* durchgeführten Studien konnte Teile des Komplexes in den untersuchten Trypanosomatiden identifizieren [91, 132]. Aus diesem Grund soll der TOM-Komplex oder ein Komplex mit äquivalenter Funktion experimentell identifiziert werden. Dazu wurden acht verschiedene Pulldown-Konstrukte von mitochondrialen Proteinen erstellt (Abbildung 21).

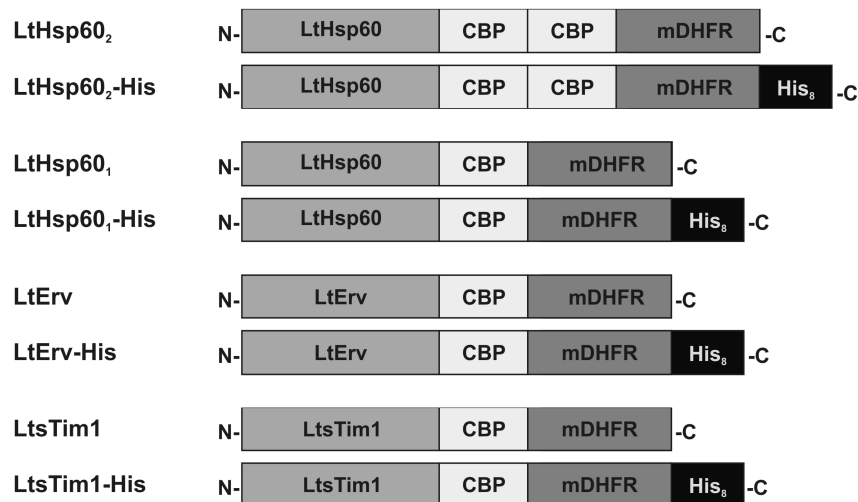


Abbildung 21: Schematische Darstellung der TOM-Komplex-Pulldown-Konstrukte.

Die verschiedenen Konstrukte wurden in pX-Vektoren erstellt. Der His-Tag dient der Aufreinigung des Proteins. Die Konstrukte ohne His-Tag werden als Negativkontrollen verwendet.

Die Proteine sollen in Leishmanien exprimiert und in den mitochondrialen IMS (LtErv, LtsTim1) bzw. die Matrix (LtHsp60) importiert werden. Dort dienen die gefalteten Proteine als Anker. Die Zugabe von Methotrexat zu den Zellen induziert die Faltung von muriner Dihydrofolatreduktase (mDHFR) außerhalb der Mitochondrien, wodurch das Konstrukt im Importprozess gestoppt wird. Die Domänen des calmodulinbindenden Peptids (CBP) dienen dabei als Linkerregion, welche die Membranen durchspannt. Anschließend werden die Mitochondrien isoliert und ly-siert, woraufhin die Konstrukte inklusive des potentiellen TOM-Komplexes über Ni-NTA und ggf. Calmodulin gereinigt werden. Nach Erstellung der Konstrukte in pX-Vektoren wurden *L. tarentolae*-UCLA-WT-Zellen mit diesen transfiziert und die Expression der Konstrukte mit-

tels Westernblot kontrolliert (Abbildung 22). Alle His-Tag-Konstrukte wurden in Kompletzell-extrakten mit αHis_5 in der richtigen Größe nachgewiesen. Die Dekoration mit αLtErv bzw. $\alpha\text{LtsTim1}$ ergab je eine spezifische Bande sowohl für die Konstrukte mit als auch ohne His-Tag. Die Größe der His-getagten Konstrukte unterschied sich deutlich von den ungetagten Konstrukten und bestätigte somit die Expression des His-Tags. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Konstrukte vollständig exprimiert wurden und für die Identifizierung des potentiellen TOM-Komplexes prinzipiell geeignet sind.

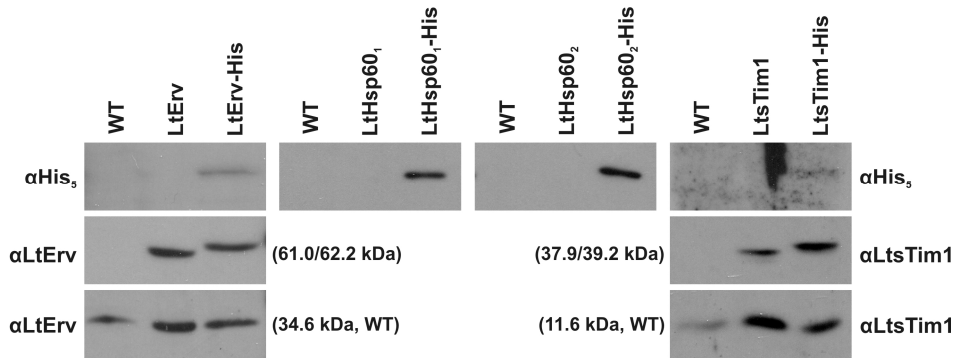


Abbildung 22: Expressionskontrolle der TOM-Komplex-Pulldown-Konstrukte.

Die Expression der verschiedenen Pulldown-Konstrukte in Lt UCLA wurde kontrolliert. Es wurden je 50 μg Zellen der verschiedenen Stämme, welche sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, mittels Westernblot untersucht. Sowohl endogene (untere Reihe) als auch transgene Proteine (obere und mittlere Reihe) der berechneten Größen (in Klammern angegeben) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die mitochondrialen Proteine (αLtErv , $\alpha\text{LtsTim1}$) bzw. den His-Tag (αHis_5) nachgewiesen.

3.6 Neue Glutaredoxine aus Hefe

3.6.1 *In silico*-Identifizierung und Strukturvergleich dreier neuer Glutaredoxine

Durch *in silico*-Untersuchungen von J. Herrmann mit dem Programm BLAST wurden im Genom von Hefe drei neue Glutaredoxine identifiziert. Zwei davon, die Gene YDL10w und YBR014c, wurden *SCGRX6* und *SCGRX7* benannt und gehören zu den Monothiol-Grx [158]. Sie weisen eine Sequenzidentität von 38 % untereinander auf, zu anderen Hefeglutaredoxinen nur 14 bis 21 %. Für beide Proteine wurden N-terminale Signalpeptide vorhergesagt [220], wie sie ScGrx5 aufweist [187].

ScGrx6 ist durch zwei Insertionen zwischen einer N-terminalen Transmembrandomäne und dem aktiven Zentrum größer (231 Aminosäuren) als ScGrx7 (203 Aminosäuren) [157]. Obwohl beide Proteine nur ein Cystein besitzen und ihre Sequenz sehr ähnlich ist, unterscheiden sich die aktiven Zentren voneinander. ScGrx6 hat die Sequenz KSTCSYSK und ScGrx7 die Sequenz KTGCPYSK im aktiven Zentrum (Abbildung 23f). Sowohl ScGrx6 als auch ScGrx7 haben Ähnlichkeit zu Dithiol-Grx. Zum einen weisen sie kein WP-Motiv an der GSH-Bindungsstelle auf [165, 221], zum anderen fehlt ihnen eine Insertion vor dem aktiven Zentrum (Abbildung 23) [158]. Viele Monothiol-Grx besitzen ein konserviertes Arginin, das vermutlich an der Glutathionbindung beteiligt ist. So interagiert R41 von EcGrx3 mit dem Glycinanteil des GSH über dessen Carboxylatgruppe [222]. Im Gegensatz dazu ist dieses Arginin sowohl in ScGrx6 als auch ScGrx7 durch ein Glutamin (Q171 und Q143) ersetzt (Abbildung 23a, b).

Auch in vielen Dithiol-Grx wie z. B. ScGrx1 und 2 sowie HsGrx2 ist dieses Arginin durch ein Glutamin ersetzt [157].

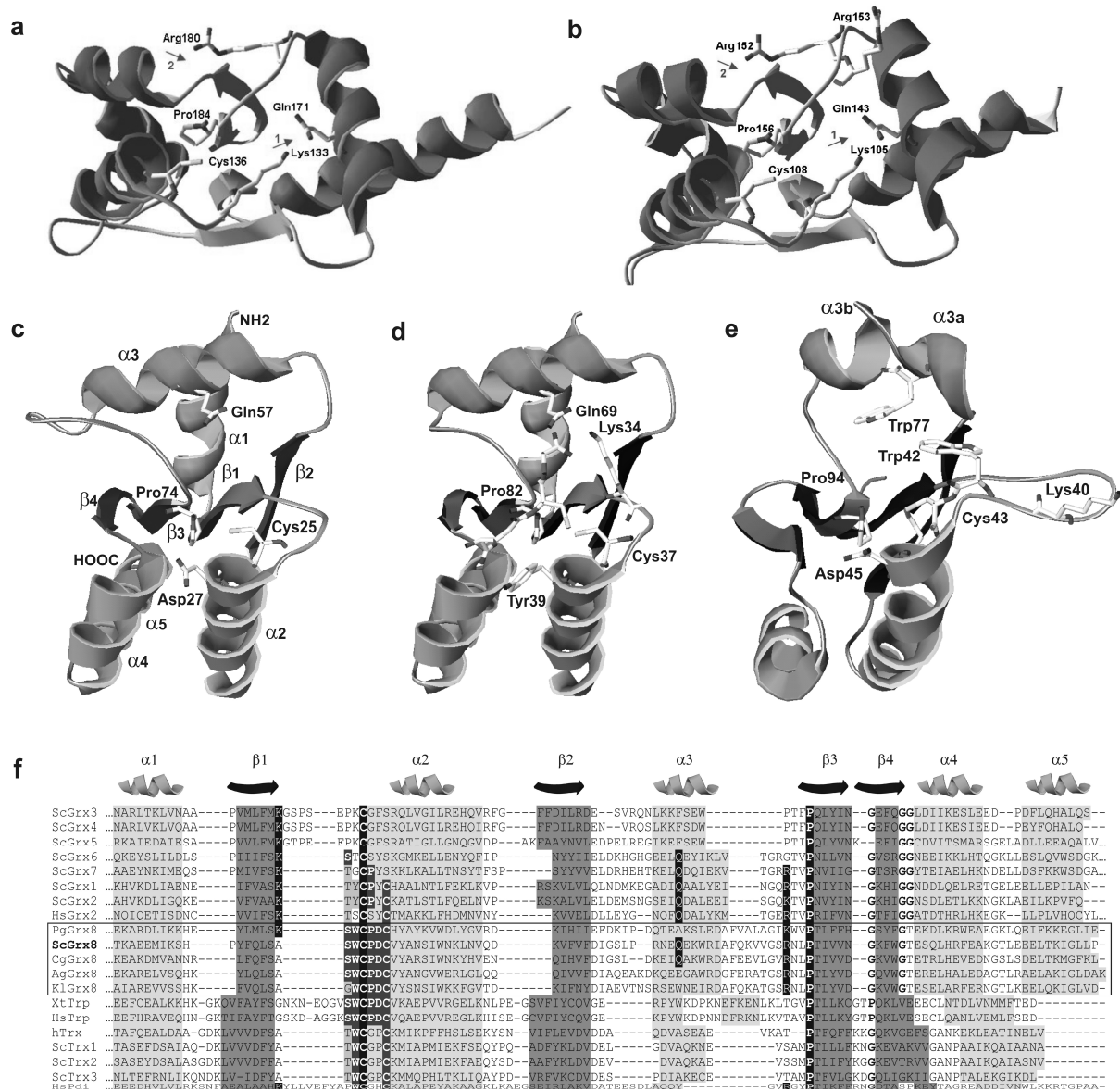


Abbildung 23: Glutaredoxinmodelle und Alignments.

a) Molekulares Modell von ScGrx6. b) Molekulares Modell von ScGrx7. In beiden Fällen wurden N-terminal verkürzte Sequenzen verwendet. Die putativen Bindungsstellen der Carboxylatgruppe des Glycinanteils (Pfeil1) sowie des γ -Glutamyls (Pfeil2) von GSH sind gekennzeichnet. c) Ein um 90° gedrehtes molekulares Modell von ScGrx8. d) Struktur von HsGrx2 im Komplex mit Glutathion (PDB entry 2FLS) [154]. e) Oxidiertes HsTrp14 (PDB entry 1WOU) [223], weitere Informationen im Text. f) Sequenzalignment verschiedener Glutaredoxine. Putative Homologe von ScGrx8 aus verschiedenen Ascomyceten sind durch einen Kasten hervorgehoben. Weitere thioedoxinstrukturelementhaltige Proteine sind: *Homo sapiens* Glutaredoxin 2 Isoform 1 (HsGrx2), *Homo sapiens* Trp14 (HsTrp), *Xenopus tropicalis* Trp14-Homolog (XtTrp), humanes Thioredoxin (hTrx), *S. cerevisiae* Trx1-3 (ScTrx1-3), *Homo sapiens*-Protein Disulfidisomerase (HsPdi) [157, 158].

In ScGrx6 und ScGrx7 interagiert Glutathion voraussichtlich mit einem konservierten Lysin (K133 und K105) (Abbildung 23a, b) und die Carboxylatgruppe der γ -Glutamyl-Einheit von GSH könnte an die konservierten Arginine R180 und Arg152 der beiden Proteine binden. Ebenso könnte die Seitenkette von ScGrx7 R153 an der Bindung von GSH beteiligt sein

(Abbildung 23a, b). Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften werden ScGrx6 und ScGrx7 in eine neue Gruppe von Glutaredoxinen eingeordnet, welche Ähnlichkeit zu Dithiol-Grx aufweist.

Ein weiteres in Hefe identifiziertes Glutaredoxin, YLR364w, wurde ScGrx8 benannt. Es ist ein Dithiol-Grx mit einer Länge von 109 AS und wird wie ScGrx6 und ScGrx7 mittels multipler Sequenzalignments klassifiziert [157]. Bei Verwendung der Sequenz von ScGrx8 für BLAST-Analysen, erhält man die höchste allgemeine Ähnlichkeit für Dithiol-Grx. ScGrx8 hat im Gegensatz zu vielen anderen Mitgliedern der Thioredoxinfaltungs-Familie keine großen N- oder C-terminalen, zusätzlichen Sequenzbereiche [157]. Dementsprechend wurde ein energetisch stabiles Modell des kompakten Volllängenproteins (Abbildung 23c) basierend auf der Struktur von humanem Grx2 im Komplex mit Glutathion erstellt (Abbildung 23d). Die Aminosäuren K34 und Q69 des humanen Grx2, welche die Glycin-Carboxylatgruppe von GSH binden [154] sowie einige vermutlich an der Substraterkennung beteiligte AS in α -Helix drei sind in ScGrx8 und weiteren potentiellen Homologen aus Saccharomyceten nicht stark konserviert (Abbildung 23c, d, f). Allerdings ist R71 vor dem β -Strang drei von ScGrx8 in diesen Proteinen konserviert oder durch ein Lysin ersetzt und könnte ebenfalls mit der Substrat-Carboxylatgruppe interagieren [155]. Das am Ende von α -Helix drei gelegene W60 ist potentiell an der Bildung der Glutathionbindungsstelle beteiligt. Die Aminosäure ist in vielen Monothiol-Grx konserviert (Abbildung 23f) und könnte sowohl die Bindung von GSH als auch die enzymatische Aktivität dieser Proteine signifikant verändern [158, 165, 221]. Die Aminosäuren in der Umgebung des Cysteins, im potentiellen aktiven Zentrum am Ende von α -Helix 2 von ScGrx8, weisen mehr Ähnlichkeit zu Thioredoxinen auf. Die größte Ähnlichkeit dieser Region besteht zu dem thioredoxinähnlichen Protein Trp14 [223]. Es weist wie ScGrx8 ein SWCPDCV-Motiv mit einem, das aktive Zentrum teilweise abschirmenden, Tryptophan auf (Abbildung 23e, f). Daher könnten die Cysteinthiolgruppen von ScGrx8 ähnliche chemische Eigenschaften wie jene in Trp14 haben [224], während die Substratbindungsstellen und allgemeinen Strukturen der beiden Proteine deutlich voneinander abweichen (Abbildung 23c, e). So sind eine gespaltene und gedrehte α -Helix 3 und eine verlängerte Schlaufe vor α -Helix 2 zwar typisch für Trp14, wurden jedoch nicht im Modell von ScGrx8 gefunden (Abbildung 23c, e). Insofern hat ScGrx8 eine typische Grx-Struktur, eine signifikant veränderte Substratbindungsstelle und ein Trp14-ähnliches Cysteinmotiv im katalytischen Zentrum.

3.6.1.1 Die Quartärstruktur von ScGrx6, ScGrx7 und ScGrx8

Expression und Reinigung der Glutaredoxine

Bereits die Primärstrukturen der drei identifizierten Glutaredoxine weisen eine außergewöhnliche Kombination von Merkmalen auf (siehe Kapitel 3.6.1). Um einen Zusammenhang zwischen der Struktur der Proteine und der Funktion herstellen zu können, wurden diese rekombinant exprimiert und weitergehend charakterisiert. Die Expression und Reinigung aller drei Proteine resultierte in sehr reinen Proteinen, deren Größe in reduzierenden SDS-Gelen in etwa der errechneten Größe von Monomeren entsprach. Im Gegensatz zu ScGrx6 und ScGrx8 (Abbildung 24a, c) wies ScGrx7 eine Doppelbande auf (Abbildung 24b1). Diese war auf ein überlesenes TAG-Stopcodon (Amber) zurückzuführen. Nach der Mutation des Stopcodons zu

TGA (Opal) wurde auch ScGrx7 als homogenes Protein exprimiert (Abbildung 24b2) [157, 158]. Gereinigtes ScGrx6 war braun gefärbt, ScGrx7 und ScGrx8 waren farblos. Das Absorptionsspektrum von frisch gereinigtem ScGrx6 zeigte zwei lokale Maxima bei 340 und 432 nm (Abbildung 25). Die Mutante ScGrx6^{C136S} war im Gegensatz zum WT-Protein farblos. Bisher wurde angenommen, dass Grx als Monomere vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurde die Quartärstruktur der drei frisch aufgereinigten, rekombinanten Glutaredoxine mittels Gelfiltrationschromatographie untersucht.

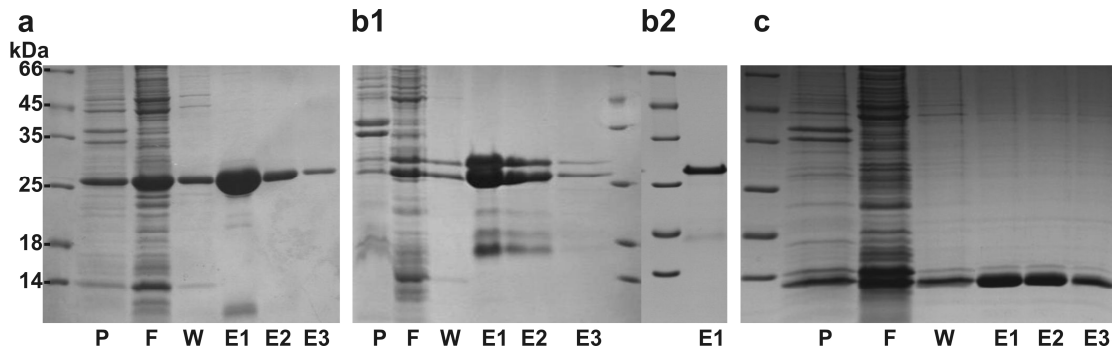


Abbildung 24: Reinigung von ScGrx6-8.

Der Verlauf der Reinigung rekombinanter Proteine mit Ni-NTA. a) ScGrx6 (23,5 kDa). b) ScGrx7 (20,2 kDa), b1: ScGrx7 mit Amber-Stopcodon, b2: ScGrx7 mit Opal-Stopcodon. c) ScGrx8 (13,7 kDa). Alle Proben wurden mit 2-ME versetzt. P: Pellet, F: Flowthrough, W: Wash, E: Elution [158].

Es zeigte sich, dass ScGrx6 zum größten Teil nichtkovalent verknüpfte Homodimere bildet (M_{app} : 57,3 kDa), jedoch auch zu 20-40 % Homotetramere (M_{app} : 119 kDa, Abbildung 26a1). Die Analyse mit reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE zeigte, dass ScGrx6 einen geringen Anteil kovalent verknüpfter Dimere aufweist (Abbildung 26a3). ScGrx7 lag vollständig als nichtkovalent verknüpftes Dimer (M_{app} : 42,2 kDa) und ScGrx8 als Monomer (M_{app} : 14,9 kDa) vor (Abbildung 26b1, c1). Zudem dimerisierte keines der beiden Proteine über kovalente Bindungen (Abbildung 26b3, c2). In einem Fall resultierte die Alterung von ScGrx7 in der Bildung putativer Tetramere (M_{app} : 88,4 kDa, Abbildung 26b2).

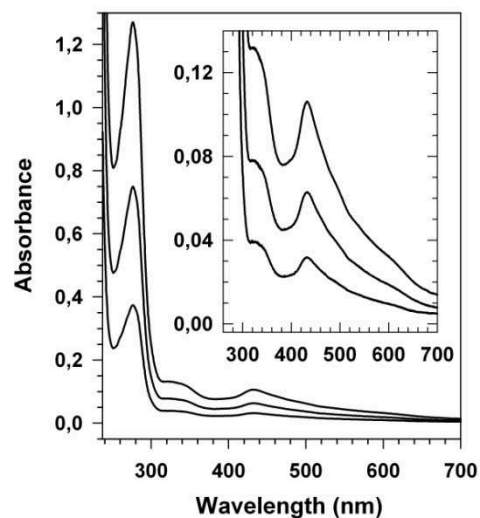


Abbildung 25: ScGrx6 UV-Vis-Spektrum.

Die Spektren von 15, 30 und 55 μ M ScGrx6 werden gezeigt. Im Kasten ist ein vergrößerter Ausschnitt der Spektren dargestellt [158].

Der Chromophor von ScGrx6 war nur in der Tetramerfraktion gebunden, da im Gelfiltrationsdiagramm von ScGrx6 nur in dieser Fraktion eine erhöhte Absorption bei 430 nm auftrat (Abbildung 26a1).

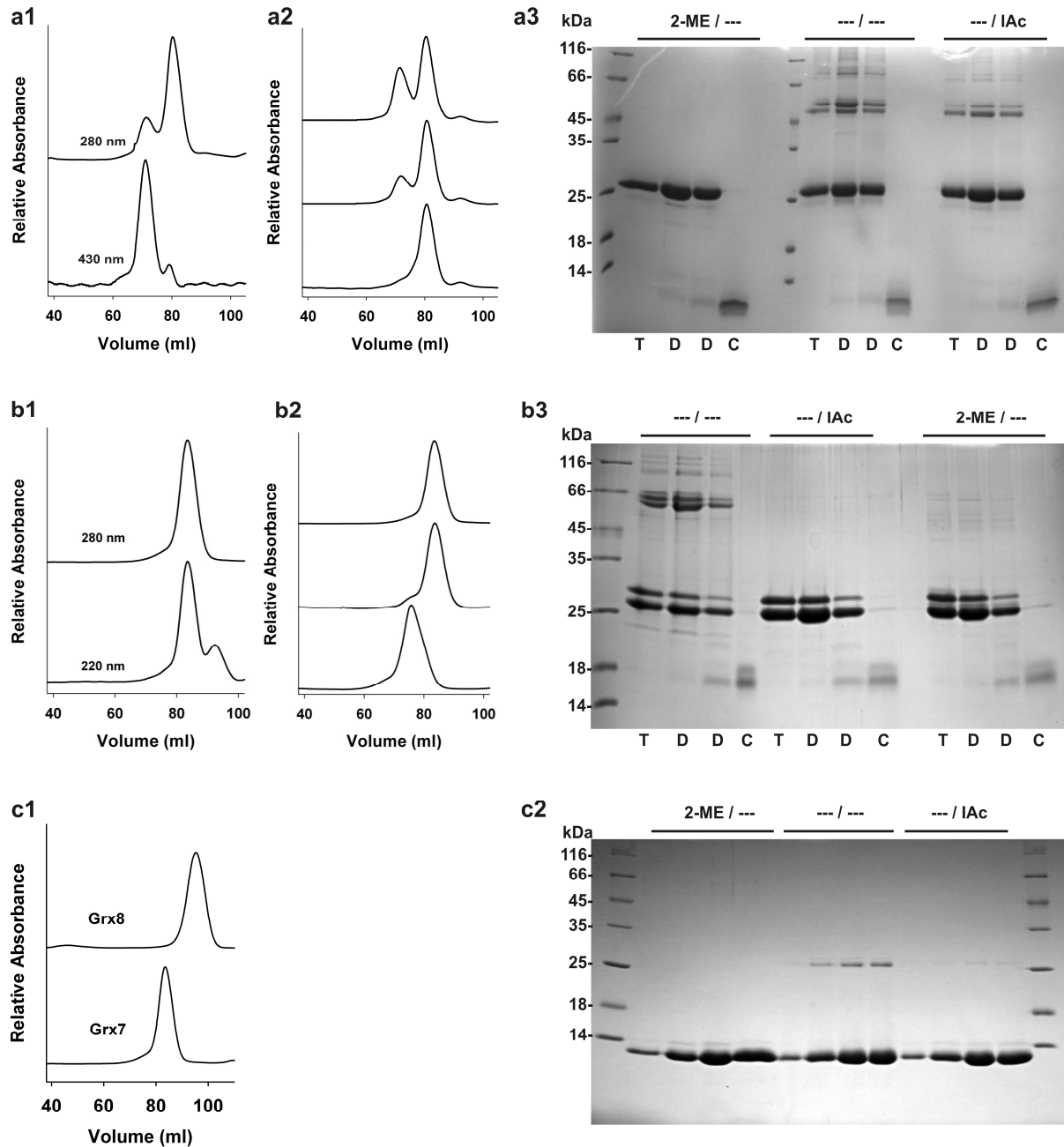


Abbildung 26: ScGrx6-8-Gelfiltrationsanalyse.

Die Oligomerisierung von a) ScGrx6, b) ScGrx7 und c) ScGrx8 wurde mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert. 1) Frisch über Ni-NTA gereinigtes Protein wurde für die Gelfiltration verwendet und bei verschiedenen Wellenlängen detektiert. Der Laufpuffer war: 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, 300 mM NaCl, pH 7,4. 2) Die Alterung der Proteine wurde untersucht. a2) Frisches (oben), 1 Tag altes (Mitte) und eine Woche altes ScGrx6 (unten). b2) Frisches (oben), eine Woche altes (Mitte) und einen Monat altes (unten) ScGrx7. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die verschiedenen Elutionsfraktionen wurden mittels reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE analysiert. Um die Bildung von disulfidverbrückten Oligomeren der Proteine während des Aufkochens der Proben zu verhindern, wurde eine zusätzliche Probe mit 2 mM IAC versetzt. Zuordnung der Fraktionen: T: Tetramer, D: Dimer, C: eine kleine durch Coomassie anfärbbare Bande. Da ScGrx8 in der Gelfiltration als Monomer detektiert wurde, sind alle untersuchten Fraktionen Teil des Monomer-Peaks [157, 158].

Die Farbigkeit von Proteinen kann auf der Bindung von Cofaktoren (siehe 3.4.1) oder Metallionen beruhen. Daher wurde eine Metallionenanalyse des frisch gereinigten Proteins sowie der Tetramerfraktion von ScGrx6 durchgeführt.

Für das gereinigte Protein wurden 0,2-0,3 Eisenionen pro Proteinmolekül nachgewiesen. Dieser Faktor erhöhte sich auf 0,74 Äquivalente in der Tetramerfraktion. Die Dimerfraktionen enthielten kein Eisen [157, 158]. Dieses Ergebnis und die Abwesenheit des Chromophors in der ScGrx6^{C136S}-Mutante weisen auf die Existenz eines FeS-Clusters im Tetramer hin. Die Metallionenanalyse von ScGrx7 und ScGrx8 zeigte, dass keines der beiden Proteine in nennenswertem Maß Eisen-, Kobalt-, Molybdän- oder Nickelionen band.

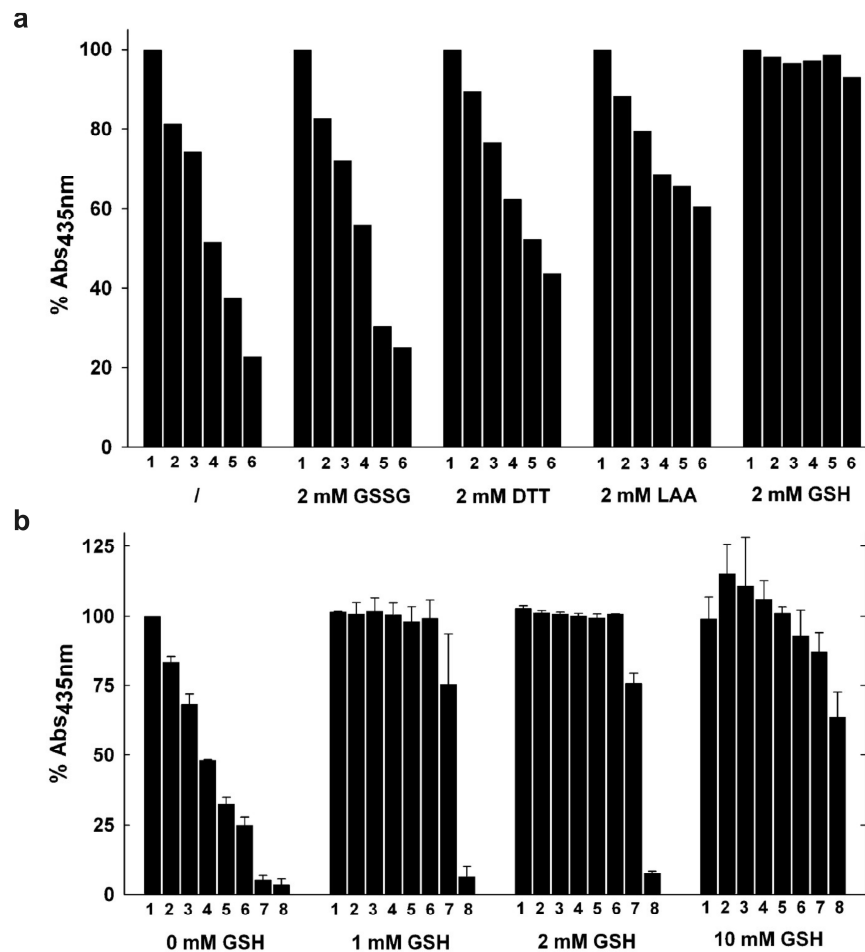


Abbildung 27: Stabilisierung des ScGrx6-Holoproteins.

a) Die stabilisierende Wirkung verschiedener Additiva auf den Chromophor von frisch gereinigtem, rekombinantem ScGrx6-Tetramer wurde photometrisch bei 435 nm und 25 °C untersucht. Die Absorption des verwendeten Puffers (50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 7,4, 2 mM Additiv) wurde von der Messung subtrahiert. DTT: Dithiothreitol, LAA: L-Ascorbinsäure, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid. b) Als Referenz wurde mit der entsprechenden GSH Konzentration versetzter Puffer (50 mM Na_xH_xPO₄, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 7,4) verwendet. Die Absorption von frisch aufgereinigtem ScGrx6 vor Zugabe der Additiva entspricht 100 %. Die Konzentration von ScGrx6 war a: 68 und 72 µM, b: 38 und 56 µM. Die gemessenen Zeitpunkte waren: 1: 0 h, 2: 0,5 h, 3: 1 h, 4: 2 h, 5: 3 h, 6: 4 h, 7: 19 h und 8: 44 h [158].

Die Alterung von ScGrx6 resultierte im Verlust des Tetramers, das Dimer blieb stabil (Abbildung 26a2). Eine mögliche Erklärung für die Alterung des Proteins war dessen Oxidation mit Luftsauerstoff. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob verschiedene Reduktionsmittel

sowie das Oxidationsmittel GSSG eine Auswirkung auf die Verringerung der Tetramerkonzentration bzw. den Verlust des Chromophors haben. Als Vergleich diente unbehandeltes Protein (Abbildung 27).

GSSG wies im Gegensatz zu den anderen getesteten Substanzen keine stabilisierende Wirkung auf. DTT verringerte die Abnahme an Tetramer nur geringfügig, wohingegen L-Ascorbinsäure das Tetramer stabilisierte. Am stärksten wurde das Protein durch GSH stabilisiert (Abbildung 27a). Die stabilisierende Wirkung von GSH war konzentrationsabhängig. Zwischen 1 und 2 mM GSH war kein signifikanter Unterschied zu erkennen, während eine Konzentration von 10 mM GSH initial zu einer Erhöhung der Absorption auf über 100 % führte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ScGrx6-Tetramere über einen labilen FeS-Cluster verbunden sind, welcher durch GSH stabilisiert werden kann.

3.6.1.2 Kristallisation von ScGrx7 und ScGrx8

Die detaillierte Struktur von ScGrx7 und ScGrx8 sollte mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Frisch über Ni-NTA aufgereinigtes, rekombinantes ScGrx7, ScGrx8 und ScGrx8^{C28S} wurde am gleichen Tag mittels Gelchromatographie weiter aufgereinigt und anschließend im Sitting-drop-Verfahren bei 20 °C kristallisiert. ScGrx8 kristallisierte bei sehr unterschiedlichen Bedingungen der Kristallisationskits Classics, Classics lite, pH clear und pH clear II und Konzentrationen von 19 bis 29 mg/ml. Sofort nach dem Pipettieren der verschiedenen Ansätze präzipitierte das Protein zu 7 bis 37 %. Die ersten Kristalle wurden nach vier Tagen beobachtet. Alle Kristalle waren nadelförmig mit Unterschieden in der Verzweigung. Ein größeres Volumen der Kristalle führte zur Bildung von Hohlnaden. Die größten und homogensten Kristalle wurden bei der „Classics“ Bedingung F10 (0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Na-Cacodylat, pH 6,5, 30 % PEG800) gebildet, welche für Feinscreens variiert und für Screens mit verschiedenen Additiva verwendet wurde. Daraus resultierte keine Änderung der allgemeinen Kristallmorphologie. Ein ausgewählter Kristall wurde im Röntgenstrahl gemessen. Es zeigte sich, dass die Kristallstruktur nicht homogen war und der Kristall kein verwertbares Beugungsmuster lieferte. ScGrx7 wurde in Konzentrationen von 12,3 bis 32,1 mg/ml für Kristallisationsexperimente mit den Kits Classics, Classics lite, pH clear und pH clear II verwendet. Die Präzipitationsrate sofort nach dem Pipettieren der Ansätze betrug zwischen 21 und 36 %. Das Protein kristallisierte bei sehr wenigen Bedingungen in einem Zeitraum von 3 bis 10 Tagen. Die homogensten Kristalle wurden bei den Bedingungen Classics B11 (0,1 M Tris, pH 8,5, 20 % (v/v) Ethanol) und Classics lite G1 (0,1 M HEPES, pH 7,5, 1 % PEG400, 1 M AmSO₄) gebildet, jedoch lösten sich diese wieder. Die Kristallisation bei diesen Bedingungen konnte nicht reproduziert werden.

3.7 Katalytische Eigenschaften der neuen Glutaredoxine

3.7.1 Monothiol-Glutaredoxine

Die Funktion der drei neuen Glutaredoxine wurde im HEDS-Assay, dem Standard-Assay für Glutaredoxine, getestet. Alle bisher getesteten Monothiol-Grx sind im HEDS-Assay inaktiv, obwohl verschiedene katalytische Mechanismen wie ein Ping-Pong-Mechanismus die Funktion im HEDS-Assay nicht ausschließen würden [158].

3.7.1.1 ScGrx6 und ScGrx7 sind im HEDS-Assay aktiv

ScGrx6 zeigte deutliche Aktivität im HEDS-Assay, die sich jedoch nicht nach Michaelis-Menten fitten ließ. Der Grund dafür liegt unter Umständen an den unterschiedlichen Proteinspezies und der Instabilität des FeS-Clusters. In Lineweaver-Burk-Plots wurde ein K_m^{app} von 1,5 mM und k_{cat}^{app} von 1-2 s⁻¹ bestimmt. Als Negativkontrolle wurde die vollständig inaktive Mutante ScGrx6^{C136S} verwendet. Die Aktivität der gelchromatographisch getrennten Tetramere und Dimere wurde ebenfalls untersucht. Dabei war die spezifische Aktivität ($v/[E]$) des Dimers doppelt so groß wie die des Tetramers. Die Untersuchung von gealtertem Protein zeigte eine höhere Aktivität als frisch aufgereinigtes ScGrx6 [158].

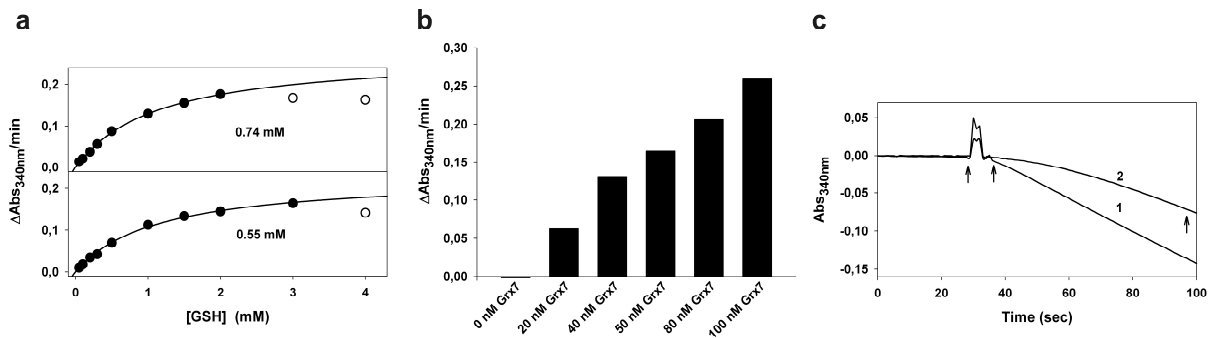


Abbildung 28: ScGrx7 ist im HEDS-Assay aktiv.

Die Oxidation von NADPH wurde spektrophotometrisch bei 340 nm verfolgt. Die Assays in a und b wurden durch Zugabe von HEDS gestartet. a) Michaelis-Menten-Plots von Experimenten mit 0,74 mM (oberer Graph) und 0,55 mM (unterer Graph) HEDS. Bei hohen GSH- und HEDS-Konzentrationen wurde eine Abnahme der Aktivität beobachtet. Diese Werte wurden nicht in den hyperbolischen Fit eingeschlossen (offene Kreise). b) Die im Assay gemessene Aktivität ist von der eingesetzten ScGrx7-Konzentration abhängig. c) Verlauf zweier Reaktionen: eine Basislinie wurde für 30 sec aufgenommen und die Reaktion anschließend durch Zugabe von HEDS (2) bzw. ScGrx7 (1) gestartet. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden entweder sofort (1), oder aufgrund der Lagphase bei Start mit HEDS 1 min nach dem Mischen (2) bestimmt [158].

ScGrx7 war ebenfalls im HEDS-Assay aktiv. Im Gegensatz zu ScGrx6 konnten die Ergebnisse nach Michaelis-Menten gefittet werden, wobei die Aktivität bei hohen HEDS-, oder GSH-Konzentrationen abnahm (Abbildung 28a). Die maximale Aktivität von ScGrx7 war bis zu einer Proteinkonzentration von 50 nM direkt proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration (Abbildung 28b). Die Aktivität des Proteins im Assay war abhängig von mehreren Faktoren, einerseits der Konzentration von HEDS und GSH, andererseits dem Versuchsablauf (Abbildung 29). Wurde die Reaktion durch Zugabe von HEDS gestartet, war die Aktivität geringer (Abbildung 29b, d) und es wurde eine Lagphase der Aktivität beobachtet (Abbildung 28c). Daher wurde die Aktivität in diesen Fällen erst 1 min nach dem Start der Reaktion gemessen. Wurde die Reaktion mit Enzym gestartet, war die Aktivität höher (Abbildung 29a, c). In diesem Fall wurde keine Lagphase beobachtet (Abbildung 28c) und daher die initiale Aktivität bestimmt. Wurde im Assay bei unterschiedlicher HEDS-Konzentration die Konzentration an GSH variiert, blieb K_m^{app} relativ konstant bei $\sim 1,3$ mM und k_{cat}^{app} nahm mit Zunahme der initialen HEDS-Konzentration zu (Abbildung 29a, b). Dies war unabhängig davon, ob die Reaktion mit HEDS oder ScGrx7 gestartet wurde.

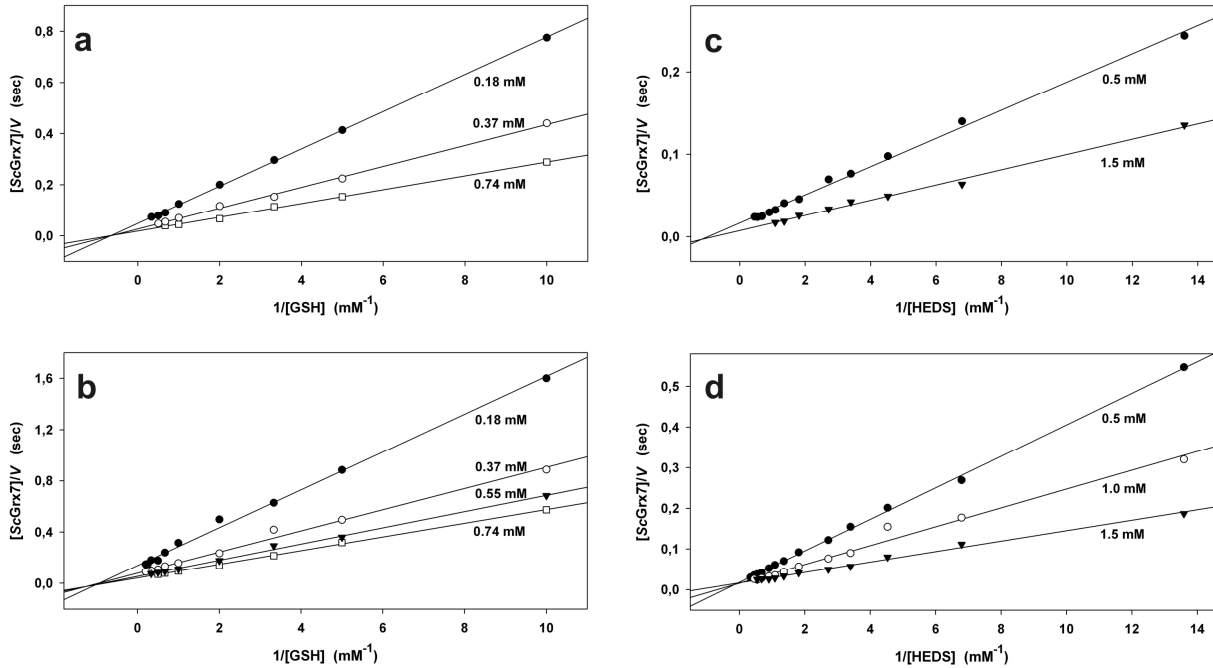


Abbildung 29: Abhängigkeit der ScGrx7-Aktivität im HEDS-Assay von HEDS und GSH.

Die Oxidation von NADPH wurde spektrophotometrisch bei 340 nm verfolgt. Lineweaver-Burk-Plots verschiedener Messungen sind dargestellt. Die apparenten Kinetikkonstanten sind in Tabelle 11 aufgelistet. a und b) Die GSH-Konzentration wurde bei festen HEDS-Konzentrationen variiert. Die initiale HEDS-Konzentration ist in den Graphen angegeben. c und d) die Konzentration von HEDS wurde bei festen GSH-Konzentrationen variiert. Die initiale GSH-Konzentration ist in den Graphen angegeben. Die Reaktionen in a und c wurden mit ScGrx7, die Reaktionen in b und d mit HEDS gestartet [158].

Wurde bei unterschiedlichen initialen Konzentrationen von HEDS die GSH-Konzentration variiert, blieb K_m^{app} ebenfalls konstant und k_{cat}^{app} nahm bei steigender HEDS-Konzentration zu, sofern die Reaktion mit Enzym gestartet wurde (Abbildung 29c). Bei Start der Reaktion mit HEDS verringerte sich K_m^{app} bei steigender GSH-Konzentration, während k_{cat}^{app} eher konstant blieb (Abbildung 29d und Tabelle 11). Die Lineweaver-Burk-Plots dieser Experimente können nicht als Ping-Pong-Mechanismus interpretiert werden, da die Linien nicht parallel verlaufen [158].

variable GSH-Konzentration					variable HEDS-Konzentration				
[HEDS] (mM)	k_{cat}^{app} (s ⁻¹) ^b	K_m^{app} (mM) ^b	k_{cat}^{app} (s ⁻¹) ^c	K_m^{app} (mM) ^c	[GSH] (mM)	k_{cat}^{app} (s ⁻¹) ^b	K_m^{app} (mM) ^b	k_{cat}^{app} (s ⁻¹) ^c	K_m^{app} (mM) ^c
0,18	9	1,4	19	1,3	0,5	29	2,2	42	1,4
0,37	14	1,1	35	1,4	1,0	34	1,5	n.d.	n.d.
0,55	19	1,2	n.d.	n.d.	1,5	31	0,8	76	1,4
0,74	23	1,2	44	1,2					

Tabelle 11

Die Konstanten wurden mittels Hanes Plots bestimmt. Diese sind sehr ähnlich zu den aus Lineweaver-Burk-Plots erhaltenen Parametern. ^b Die Assays wurden durch Zugabe von HEDS gestartet. ^c Die Assays wurden durch Zugabe von ScGrx7 gestartet [158].

3.7.1.2 Ping-Pong-Katalysemechanismus von ScGrx7

Um die Analyse der Reaktionskinetik von ScGrx7 zu vereinfachen, wurde nicht HEDS als Substrat im Assay eingesetzt, da HEDS erst in einer nichtenzymatischen Reaktion mit GSH

das gemischte Disulfid bildet. Stattdessen wurde L-Cystein-Glutathion-Disulfid (GSSCys) verwendet. Im Gegensatz zum HEDS-Assay ergab die Variation von GSH bei unterschiedlichen initialen GSSCys-Konzentrationen im Lineweaver-Burk-Plot gerade, parallele Linien (Abbildung 30a). Dies wies darauf hin, dass ScGrx7 nach einem Ping-Pong-Mechanismus reagiert. Sekundärplots dieser Messungen ergaben einen k_{cat} von 133 s^{-1} und ähnliche K_m Werte von ca. $0,2 \text{ mM}$ für GSH und GSSCys (Abbildung 30b, c). Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) von ScGrx7 war ca. $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [157].

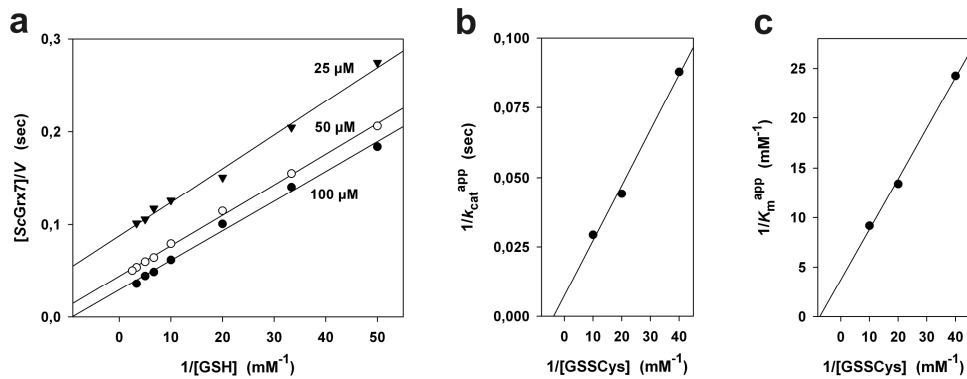


Abbildung 30: Zweisubstratkinetiken von ScGrx7 mit GSH und GSSCys.

Die Oxidation von NADPH wurde spektrophotometrisch bei 340 nm verfolgt. a) Lineweaver-Burk-Plot initialer Experimente bei drei unterschiedlichen Konzentrationen von GSSCys. Die aus b bestimmten Werte für k_{cat} und K_m sind 133 s^{-1} und 135 mM . Die aus c bestimmten Werte, für $K_m(\text{GSH})$ und $K_m(\text{GSSCys})$ sind 266 und 135 mM [158].

Ein weiterer Punkt, der einen Ping-Pong-Mechanismus für ScGrx7 unterstützte, war die volle Aktivität und die Abwesenheit einer Verzögerungsphase bei Einsatz von glutathionyliertem ScGrx7 (ScGrx7-SSG) als Substrat für das GR/GSH-System (siehe Abschnitt 3.7.1.3).

3.7.1.3 Reduktion von ScGrx7-SSG durch das GR/GSH-System

Um den Reaktionsmechanismus von ScGrx7 weiter aufzuklären, wurde ScGrx7 glutathionyliert (ScGrx7-SSG) und als Substrat für das GR/GSH-System eingesetzt. ScGrx7-SSG entspricht einem Zwischenprodukt des potentiellen Ping-Pong-Mechanismus. Die Glutathionylierung von frisch aufgereinigtem ScGrx7 mit GSSG resultierte zu 95% in ScGrx7-SSG und wurde mittels DTNB-Assays und Massenspektrometrie bestätigt [157]. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei Variation der initialen ScGrx7-SSG-Konzentration und 2 mM GSH wurden 10 sec nach Start der Reaktion bestimmt (Abbildung 34b), die tatsächlichen Konzentrationen an ScGrx7-SSG über den Verbrauch an NADPH berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 34d). Diese Auftragung wurde für die Bestimmung der apparenten Konstanten einer Reaktion 1. Ordnung verwendet ($V = k^{\text{app}} \times [\text{ScGrx7-SSG}]$) (Abbildung 34f). Die Reaktionskonstante k^{app} betrug unter den gewählten Bedingungen $0,15 \text{ s}^{-1}$. Bei Start der Messung war deshalb ein Großteil des ScGrx7-SSG bereits verbraucht (Abbildung 34d). Die Variation der initialen GSH-Konzentration zwischen $0,11$ und 4 mM bei $15 \mu\text{M}$ ScGrx7-SSG resultierte 10 sec nach dem Start der Reaktion in konstanten Reaktionsgeschwindigkeiten (Abbildung 34h). Die Reduktionsgeschwindigkeit war unabhängig von der GSH-Konzentration und folgte einer apparenten Kinetik 1. Ordnung (Abbildung 34l). Das kinetische Gesetz für die Reduktion von ScGrx7-SSG wurde demnach bestimmt ($V = 0,15 \text{ s}^{-1} \times [\text{ScGrx7-SSG}]$).

3.7.2 Dithiol-Glutaredoxine

3.7.2.1 Aktivität von ScGrx8 im HEDS-Assay

Die initiale Analyse von ScGrx8 im HEDS-Assay zeigte, dass mikromolare Konzentrationen des Proteins benötigt wurden, um signifikante Aktivitäten zu messen. Bei Verwendung von 25 μM ScGrx8 und millimolaren Substratkonzentrationen, wurde die GR-abhängige Regeneration von GSH geschwindigkeitsbestimmend, wenn weniger als 1 U/ml GR eingesetzt wurde (Abbildung 31b).

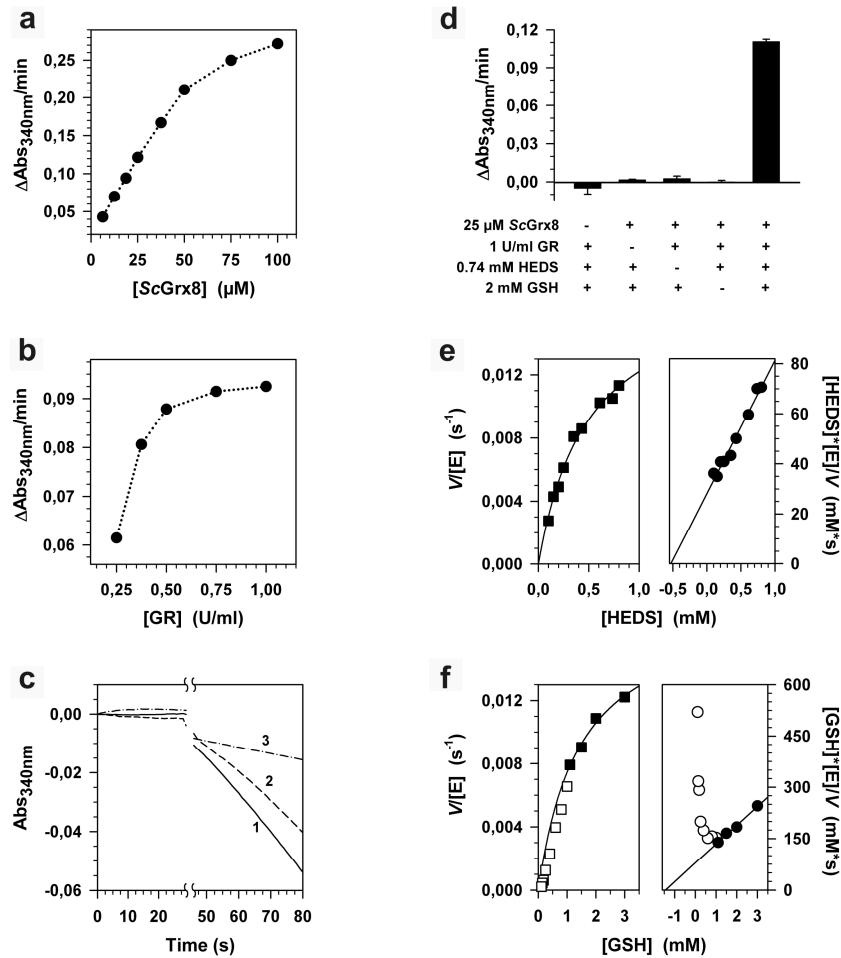


Abbildung 31: Aktivität von ScGrx8 im HEDS-Assay.

Die Oxidation von NADPH wurde bei 340 nm in einem gekoppelten enzymatischen Assay spektrophotometrisch verfolgt. a) Reaktionsgeschwindigkeiten bei 0,74 mM HEDS und 2 mM GSH waren unter einer Enzymkonzentration von 50 μM proportional zur Konzentration von ScGrx8. b) Bei hohen Substratkonzentrationen wurden GR-Konzentrationen unter 1 U/ml geschwindigkeitsbestimmend. c) repräsentativer Verlauf dreier Messungen: Eine Basislinie wurde vor dem Start des Assays mit Enzym (1) bzw. Disulfid (2, 3) aufgenommen. Die Kurven 1 und 2 wurden bei 0,74 mM HEDS und 2 mM GSH aufgenommen. Kurve 3 resultierte aus einer Messung mit 0,4 mM GSH und 0,1 mM GSsCys. d) Der Verbrauch von NADPH im Assay war von HEDS und GSH abhängig und nicht durch oxidiertes ScGrx8 verursacht. Die Probe ohne ScGrx8 enthielt mit NaBH_4 vorbehandelten Elutionspuffer als Kontrolle. e) HEDS-abhängige Aktivität von ScGrx8 folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Ein direkter Plot sowie ein Hanes-Plot (rechts) einer repräsentativen Messung mit 25 μM NaBH_4 reduziertem ScGrx8, 0,74 mM HEDS sowie den angegebenen Konzentrationen an GSH sind dargestellt. f) Die GSH-abhängige Aktivität von ScGrx8 folgte keiner typischen Michaelis-Menten Kinetik. Ein direkter Plot sowie ein Hanes-Plot (rechts) einer repräsentativen Messung mit 25 μM NaBH_4 reduziertem ScGrx8, 0,74 mM HEDS sowie den angegebenen Konzentrationen an GSH sind dargestellt [157].

Die Aktivität von ScGrx8 im Assay war ebenfalls abhängig von der Durchführung des Assays. Bei Start mit HEDS war die Aktivität geringer und eine initiale Lagphase stärker ausgeprägt als beim Start mit Enzym. Die Thioltransferaseaktivität von ScGrx8 war sowohl bei Verwendung von HEDS und GSH als auch GSSCys und GSH sehr gering (Abbildung 31c). Daher wurde untersucht, ob die Aktivität tatsächlich auf das Enzym zurückzuführen war (Abbildung 31d). Durch Verwendung der im Assay inaktiven Mutanten ScGrx8^{C28S} sowie ScGrx8^{C25S} wurde bestätigt, dass die Aktivität von ScGrx8 im Assay nicht durch Spuren von *E. coli*-Enzymen verursacht wurde. Zudem wurde nachgewiesen, dass beide Cysteine des aktiven Zentrums an der Reaktion beteiligt sind. Die Kristallstruktur von HsTrp14 indizierte die Möglichkeit einer internen Disulfidbrücke des SWCPDCV-Motivs. Um auszuschließen, dass die geringe Aktivität von ScGrx8 im HEDS-Assay auf die Reduktion eines internen Disulfides durch NADPH zurückzuführen war, wurde zum einen der Redoxzustand von frisch gereinigtem und gealtertem ScGrx8 bestimmt. Es zeigte sich, dass das frisch gereinigte Protein zu 90 % reduziert vorlag (Abbildung 32).

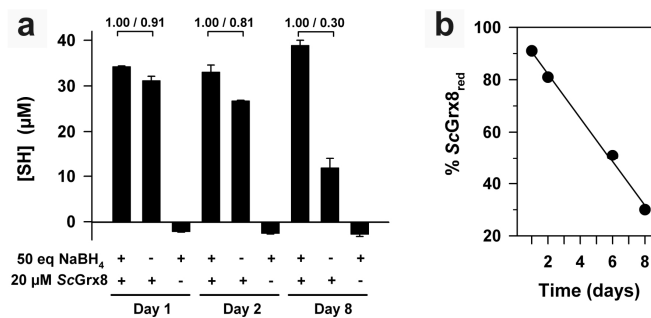


Abbildung 32: Frisch gereinigtes ScGrx8 liegt weitgehend reduziert vor.

a) Die Konzentration von unmodifizierten Thiolgruppen wurde mittels DTNB-Assay bestimmt. Lösungen von 0,16 mM frischem oder gealtertem ScGrx8 wurden für 1,5 h mit 50 äquivalenten NaBH₄ vorbehandelt. Eine Negativkontrolle mit NaBH₄ im Elutionspuffer wurde parallel behandelt. Anschließend wurden die Proben im DTNB-Assay verdünnt, was in einer theoretischen Konzentration an Cystein-Thiolgruppen von 40 µM resultierte. Überschüssiges NaBH₄ hatte keinen Einfluss auf den DTNB-Assay. Das Verhältnis der Thiolkonzentrationen zwischen unbehandelten und NaBH₄-behandelten Proben sind angegeben. b) Die in a) bestimmten Verhältnisse wurden gegen die Zeit aufgetragen und resultieren in einer apparenten Kinetik 0. Ordnung für ScGrx8 ($V = -d[\text{ScGrx8}_{\text{red}}]/dt = k_0^{\text{app}} \approx 0,08 \text{ \% d}^{-1}$ bei 4 °C).

Die maximale Absorptionsänderung durch Reduktion dieser 10 % des Enzyms betrug in etwa $\Delta\text{Abs}_{340} 0,015$, wesentlich weniger als die im Assay gemessenen Werte (Abbildung 31c). Zum anderen wurde NADPH in Abwesenheit von HEDS nicht signifikant oxidiert und die gemessene Aktivität war von allen Assay-Komponenten abhängig (Abbildung 31d). Dennoch wurde für die Bestimmung der Kinetikparameter das mit NaBH₄ reduzierte Protein verwendet. Bei Verwendung von 2 mM GSH und variablen Konzentrationen von HEDS wurde die Kinetik nach Michaelis-Menten gefittet und ein K_m^{app} von 0,5 mM sowie ein $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ von 0,019 s⁻¹ ermittelt (Abbildung 31e). Wurde die GSH-Konzentration bei 74 mM HEDS variiert, ergab sich eine in etwa sigmoidale Kurve, deren Wendepunkt bei 1 mM GSH lag (Abbildung 31f). Dies könnte der physiologischen Konzentration entsprechen. Bei höheren GSH-Konzentrationen wurde ein K_m^{app} von ~1,5 mM und ein $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ von 0,018 s⁻¹ ermittelt (Abbildung 31f).

3.7.2.2 Reduktion von ScGrx8 Disulfid durch GSH

Im Vergleich von ScGrx8 mit ScGrx7 zeigte sich, dass sich der K_m^{app} beider Proteine in einem ähnlichen Bereich bewegte, k_{cat}^{app} von ScGrx8 jedoch drei Zehnerpotenzen kleiner war. Daher wurde untersucht, welcher Teil der HEDS-Reaktion langsamer verlief als bei ScGrx7. Im ersten Schritt wurde getestet ob ScGrx8-Disulfid (ScGrx8(S₂)) ein Substrat des GR/GSH-System ist.

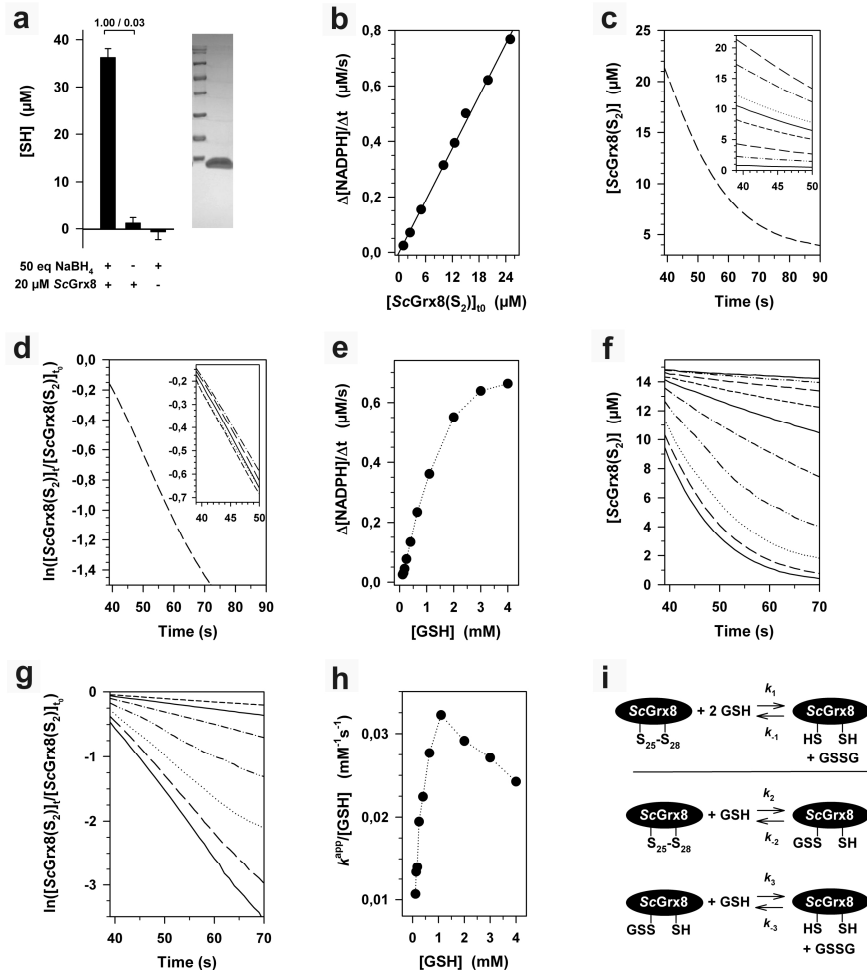


Abbildung 33: Reduktion von ScGrx8(S₂) durch GSH.

Frisch gereinigtes Protein wurde mit Diamid oxidiert und als Substrat für das GR/GSH-System verwendet. a) Reversible, intramolekulare Disulfidformation nach der Oxidation mit Diamid wurde mittels DTNB-Assay und nicht reduzierender SDS-PAGE bestätigt. Die Resultate von Assays die mit 0,1 mM NADPH, 2 mM GSH und 1-25 µM ScGrx8(S₂) durchgeführt wurden sind in b-d gezeigt. b) Reaktionsgeschwindigkeiten zehn Sekunden nach dem Start der Reaktion wurden gegen die initiale Konzentration von ScGrx8(S₂) aufgetragen. c) Die tatsächlichen Konzentrationen an ScGrx8(S₂) wurden anhand des NADPH-Verbrauchs berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. d) Die Reduktion von ScGrx8(S₂) folgte einer apparenten Kinetik 1. Ordnung. Der Wert für k^{app} von 0,045 s⁻¹ wurde anhand der negativen Steigungen der geraden Linien bestimmt und war unabhängig von der ScGrx8(S₂)-Konzentration. Alternativ wurde die Konzentration an GSH (0,1-4 mM) bei einer initialen Konzentration an ScGrx8(S₂) von 15 µM variiert. Diese Experimente sind in e-h gezeigt. e) Reaktionsgeschwindigkeiten zehn Sekunden nach dem Start der Reaktion wurden gegen die initiale Konzentration von ScGrx8(S₂) aufgetragen. f) Die tatsächlichen Konzentrationen an ScGrx8(S₂) wurden anhand des NADPH-Verbrauchs berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. g) Die Reduktion von ScGrx8(S₂) folgte bei allen getesteten GSH-Konzentrationen einer apparenten Kinetik 1. Ordnung. h) Die Korrelation zwischen k^{app} aus g und der verwendeten Konzentration an GSH ist komplex und folgt keiner einfachen Reaktion 1. oder 2. Ordnung. i) Potentielle geschwindigkeitsbestimmende Schritte der GSH-abhängigen Reduktion von ScGrx8(S₂) [157].

Durch Diamid oxidiertes ScGrx8 lag zu 95 % als internes Disulfid vor, intermolekulare Disulfide wurden nicht detektiert (Abbildung 33a). Die Variation der ScGrx8(S₂)-Konzentration bei 2 mM GSH ergab einen linearen Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 33b). Die tatsächliche Konzentration an ScGrx8(S₂) wurde anhand des NADPH-Verbrauchs berechnet, gegen die Zeit aufgetragen und ergab exponentielle Kurven (Abbildung 33c). Basierend auf diesen Berechnungen folgte die Reduktion von ScGrx8(S₂) durch GSH einer Kinetik 1. Ordnung ($V=k^{app}x[ScGrx8(S_2)]$) mit einem konstanten Wert für k^{app} von $\sim 0,045\text{ s}^{-1}$ (Abbildung 33d). Die k^{app} -Abhängigkeit von der GSH-Konzentration ist in (Abbildung 33e-h) zusammengefasst. Bei Verwendung von 15 μM ScGrx8(S₂) und variablen Konzentrationen von GSH zeigte die Reaktionsgeschwindigkeit eine hyperbolische Korrelation (Abbildung 33e). Wiederum wurde die tatsächliche ScGrx8(S₂)-Konzentration berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 33f) und ergab eine apparente Reaktionskinetik 1. Ordnung. Dabei stieg k^{app} bei steigender GSH-Konzentration (Abbildung 33g). Die Analyse der Steigungen wies auf einen komplexen Zusammenhang zwischen k^{app} und der GSH-Konzentration hin (Abbildung 33h). Bei Konzentrationen unter 1 mM GSH vergrößerte sich der Quotient $k^{app}/[GSH]$ mit steigender GSH-Konzentration. Bei Konzentrationen über 1 mM GSH verringerte sich der Wert. Verschiedene hypothetische, reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Schritte der Reduktion von ScGrx8(S₂) zeigt Abbildung 33i. Eine Erklärung wäre die Bildung eines ternären Komplexes ($k^{app}=k_1x[GSH]^2$), jedoch resultierte die Auftragung von k^{app} gegen $[GSH]^2$ nicht in geraden Linien. Eine weitere Erklärung wäre die Reaktion eines binären Komplexes zwischen GSH und ScGrx8(S₂) ($k^{app}=k_2x[GSH]$) oder GSH und dem gemischten Disulfid ($k^{app}=k_3x[GSH]$). Die Auftragung von k^{app} gegen die GSH-Konzentration resultierte jedoch in einer sigmoidalen Kurve. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion von ScGrx8(S₂) nach einem komplexeren Mechanismus verläuft.

3.7.2.3 Reduktion von ScGrx8-SSG durch GSH

Die geringe Aktivität des Enzyms im HEDS-Assay könnte ebenfalls auf einer langsamen Reduktion des glutathionylierten ScGrx8 (ScGrx8-SSG) beruhen, weshalb diese Reaktion weiter untersucht wurde. Die Glutathionylierung von ScGrx8 resultierte in oxidiertem Protein (ScGrx8(S₂)). Daher wurden die beiden Mutanten ScGrx8^{C25S} und ScGrx8^{C28S} auf ihre Glutathionylierungseigenschaften getestet. Es zeigte sich, dass ScGrx8^{C25S} im Gegensatz zu ScGrx8^{C28S} nicht glutathionyliert werden kann, was dem traditionellen Katalysemodell entspricht (Abbildung 4) [157]. Deswegen wurde die Mutante ScGrx8^{C28S} für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die initiale ScGrx8^{C28S}-SSG-Konzentration wurde bei 2 mM GSH variiert, die tatsächliche Konzentration an ScGrx8^{C28S}-SSG über den Verbrauch an NADPH berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Diese Werte wurden verwendet, um die Konstanten einer apparenten Kinetik 1. Ordnung zu bestimmen ($V=k^{app}x[ScGrx8^{C28S}\text{-SSG}]$). Es wurde eine Konstante k^{app} von $0,029\text{ s}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 34c, d). Die Variation der initialen ScGrx8^{C28S}-SSG-Konzentration von 0,11 bis 15 μM (Abbildung 34g) folgte einer apparenten Reaktion 1. Ordnung, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren GSH-Konzentrationen deutlich stieg. Das kinetische Gesetz für die Reduktion von ScGrx8^{C28S}-SSG konnte aufgrund von komplexeren Zusammenhängen zwischen k^{app} und $[GSH]$ nicht bestimmt werden.

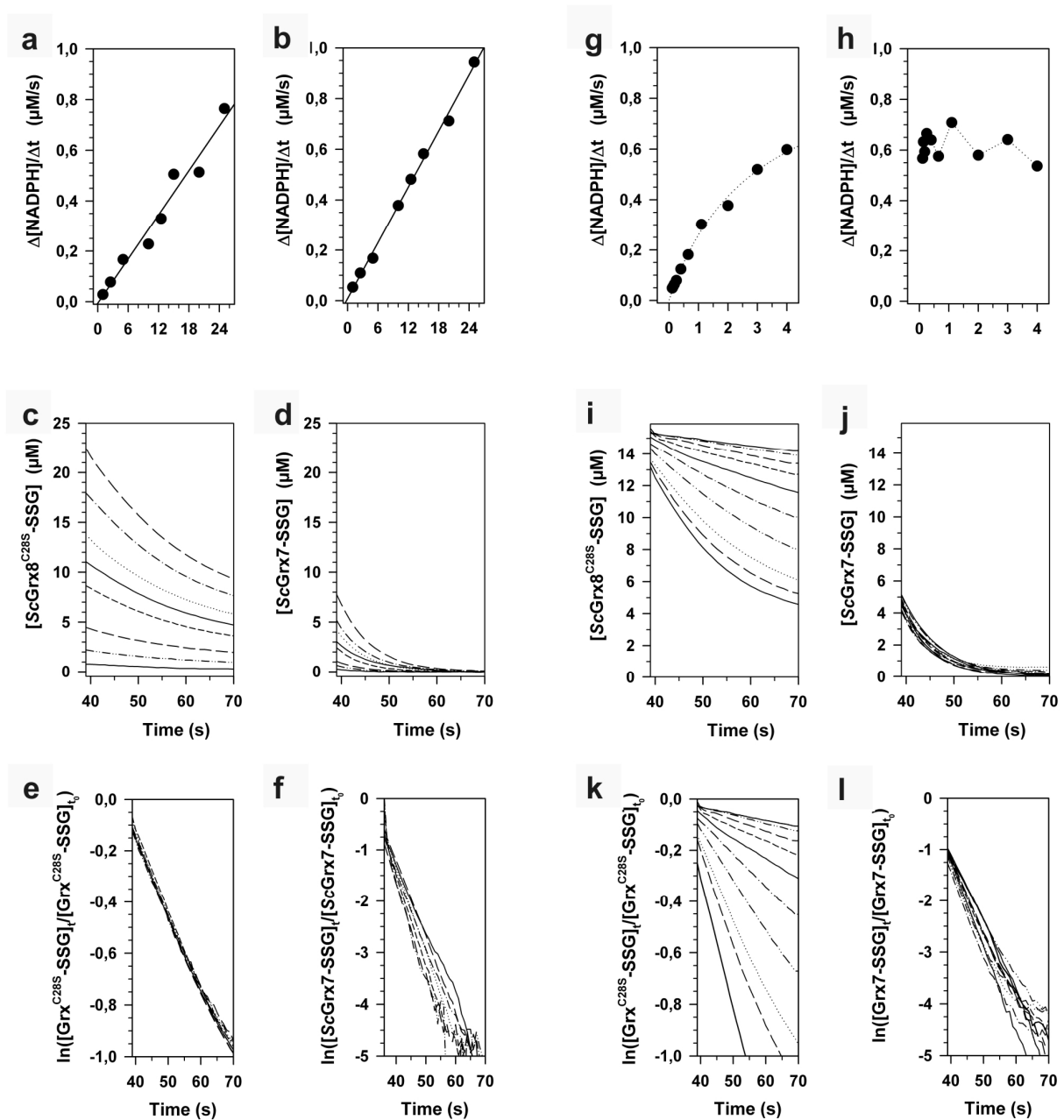


Abbildung 34: Reduktion von glutathonyliertem ScGrx7 und ScGrx8^{C28S} durch das GR/GSH-System.

Frisch gereinigtes Protein wurde mit GSSG oxidiert und als Substrat für das GR/GSH-System verwendet. Die Assays in a-f wurden mit 1 U/ml Hefe-GR, 1 mM NADPH, 2 mM GSH und 1-25 µM Grx-SSG durchgeführt. a) Reaktionsgeschwindigkeiten 10 sec nach Start der Reaktion wurden gegen die initiale Konzentration von ScGrx8^{C28S}-SSG aufgetragen. b) Analoges Experiment mit ScGrx7-SSG. Die tatsächlichen Konzentrationen an ScGrx8^{C28S}-SSG (c) und ScGrx7-SSG (d) wurden anhand des Verbrauchs an NADPH berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Reduktion von ScGrx8^{C28S}-SSG (e) und ScGrx7-SSG (f) verlief nach einer apparenten Reaktion 1. Ordnung. Negative Steigungen und gerade Linien wurden für die Abschätzung der Werte von k^{app} verwendet. In beiden Fällen waren die Werte unabhängig von der Proteinkonzentration. Alternativ wurde die GSH-Konzentration (0,1-4 mM) in Assays mit 15 µM Grx-SSG variiert. Die Resultate dieser Messungen sind in g-l zu sehen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten zehn Sekunden nach der Messung wurden gegen die GSH-Konzentration aufgetragen. Die tatsächlichen Konzentrationen an ScGrx8^{C28S}-SSG (i) und ScGrx7-SSG (j) wurden anhand des Verbrauchs an NADPH berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Beide Reaktionen folgten apparenten Gesetzen 1. Ordnung wobei k^{app} Werte von ScGrx8^{C28S}-SSG mit steigender GSH-Konzentration anstiegen (k), während sie im Fall von ScGrx7-SSG konstant blieben (l) [157].

3.7.3 Reduktion von ScGrx8(S₂) und glutathionyliertem ScGrx7 durch Hefe-TrxR

Für einige Grx wie EcGrx4 und das mitochondriale hsGrx wurde gezeigt, dass diese Elektronen von TrxR akzeptieren [166, 225]. Da ScGrx8 Ähnlichkeit zu Trx aufweist wurde getestet, ob dieses Protein sowie ScGrx7-SSG ebenfalls durch TrxR reduziert werden. Es zeigte sich, dass keines der beiden Proteine im Assay als Substrat von TrxR dient [157].

3.7.4 ScGrx8 Aktivität im Insulin-Assay

Des Weiteren wurde untersucht, ob ScGrx6-8 aufgrund der ungewöhnlichen Struktur (und Ähnlichkeit zu Thioredoxinen) im Insulin-Assay aktiv sind. Sowohl ScGrx6 als auch ScGrx7 sind in diesem Assay inaktiv [158], während ScGrx8 eine geringe, enzymkonzentrationsabhängige Aktivität besitzt [157].

4 Diskussion

4.1 Die Zusammensetzung der Nicht-Opisthokonten-MPI-Maschinerie unterscheidet sich deutlich von den bekannten Maschinerien

In silico-Analysen der Genome nicht zu den Opisthokonten gehöriger Protisten zeigen, dass es in diesen Organismen deutliche Unterschiede zu den vor allem in Pilzen erforschten MPI-Modellsystemen gibt. So weist der Kandidat für Tom22 aus *P. falciparum* im Gegensatz zu seinem Homolog aus Hefe keine negativ geladene, zytosolische Rezeptordomäne auf [190], deren Funktion in ScTom22 die Erkennung positiver Vorläuferproteine ist [226]. Auch die Signalsequenzen unterscheiden sich gegebenenfalls deutlich. Während der Apikomplexa-Kandidat für Tom40 eine typische C-terminale Signalsequenz aufweist, die etwas vom β -Barrel-Signal nach Kutik abweicht, fehlt diese in den Kinetoplastiden Kandidaten [190, 227]. Die Identifizierung von potentiellen Tom70 Kandidaten erschwerte sich, da Tetratricopeptid-Domänen in vielen Proteinen wie z. B. Hsp90 vorhanden sind. Daher kann weder ausgeschlossen noch verifiziert werden, dass diese Proteine in den untersuchten Protisten vorkommen. Gerade in Kinetoplastiden zeigen sich deutliche Unterschiede zu den klassischen MPI-Systemen. So ist die Sequenzähnlichkeit der Kinetoplastiden-Tim50-Kandidaten zu ScTim50 sehr gering. Allerdings wird der Kandidat von *T. cruzi* durch eine von mehreren Programmen vorhergesagte, mitochondriale Lokalisation unterstützt [190]. Des Weiteren wurden *in silico* ursprünglich nur drei unterschiedliche kleine-Tim-Proteine in Kinetoplastiden identifiziert, welche Tim 9, 10 und 13 zugeordnet wurden [113]. Zusätzlich zu diesen Kandidaten wurde in dieser Arbeit ein weiterer Kandidat identifiziert (Abbildung 5). Die Sequenzähnlichkeit dieses neuen Proteins ist geringer als die der bereits bekannten Kandidaten und die Schlaufe, welche die beiden Cx_3C -Motiv tragenden α -Helices verbindet, ist länger. Die Zuordnung der vier klassischen Kandidaten ist nicht eindeutig. So zeigt das Protein Q4QBW9 von *L. major* im ersten Motiv (ExCFNLC x_2 E) eine deutliche Ähnlichkeit zu ScTim9. Das zweite Motiv hingegen (KxEx $_2$ CIDRC x_2 RY) ähnelt eher Tim10/12 aus Hefe und beide Motive sind, wie in ScTim10, durch 16 Aminosäuren statt 15, wie in ScTim9, getrennt. Zusätzlich zu diesen vier Proteinen wurde ein weiteres kleines-Tim-ähnliches Protein in Kinetoplastiden identifiziert. Dieses zeichnet sich durch das Fehlen der Cysteine C1 und C4 und somit der ersten Disulfidbrücke aus (Abbildung 5). Diese Unterschiede und die Abwesenheit von Mia40 in Kinetoplastiden lassen darauf schließen, dass sich der Aufbau der Proteinimportmaschinerien in Nicht-Opisthokonten deutlich von Opisthokonten unterscheidet [190].

4.2 Funktionelle Konservierung des MPI in Kinetoplastiden trotz fehlender Komponenten

Trotz der bereits erwähnten Unterschiede zwischen den Importmaschinerien von Opisthokonten und Kinetoplastiden (siehe 1.4.3, 3.1, 3.2.1), wurden in dieser Arbeit MPI-Substratproteine aus Hefe in isolierte Leishmanienmitochondrien importiert und umgekehrt. In den folgenden Abschnitten werden die Importmaschinerien der verschiedenen Kompartimente verglichen und Theorien zur evolutionären Entstehung der unterschiedlichen Komplexe vorgestellt.

4.2.1 Die MPI-Komplexe der OM

4.2.1.1 Kinetoplastiden verfügen über eine zu TOM alternative Translokase

Der zentrale Eintrittsort von Proteinen in Mitochondrien, der TOM-Komplex, wurde in keiner der bisherigen *in silico*-Studien in Kinetoplastiden identifiziert. Dies führte zu der Vermutung, dass gerade das zentrale Protein Tom40 in diesen Organismen verloren ging [91, 228]. Auch in dieser Arbeit wurde, abgesehen vom *T. cruzi* Protein, kein überzeugender Kinetoplastiden-Tom40-Kandidat identifiziert. Eine Erklärung dafür, dass eine Identifizierung *in silico* nicht möglich ist, bietet die geringe Sequenzkonservierung von β -Barrel-Proteinen, wie für die Tom40-Kandidaten von *Giardia* und *E. histolytica* gezeigt wurde [91, 228]. Eine weitere Möglichkeit für die Abwesenheit des TOM-Komplexes ist eine unspezifische Pore in der OM, welche den Eintritt von Proteinen in die Mitochondrien ermöglicht. Die wahrscheinlichste Möglichkeit ist eine Art TOM-Komplex, welcher die Signalsequenzen unterschiedlicher Spezies erkennt. Diese Theorie wird durch den speziesunspezifischen Import von Leishmanienproteinen in Hefe (Abbildung 11) sowie die Identifizierung einer zur Omp85-Superfamilie gehörenden archaischen Translokase der mitochondrialen Außenmembran (ATOM) in *T. brucei* unterstützt [131]. In diesem Fall würden MPI Substratproteine sowohl aus Opisthokonten als auch aus Kinetoplastiden über ATOM in Leishmanienmitochondrien importiert werden.

4.2.1.2 Die Kernkomponenten des TOB-Komplexes sind evolutionär konserviert

β -Barrel-Proteine werden in Opisthokonten über den TOB-Komplex mit dem zentralen Protein Tob55 in die mitochondriale Außenmembran importiert. Dieser Importweg ist evolutionär stark konserviert. So weisen die zentralen Komponenten Omp85 in Bakterien und Tob55 in Eukaryoten eine hohe funktionale Ähnlichkeit auf [229]. Die starke Konservierung des Importweges zeigt sich auch darin, dass sowohl ScPorin als auch LtTob55 erfolgreich in Opisthokonten- und Kinetoplastidenmitochondrien importiert wurden (Abbildung 8c, Abbildung 10a, Abbildung 11a). Dies deutet darauf hin, dass in Kinetoplastiden ein konservierter, β -Barrelproteinimportierender TOB-Komplex existiert.

4.2.1.3 Die Rezeptorproteine der OM MPI-Komplexe sind nicht konserviert

Ein weiterer deutlicher Unterschied der MPI-Maschinerien von Nicht-Opisthokonten zu den klassischen Modellen ist die wahrscheinliche Abwesenheit von klassischen TOM- und TOB-Komplex-Rezeptoren (Tabelle 8). Diese werden in Opisthokonten für die Erkennung mitochondrialer Importsignale benötigt [15, 230, 231]. Eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit der Rezeptorproteingene liefert der deutliche Unterschied der Signalsequenzen von Proteinen parasitischer Protozoen im Vergleich zu Opisthokonten. Diese unterscheiden sich trotz der funktionellen Konservierung (Abbildung 10, Abbildung 11) deutlich in Hinblick auf Länge und Aminosäurezusammensetzung [91, 232]. Insofern ist auch eine strukturelle und kompositionelle Variation der Rezeptormoleküle denkbar. So scheint die stark negativ geladene zytosolische Rezeptordomäne von Tom22 in Nicht-Opisthokonten wie Plasmodium (Tabelle 8) zu fehlen. Frühere *in silico*-Studien weisen darauf hin, dass die Rezeptoren Tom20 und Tom70 rein auf Opisthokonten beschränkt sind [233]. Diese Resultate zeigen, dass der Import von Proteinen durch die mitochondriale OM und die Insertion von β -Barrel-Proteinen in die OM

trotz funktioneller Konservierung deutlich von den klassischen Modellen abweicht. Bisher ist jedoch wenig über die Zusammensetzung und Funktionsweise des ATOM-Komplexes in Kinetoplastiden, oder die Erkennung von β -Barrel-Proteinen an der OM bekannt [190].

4.2.1.4 Evolutionäre Entstehung der TOM-Komplexe

Die evolutionäre Entstehung der unterschiedlichen TOM-Komplexe kann durch verschiedene Szenarien erklärt werden. Einerseits durch die alleinige Existenz einer klassischen TOM-Kernkomponente (Eukaryot A), oder aber eine Kombination dieser Kernkomponente mit einer weiteren Komponente TomX (Eukaryot B). Andererseits ist auch eine ursprüngliche durch TomX gebildete Pore denkbar (Eukaryot C) (Abbildung 35a). Im Fall von Eukaryot A könnten sich die Sequenzen von Tom40 und den TOM-Rezeptoren im Laufe der Evolution stark verändert haben, wodurch die *in silico*-Identifizierung von Tom40* in einigen Organismen (Abbildung 35a, 1a), im Gegensatz zu anderen (Abbildung 35a, 1b) erschwert ist. So haben β -Barrel-Proteine von *E. histolytica* und *Giardia* nur eine sehr geringe Sequenzähnlichkeit zu Tom40-Proteinen aus Opisthokonten [234, 235]. Des Weiteren könnten einige TOM-Rezeptoren durch bisher unbekannte Proteine ersetzt worden sein (Abbildung 35a, 2). Im Szenario Eukaryot B sind auch zwei unterschiedliche, ursprüngliche Komplexe möglich, welche eine ähnliche Funktion ausübten. Dabei würde der Verlust von Tom (Abbildung 35a, 3a) oder TomX (Abbildung 35a, 3b) die Abwesenheit eines TOM-Komplexes in Kinetoplastiden erklären. Im Fall von Eukaryot C könnte Tom40 sekundär von einigen (Abbildung 35a, 4a) jedoch nicht allen (Abbildung 35a, 4b) Organismen aufgenommen worden sein. Neue Erkenntnisse indizieren, dass TomX ein Vorläufer des ATOM-Komplexes in Kinetoplastiden ist, was auf einen bakteriellen Ursprung dieser Komponente schließen lässt [131]. Beide Varianten, Szenario 3b und 4b (Abbildung 35a) sind möglich, jedoch wurde Eukaryot C als letzter gemeinsamer Vorfahr im Hinblick auf die Evolution von Tom40 und ATOM durch Pusnik (2011) favorisiert [131, 190]. Um die evolutionäre Entstehung der verschiedenen Translokasen zu klären sind, weitere Experimente unumgänglich. So ist es unter anderem notwendig die Rezeptorproteine der variierenden TOM-Komplexe zu identifizieren und zu charakterisieren um Aufschlüsse über deren Funktionsweise und die grundlegenden Importsignale zu erhalten. Dabei könnten die in Kapitel 3.5 vorgestellten Konstrukte für die Identifizierung verwendet werden.

4.2.2 Die MPI-Komplexe der IM

4.2.2.1 Der OXA-Komplex ist in Kinetoplastiden partiell konserviert

Einige Proteine werden aus der mitochondrialen Matrix über den OXA-Komplex in die IM inseriert. Dieser Importweg ist evolutionär stark konserviert [91, 235]. Dies scheint auch in Kinetoplastiden der Fall zu sein, in denen zumindest die zentrale Komponente Oxa1 evolutionär konserviert ist [190].

4.2.2.2 Der TIM23-Komplex ist in Kinetoplastiden deutlich verändert

In Opisthokonten werden Matrixproteine über den TIM23-Komplex mit den zentralen Komponenten Tim17 und Tim23 in die Matrix importiert. Der Import und die Prozessierung des Hefeproteins Su9 in Leishmanienmitochondrien (Abbildung 10b) bestätigt frühere Experimente zu

N-terminalen Matrixsignalsequenzen, in welchen Fusionsproteine in Mitochondrien aus Kinetoplastiden [91, 118, 232] und Apikoplasten [205, 236, 237] importiert wurden.

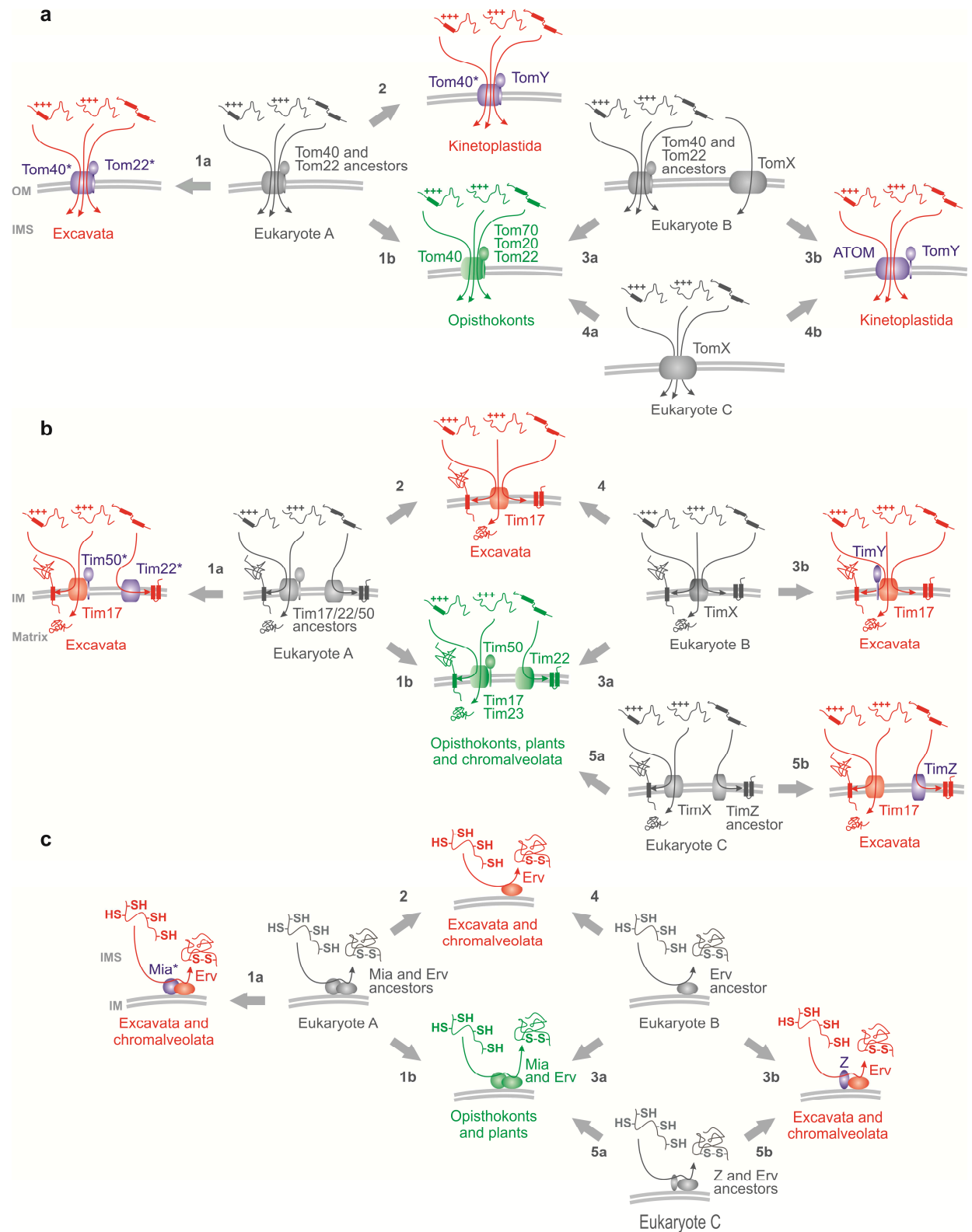


Abbildung 35: Evolutionsmodelle der MPI-Maschinerie.

a) Evolution des TOM-Komplexes. b) Evolution der TIM23- und TIM22-Komplexe. c) Evolution des Mia-Erv-Systems. Mutmaßliche Proteine sind blau dargestellt [190]. Details siehe Text.

Daher überrascht, dass in dieser und anderen Arbeiten [91, 190, 238] *in silico* nur ein zu Tim17 homologes Protein identifiziert wurde. Trotz dieses gravierenden Unterschiedes scheint der grundlegende Importmechanismus von Proteinen mit N-terminaler Matrixsignalsequenz durch die IM unter Eukaryoten funktionell konserviert zu sein.

Die zweite Funktion des TIM23-Komplexes in Opisthokonten ist der laterale Import von Proteinen in die IM [15, 230, 231]. Diese Proteine zeichnen sich durch ein an die N-terminale Signalsequenz anschließendes Transmembransegment aus. Ein Markerprotein dieses so genannten Stop-Transfer-Importweges, Dld, wird ebenfalls in Leishmanienmitochondrien importiert (Abbildung 10c) und deutet auf die Existenz dieses Importweges in Kinetoplastiden hin. Allerdings ist die Importeffizienz sehr gering, weshalb keine genaue Aussage über die Prozessierung des Proteins gemacht werden kann.

4.2.2.3 Der klassische TIM22-Komplex ist in Kinetoplastiden nicht nachweisbar

Ein weiterer Importweg von Opisthokontenproteinen mit multiplen Transmembransegmenten in die mitochondriale IM führt über den TIM22-Komplex [15, 230, 231]. In Kinetoplastiden wurde Tim22, das zentrale Protein des Komplexes durch *in silico*-Studien nicht identifiziert [91] (Tabelle 8). Dennoch wurden die Proteine ScAAC (Abbildung 10d) sowie LtTim17 (Abbildung 11b) erfolgreich importiert. Dies zeigt eine evolutionäre Konservierung des Importweges an, welche ebenfalls durch eine frühere Importstudie des AAC-Homologen aus *E. histolytica* in Hefemitochondrien unterstützt wird [235]. Die Proteine Tim17/22/23 sind Homologe, welche in vielen Organismen inklusive Apicomplexa vorkommen (Tabelle 8). Der einzige Vertreter dieser Familie in Kinetoplastida kann aufgrund von Peptidmotiven eindeutig als Tim17 identifiziert werden [91, 238]. Dies weist darauf hin, dass der TIM22-Komplex abwesend und der TIM23-Komplex in Kinetoplastiden deutlich verändert ist [190]. In einer neuen Studie an *T. brucei* wurden weitere Komponenten des TIM17-Komplexes identifiziert, welche am Import von Proteinen mit N-terminalen Signalsequenzen beteiligt sind. Diese Kandidaten weisen keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Tim-Proteinen auf, was ebenfalls auf einen deutlich abweichenden Aufbau des Kinetoplastiden-TIM17-Komplexes schließen lässt [239].

4.2.2.4 Evolutionäre Entstehung der TIM-Komplexe

Es gibt drei mögliche Szenarien für die Entstehung eines abweichenden TIM-Komplexes. Die Anwesenheit der Vorläufer der TIM23- und TIM22-Komplexe (Eukaryot A), eines ursprünglichen Tim17/22/23-Proteins (TimX), welches Substratproteine sowohl in die IM als auch in die Matrix importierte (Eukaryot B) [91] oder eines TimX in Kombination mit einer unbekannt Komponente TimZ (Eukaryot C) (Abbildung 35b). Im Falle des Eukaryot A könnte sich die Sequenz der Rezeptormoleküle sowie Tim22 im Laufe der Evolution signifikant geändert und zur Entstehung von Tim22* sowie Tim50* geführt haben. Damit wäre die *in silico*-Identifizierung dieser Proteine in einigen Organismen stark erschwert (Abbildung 35b, 1a). Eine andere Möglichkeit wäre der sekundäre Verlust von Tim22 in einigen Fällen (Abbildung 35b, 2). Im Falle des Urproteins TimX (Eukaryot B) wäre die Entstehung der TIM22/23-Komplexe durch Genduplikation in einigen (Abbildung 35b, 3a), jedoch nicht allen Abstammungslinien (Abbildung 35b, 3b) möglich. Ebenso könnten zusätzliche Komponenten wie Tim50 (Abbildung 35b, 3a), oder denkbare Rezeptorproteine TimY (Abbildung 35b, 3b) eine Lösung für ähnliche Probleme

darstellen. Alternativ könnten Eukaryoten wie Kinetoplastiden auch dem Eukaryoten B ähneln (Abbildung 35b, 4). Geht man Bei Eukaryot C von der Anwesenheit eines unbekanntes Proteins TimZ im ursprünglichen Organismus aus, so könnte dieser als Folge der Genduplikation von TimX durch Tim22 ersetzt worden (Abbildung 35b, 5a) oder in Organismen wie den Kinetoplastiden bis heute erhalten sein (Abbildung 35b, 5b) [190]. Für gesicherte Aussagen zur Evolution der MPI-Komplexe der IM sind viele weitere Untersuchungen notwendig. So müssten die verschiedenen Komplexe z. B. mittels Pulldown-Experimenten wie in Abschnitt 3.5 beschrieben isoliert und deren Komponenten anschließend bestimmt werden. In weiteren Studien müssten die identifizierten Einzelkomponenten und ihre Funktion im MPI analysiert werden. Die ermittelte Funktionsweise könnte somit Aufschluss über den Ursprung dieser Proteine sowie der TIM-Komplexe geben.

4.2.3 Das MPI-System des IMS

4.2.3.1 Das MPI-System des IMS unterscheidet sich deutlich von Opisthokonten

Der MPI von cysteinreichen IMS-Proteinen wie den kleinen-Tim-Proteinen (Abbildung 10e, Abbildung 11e) oder LtErv (Abbildung 11d) ist in Kinetoplastiden aufgrund der Abwesenheit von Mia40 rätselhaft [83, 240]. Besonders die $\Delta\Psi$ -Abhängigkeit des kleinen-Tim-Imports in Leishmanienmitochondrien im Gegensatz zu ScTim9 kann mit den bisherigen MPI-Modellen nicht erklärt werden und muss in weiteren Studien untersucht werden. Bisher sind keine experimentellen Daten über die Funktionsweise des IMS-Imports von Cysteinproteinen in der Abwesenheit von Mia40 bekannt [190]. Erste Aufschlüsse über diesen Importweg würde die Identifizierung der beteiligten Proteine liefern. Die Maschinerie könnte durch Pulldownexperimente mit den bekannten Substraten des Importweges wie den IMS-Proteinen LtsTim1 oder LtErv ermittelt werden. Die anschließende Charakterisierung der neu identifizierten Proteine könnte zur Aufklärung der uncharakteristischen $\Delta\Psi$ -Abhängigkeit des Imports von LtsTim1 führen. Die Identifizierung weiterer Substratproteine könnte ebenfalls für die Aufklärung der $\Delta\Psi$ -Abhängigkeit des Imports hilfreich sein.

4.2.3.2 Evolutionäre Entstehung des IMS Imports

Drei Szenarien erklären die funktionelle Konservierung des Importweges im Laufe der Evolution. So könnten die ursprünglichen Eukaryoten einerseits Vorfahren von Mia und Erv (Eukaryot A), oder Erv alleine (Eukaryot B) enthalten haben. Andererseits ist auch die Anwesenheit von Erv und einer bisher unbekanntes Komponente Z (Eukaryot C) möglich (Abbildung 35c). Im Falle des Eukaryoten A könnte sich die Sequenz von Mia40 im Lauf der Evolution stark verändert und zur Entstehung von Mia* geführt haben. Dieses ist im Gegensatz zu den bekannten Kandidaten (Abbildung 35c 1b) *in silico* teils schwer identifizierbar (Abbildung 35c, 1a). Alternativ könnte Mia40 in einigen Organismen entbehrlich geworden sein (Abbildung 35c, 2). Ausgehend von Eukaryot B hingegen könnte die Akquisition von Mia40 und einer unbekanntes Komponente Z eine ähnliche Lösung für das gleiche Problem repräsentieren (Abbildung 35c, 3a, bzw. 3b). Das kleine-Tim-ähnliche Protein in *L. tarentolae* (Abbildung 5) könnte eine solche Komponente sein. Alternativ könnten Eukaryoten ohne Mia40 auch Eukaryot B ähneln (Abbildung 35c, 4). So ist denkbar, dass LtErv mit seinem ungewöhnlichen Cysteinmuster und

der großen, zusätzlichen C-terminalen Domäne [83] keinen weiteren Reaktionspartner benötigt [83, 240]. Ausgehend von Eukaryot C hätte Mia40 die Komponente Z in einigen (Abbildung 35c, 5a) jedoch nicht allen (Abbildung 35c, 5b) Organismen ersetzen können [190]. Keine dieser Theorien kann zum jetzigen Zeitpunkt verifiziert oder falsifiziert werden. Auch für die Klärung der evolutionären Entstehung des IMS-Imports ist es nötig, die am Importprozess beteiligten Proteine in Kinetoplastiden zu identifizieren (siehe Abschnitt 4.2.3.1).

4.2.4 LtErv

Die Abwesenheit von Mia40 in Kinetoplastiden weist auf deutliche Unterschiede in der Funktion von LtErv und ScErv1 hin. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass die Komplementation des essentiellen ScErv1 durch LtErv trotz vieler Parallelen nicht funktionell ist (Abbildung 20). So ist gerade die Erv-Domäne inklusive des gebundenen Cofaktors FAD in LtErv stark konserviert und überträgt äquivalent zu ScErv1 Elektronen vom artifiziellen Substrat DTT auf Cytochrom *c*. Des Weiteren ist LtErv sowohl in Leishmanien als auch Hefe im IMS der Mitochondrien lokalisiert und somit sollte eine Komplementierung aufgrund der Lokalisation prinzipiell möglich sein. Jedoch ist LtErv wesentlich stärker membranassoziiert als ScErv1, was auf eine membranständige Position, wie auch von Mia40 bekannt ist hindeutet [241]. Abgesehen von diesen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich besonders die Cysteinemotive der beiden homologen Proteine deutlich. So ist zum einen das distale LtErv-Cysteinemotiv im Gegensatz zu ScErv1 nahe des C-Terminus gelegen und zum anderen sind die beiden Cysteine durch drei anstatt zwei Aminosäuren getrennt. Beide Unterschiede könnten die Interaktion mit Mia40 verhindern. Dies wird durch weitere Ergebnisse unterstützt (persönliches Gespräch K. Hell), welche darauf hinweisen, dass Mia40 und LtErv in Hefe nicht interagieren. Der größte Unterschied der beiden Proteine liegt jedoch in der zusätzlichen Kinetoplastidendomäne bei LtErv. Sie besteht zum großen Teil aus vorhergesagten α -Helices und weist keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteindomänen auf. Diese Domäne könnte einerseits für die Membranständigkeit von LtErv verantwortlich sein, andererseits könnte sie für eine Solofunktion von LtErv sorgen, welches nicht auf Mia40 als interagierendes Protein zwischen importiertem Substrat und LtErv angewiesen ist. Dies könnte auch die mangelnde Interaktion von Mia40 und LtErv erklären. Es ist jedoch weiterhin zu klären, ob LtErv als Einzelprotein eine homologe Funktion zum Mia-Erv-Disulfidtransfersystem hat. Dazu ist die Identifizierung von Substratmolekülen notwendig, welche in Pulldownexperimenten mit LtErv aus Mitochondrien isoliert werden könnten. Die Identität dieser Proteine könnte sowohl über die Funktion von LtErv als auch mögliche Interaktionspartner Aufschluss geben, welche eine zu ScMia40 äquivalente Funktion ausüben könnten. Weitere Rückschlüsse über die Funktion von LtErv könnten durch Interaktionsexperimente mit bereits bekannten Substraten des Mia-Erv-Disulfidtransfersystems gewonnen werden (siehe 4.2.3.1).

4.2.4.1 Elektronentransfer in LtErv

Während LtErv die Funktion von ScErv1 in Hefe wie im vorherigen Kapitel besprochen trotz struktureller Ähnlichkeiten nicht komplementieren kann, bestehen funktionelle Parallelen im Mechanismus der Proteine. So überträgt LtErv äquivalent zu ScErv1 Elektronen vom artifiziellen Substrat DTT über das aktive Zentrum auf Cytochrom *c*. Mit diesem Experiment wurde

eine direkte Interaktion von DTT mit dem interchange-Cystein unter Umgehung der Cysteine des distalen Cysteinmotivs nachgewiesen (Abbildung 18). Der katalytische Mechanismus von LtErv folgt wie ScErv1 Flavin-Biochemieprinzipien, wie sie von TrxR oder GR bekannt sind. Allerdings verläuft der Elektronenfluss bei diesen Proteinen in umgekehrte Richtung (Abbildung 36) [82, 242]. Die Reaktion kann in zwei Hälften unterteilt werden, die reduktive und oxidative Halbreaktion. In der reduktiven Halbreaktion von LtErv wird das distale Disulfidmotiv von einem Substrat reduziert (Abbildung 36, Schritt 1). Bisher ist das mit dem Substrat interagierende Cystein in anderen Vertretern der Familie nicht sicher geklärt. Die ausschließliche Ausbildung des kovalent verknüpften Dimers D1 in Anwesenheit von C300 (Abbildung 16) deutet darauf hin, dass die Funktion dieses Cysteins in LtErv die Substratbindung ist. Die Interaktion mit Cysteinen des aktiven Zentrum ist für C300 unwahrscheinlich (siehe unten). Im nächsten Schritt der reduktiven Halbreaktion werden die Elektronen auf das Cysteinmotiv des aktiven Zentrums übertragen. Dabei bildet das distale Cysteinmotiv eine kovalente Bindung zu dem interchange-Cystein C63 des proximalen Motivs aus (Abbildung 36, Schritt 2).

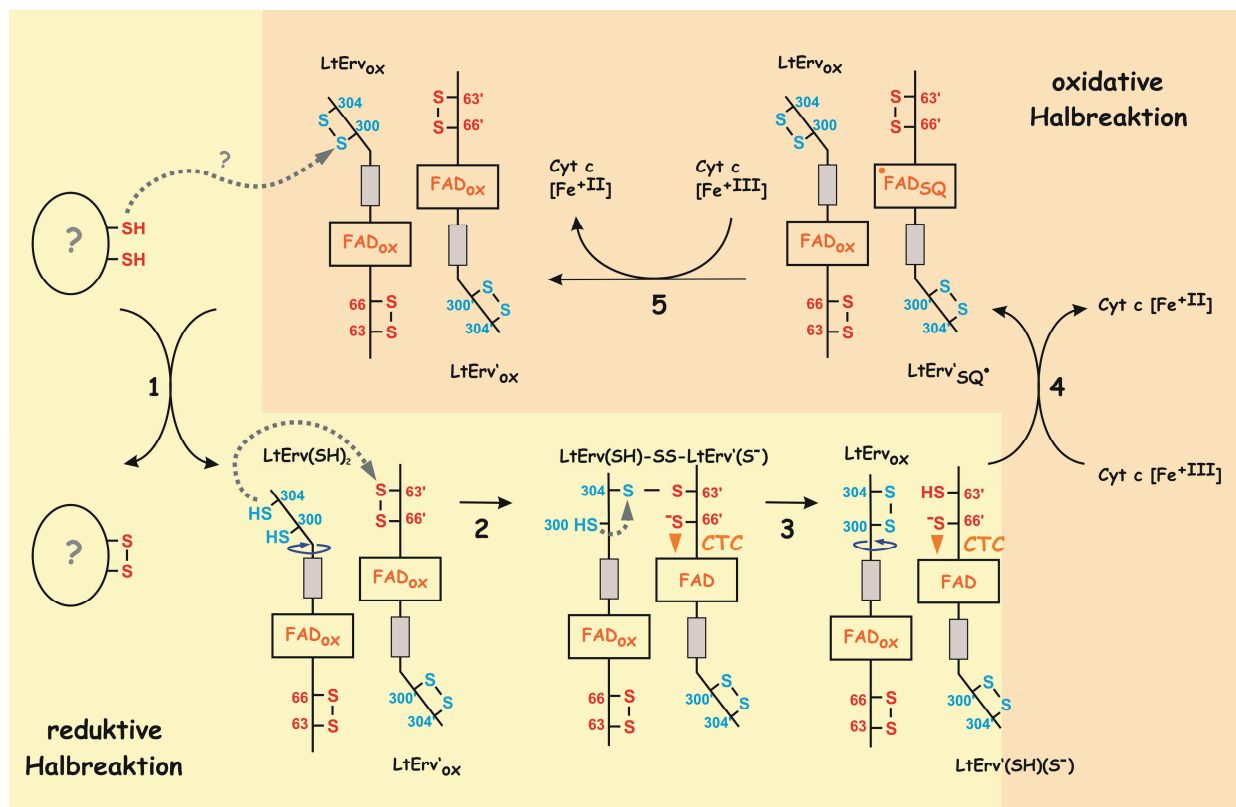


Abbildung 36: Reaktionsschema von LtErv.

Modell der reduktiven (1-3) und oxidativen (4, 5) Halbreaktionen des Elektronentransfers durch LtErv. Starke strukturelle Änderungen sind durch dunkelblaue Pfeile gekennzeichnet. Ungeklärte Teile sind mit Fragezeichen gekennzeichnet. CTC: Charge-Transfer-Komplex, +FADSQ: FAD Semiquinon. Variiert nach Eckers [216].

In hsALR bildet das interchange-Cystein mit beiden Cysteinen des distalen Motivs Disulfidbrücken aus [243]. Im Gegensatz dazu sind in LtErv überwiegend Bindungen zwischen dem C-terminalen C304 des distalen Motivs und C63 zu beobachten (Abbildung 16, D2). Auch die Äquivalenz des WT- und LtErv^{C304S}-Spektrums deutet darauf hin, dass nur C304 und C63

interagieren (Abbildung 17). Diese Eigenschaft ähnelt ScErv1, für welches angenommen wird, dass ebenfalls nur das C-terminale C33 des distalen Motivs eine Disulfidbrücke mit dem interchange-Cystein C130 ausbildet [79, 83]. In dieser C63-C304 disulfidverbrückten Konformation bildet sich für LtErv ein starker CTC zwischen dem Thiolat C66 und FAD aus. Die Interaktion von C66 und FAD wird durch das Spektrum der Mutante C66S bestätigt (Abbildung 17). Durch die Mutation dieses Cysteins vergrößert sich die Absorption des 450 nm Peaks und zeigt eine leichte Blauverschiebung. Dies lässt auf eine Änderung der Elektronenumgebung des im Protein gebundenen FAD durch die fehlende Interaktion mit C66 schließen. Der CTC kann durch die Mutationen C300S bzw. C63S stabilisiert werden (Abbildung 17). Jedoch ist die Ausprägung der CTC Signale bei >500 nm unterschiedlich stark. Eine Erklärung für das starke CTC-Signal und die blaue Farbe von LtErv^{C300S} ist die erschwerte Auflösung der Bindung von C304 und C63 in Abwesenheit von C300. Dies führt zur Stabilisierung des CTC und zu einer Verteilung der Elektronen über FAD, C66, C63 und C304 (Abbildung 37). Die blaue Farbe und das Spektrum der ScErv1-Mutante C30S deuten auf einen äquivalenten Reaktionsmechanismus hin, in welchem das distale und das proximale Motiv über die Cysteine C33S und C130S interagieren [79]. Ein ähnlich stark ausgeprägtes CTC Signal kann auch während der Reduktion von TrxR beobachtet werden, dessen Elektronentransfersystem ebenfalls auf der Interaktion von zwei Cysteinmotiven und FAD aufbaut [217].

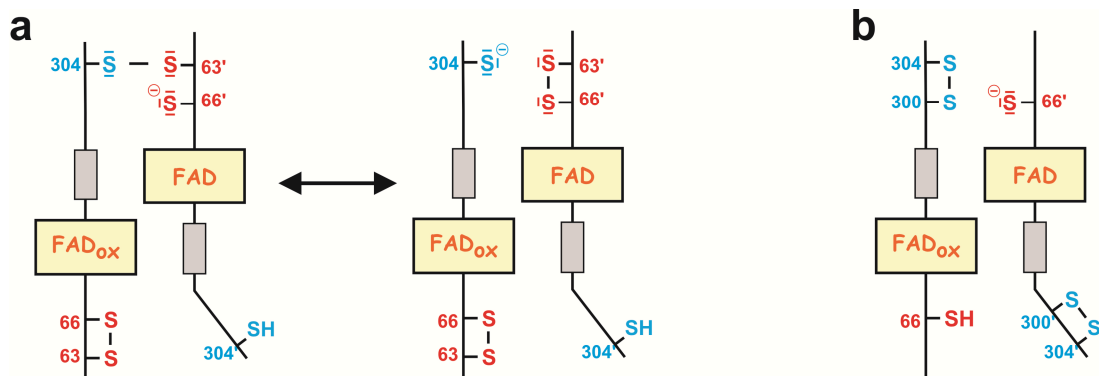


Abbildung 37: Mesomere Grenzstruktur von LtErv C300S.

Die unterschiedliche Elektronenverteilung in LtErv wird anhand der mesomeren Grenzstruktur von a) LtErv C300S im Vergleich zu b) LtErv C63S dargestellt.

Im Fall von LtErv^{C63S} ist die Elektronenverteilung auf FAD und C66 begrenzt, weshalb das CTC-Signal geringer ausgeprägt ist. Die Mutante weist eine rot-orange Farbe auf (Abbildung 17, Abbildung 37b), die auch in hsALR bei der Doppelmutteration des interchange-Cysteins und eines Cysteins des distalen Motivs festgestellt wurde [243]. Die Ausprägung des CTC ähnelt dem Absorptionsspektrum von GR, bei welcher nur ein Cysteinmotiv und FAD am Elektronentransfer beteiligt sind [82]. Im letzten Schritt der reduktiven Halbreaktion des LtErv WT-Enzyms wird die Disulfidbrücke des distalen Cysteinmotivs regeneriert (Abbildung 36, Schritt 3) [216].

In der oxidativen Halbreaktion werden die beiden Elektronen in zwei separaten Schritten einzeln über den gebundenen Cofaktor FAD auf zwei Moleküle Cytochrom c übertragen, wodurch das Protein erneut in der oxidierten Ausgangsposition vorliegt (Abbildung 36, Schritt 4+5)

[216]. Wie dieser Prozess genau abläuft, bleibt z. B. mittels Stopped-Flow-Spektrophotometrie zu klären.

4.3 Die Autofluoreszenz in Leishmanienmitochondrien ist durch Flavoproteine verursacht

Die Autofluoreszenz von Mitochondrien verschiedener Säugerzellen ist weithin bekannt [244-246]. Die Signale werden auf Moleküle mit stark delokalisierten π -Elektronensystemen wie NAD(P)H, Cytochrome und FAD bzw. Flavoproteine zurückgeführt [244, 247-251]. Diese Moleküle sind aufgrund der Atmungskette und vielfältiger katabolischer Flavoproteine vermehrt in den Mitochondrien lokalisiert. Diese lokale Verteilung deckt sich mit Abbildung 9d. Die Emissionsspektren von Mitochondrien, dem Zytosol sowie den kompletten Zellen ähneln sich sehr, jedoch ist die Emissionsintensität der Mitochondrien im Vergleich zum Zytosol bei 538 nm doppelt so hoch. Des Weiteren ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 538 und 608 nm in Mitochondrien 1,5 mal so hoch wie im Zytosol. Somit scheint die Fluoreszenz beider Bereiche durch den gleichen Fluorophor gebildet zu werden, welcher vermehrt in den Mitochondrien lokalisiert ist [212]. Da die Spektren mehrere kleine Maxima aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass diese durch eine Kombination verschiedener Fluorophore gebildet werden. Die artifizielle Entstehung der Autofluoreszenz durch die Ansammlung von Chemikalien, welche zur Fixierung der Zellen verwendet wurden, kann ausgeschlossen werden, da die Fluoreszenz bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden erkennbar war (Abbildung 9a).

Es wird angenommen, dass NAD(P)H und Flavoproteine die wichtigsten Fluorophore im sichtbaren Spektrum sind. Diese können anhand unterschiedlicher Emissionsmaxima deutlich voneinander unterschieden werden. NAD(P)H hat ein Emissionsmaximum bei 450 nm, während die maximale Emission von Flavoproteinen wie Dihydrolipoamiddehydrogenase zwischen 500 und 550 nm liegt [245, 250-254]. Das Emissionsmaximum der Flavoproteine deckt sich gut mit dem hier bestimmten Maximum von 538 nm (Abbildung 9d). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Autofluoreszenz der Leishmanienmitochondrien hauptsächlich durch Flavoproteine verursacht wird [212]. Es wird angenommen, dass die Proteine Dihydrolipoamiddehydrogenase der Ketosäuredehydrogenase und das (für die β -Oxidation benötigte) Elektronentransferflavoprotein die Ursache für 75 % der Flavinfluoreszenz in isolierten Rattenlebermitochondrien sind [251, 253]. Obwohl Kinetoplastiden keine funktionellen Ketosäuredehydrogenase-Komplexe zu benötigen scheinen [255], ist die Dihydrolipoamiddehydrogenase ein guter Kandidat für die mitochondriale Autofluoreszenz in Leishmanien. Der zweite Peak bei ca. 608 nm könnte durch Porphyrine, wie z. B. in Cytochromen, verursacht sein, deren Emissionsmaximum im längerwelligen Bereich liegt [212].

In vielen der bisherigen Studien zur Immunfluoreszenz in Kinetoplastiden wurde die Autofluoreszenz der Mitochondrien nicht erwähnt [213, 256-258], was unter Umständen durch den starken Bleicheffekt der meist verwendeten HBO- (Quecksilber) Lampen bedingt sein könnte (persönliches Gespräch Sven Poppelreuther). Bei Verwendung dieser Lampen im Vergleich zu XBO- (Xenon) Lampen verschwand das mitochondriale Signal innerhalb von Sekunden. Auch die Verwendung eines Lasers resultierte in starken Bleicheffekten. Dieser Effekt ist deutlich beim Vergleich von Abbildung 9a und c zu erkennen. Bei Verwendung von Xenonlampen war die mitochondriale Autofluoreszenz klar erkennbar und könnte in zukünftigen immunfluoro-

reszenzmikroskopischen Lokalisationsexperimenten als Marker verwendet werden, welcher den Einsatz zusätzlicher mitochondrialer Marker wie GFP-markierte Proteine oder fluoreszierende Chemikalien wie Mitotracker überflüssig macht. Dies würde sowohl Kosten sparen als auch zusätzliche Arbeitsschritte vermeiden. Die starke Autofluoreszenz der Mitochondrien zeigt jedoch ebenfalls die Notwendigkeit von unbehandelten Zellen als Negativkontrollen für immunfluoreszenzmikroskopische Studien.

4.4 Struktur der Hefe Glutaredoxine 6-8

Grx sind eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen, die anhand der Sequenz des aktiven Zentrums in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Die drei neu entdeckten Grx6-8 weisen trotz zum Teil großer Sequenzidentität (Grx-Domäne von ScGrx6 zu ScGrx7 52 % [259]) große Unterschiede in ihrer Struktur auf, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.4.1 ScGrx6 bildet FeS-Cluster assoziierte Tetramere

Im Gegensatz zu ScGrx7 und ScGrx8 deuten mehrere Eigenschaften von ScGrx6 auf die Assoziation des Proteins mit einem FeS-Cluster hin [157, 158]. So ähnelt das UV-Vis-Spektrum von ScGrx6 (Abbildung 25) stark den Spektren von [2Fe-2S]-assoziierten Dithiol-Grx aus Mensch [260] und Pappel [261]. Des Weiteren ist für ScGrx6 die Bindung von Eisen sowie des Chromophors von C136 abhängig und tritt nur im Tetramer des Proteins auf. Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen über die bereits erwähnten Dithiol-Grx deuten diese Punkte auf die Bindung von Eisen in Form eines FeS-Clusters hin, welcher die ScGrx6 Untereinheiten verbindet. Der Verlust des Chromophors bei Zerfall des labilen Tetramers zu stabilem Dimer zeigt, dass der FeS-Cluster zwei Dimereinheiten verbindet. Damit ist ScGrx6 das erste bekannte FeS-Cluster bindende Monothiol-Grx, dessen Untereinheiten über die Cysteine der aktiven Zentren mit dem FeS-Cluster verbunden sind. Die Bindung eines FeS-Clusters wurde in späteren Untersuchungen von Izquierdo bestätigt und die Bindung von Eisenionen *in vivo* nachgewiesen [262].

Das ScGrx6 Tetramer wurde durch GSH, jedoch nicht durch GSSG stabilisiert. Daher ist Oxidation eine wahrscheinliche Ursache des Zerfalls. Jedoch sind nicht nur die reduzierenden Eigenschaften des GSH an der Stabilisierung des Tetramers beteiligt, da der stabilisierende Effekt anderer Reduktionsmittel, wie Ascorbinsäure und DTT, wesentlich geringer war (Abbildung 27). Daher scheint GSH *in vitro* mit dem FeS-Cluster zu interagieren und ähnlich wie in Pappel GrxC1 und humanem Grx2 als schützender Ligand desselben zu wirken [154, 261, 263].

Die strukturellen Eigenschaften, die zur Bindung von FeS-Clustern in einigen, jedoch nicht allen Grx führen, sind bislang ungeklärt. Gemeinsame Eigenschaften der drei FeS-Cluster bindenden Proteine sind jedoch die Abwesenheit einer G(S/T)₃ Insertion nach dem konservierten Lysin in Anschluss an β -Faltblatt 1 sowie das Fehlen eines Prolinrestes im Bereich des N-terminalen Cysteins des aktiven Zentrums. Da die G(S/T)₃ Insertion auch in einigen Dithiol-Grx [158] die keinen FeS-Cluster binden fehlt, ist diese strukturelle Eigenschaft als Ursache der FeS-Cluster Bindung unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu ist der Prolinrest in allen Grx

die keinen FeS-Cluster binden, vorhanden. Dessen Abwesenheit ist somit eine mögliche Voraussetzung für die FeS-Cluster Bindung.

Die exakte Funktion der Assoziation von Grx mit einem FeS-Cluster ist unbekannt. Eine Möglichkeit ist die Funktion als Redoxsensor unter oxidativem Stress [154, 260, 261, 263] oder gegebenenfalls als Eisensensor im sekretorischen Pathway, jedoch muss dies in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.4.2 ScGrx6 und ScGrx7 bilden nichtkovalent verknüpfte Dimere

Gewöhnlich sind Grx Monomere, jedoch wurde für zwei Dithiol-Grx (Pappel GrxC4 und EcGrx1) gezeigt, dass diese nichtkovalent verknüpfte Dimere ausbilden können [264, 265]. Sowohl ScGrx6 als auch ScGrx7 eluieren im Gegensatz zu monomerem ScGrx8 in der Gelfiltrationschromatographie als Dimere, bzw. im Fall von ScGrx6 zusätzlich als Tetramer (Abbildung 26a). ScGrx6 und ScGrx7 sind damit die ersten Monothiol-Grx, die *in vitro* unabhängig von GSH oder GSSG nichtkovalent verknüpfte Dimere bilden (Abbildung 26a, b). Die strukturellen Ursachen für diese Dimerisierung sind noch unklar, jedoch gehen Luo und Kollegen davon aus, dass die N-terminale Domäne von ScGrx6 an der Dimerisierung beteiligt ist [259]. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit könnte auch in ScGrx7 die N-terminale Domäne an der Dimerisierung beteiligt sein. Jedoch muss diese Theorie in Mutagenesestudien überprüft werden [158, 259].

4.4.3 ScGrx6 dimerisiert über eine intermolekulare Disulfidbrücke

In der SDS-PAGE von ScGrx7 wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen kleine Mengen von Dimer nachgewiesen. Diese waren jedoch nur in Abwesenheit von IAC nachweisbar, das freie Thiole kovalent modifiziert. Daher ist die artifizielle Bildung des kovalent verknüpften Dimers während der Präparation der Probe wahrscheinlich (Abbildung 26b3). Im Fall von ScGrx6 ist ein kleiner Teil der Dimere hingegen auch in Anwesenheit von IAC über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpft. Die Verknüpfung der beiden ScGrx6 Monomere über einen FeS-Cluster kann ausgeschlossen werden, da auch das nicht chromophore Dimer teilweise kovalent verknüpft ist. Daher ist eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Untereinheiten wahrscheinlich, welche unter reduzierenden Bedingungen getrennt wird. Es ist jedoch unklar, warum unter nicht reduzierenden Bedingungen mehr als zwei Banden auftraten (Abbildung 26a3). Neben PfGlp1 ist ScGrx6 das zweite Monothiol-Grx welches *in vitro* kovalent verknüpfte Dimere bildet [82]. Diese Eigenschaft könnte auf eine funktionelle Ähnlichkeit der beiden Proteine hindeuten, welche sie von anderen Monothiol-Grx unterscheidet. Da ScGrx6 teilweise kovalent verknüpfte Dimere ausbildet und das Tetramer ein Eisen zu Protein Verhältnis von 0.74 aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass im Tetramer pro ScGrx6 Molekül ein Eisenatom gebunden ist. Ein Modell für die unterschiedlichen Oligomerisierungsmuster von ScGrx6 ist in Abbildung 38 gezeigt.

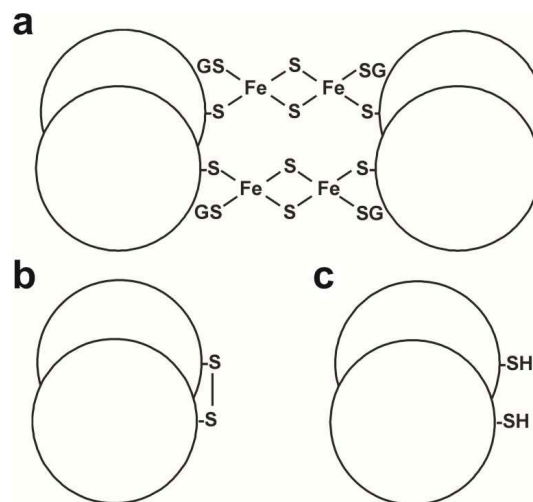


Abbildung 38: ScGrx6 Quartärstrukturmodelle

Je zwei Untereinheiten von ScGrx6 sind sowohl im Tetramer (a), oxidiertem (b), als auch reduziertem (c) Dimer nichtkovalent über die gleiche Bindungsstelle miteinander verknüpft. Im Tetramer werden zwei dieser Dimere des Weiteren über FeS-Brücken und im oxidierten Zustand über Disulfidbrücken verbunden. Der Verlust des wahrscheinlich mit Glutathion (GS) komplexierten FeS-Clusters führt zur Dissoziation des Tetramers [158].

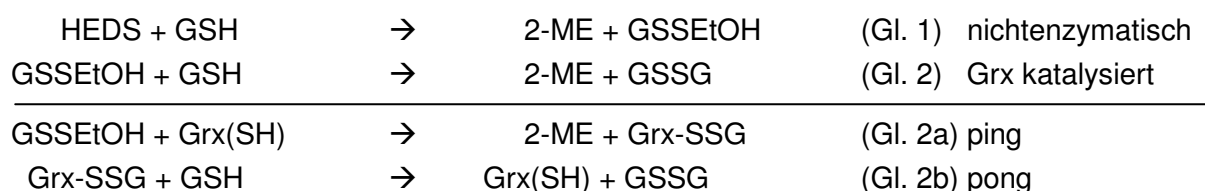
Die nichtkovalent verknüpften Dimere können einerseits durch Oxidation kovalent verknüpfte Dimere bilden, oder aber über FeS-Cluster mit einem weiteren Dimer ein Tetramer ausbilden. In diesem Fall sind zwei Dimere über zwei FeS-Brücken verbunden.

GSH verändert das Verhältnis zwischen Dimer und Tetramer nicht. Allerdings übt es unabhängig von seinen reduzierenden Eigenschaften einen stabilisierenden Effekt auf das Tetramer aus (3.6.1.1). Daher ist es denkbar, dass eine Bindungsstelle des FeS-Clusters nicht von Protein sondern GSH komplexiert wird.

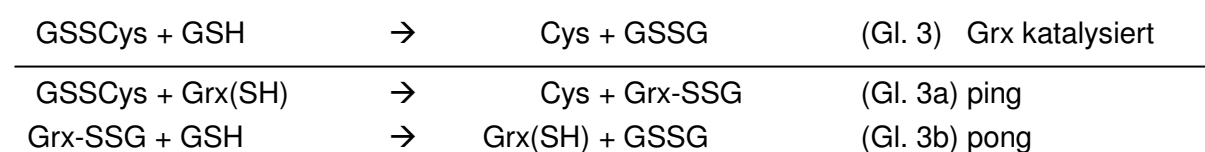
4.5 Katalyse der drei neuen Glutaredoxine

Der katalytische Mechanismus der neu identifizierten Grx6-8 wurde einerseits im Standard HEDS-Assay (2.6.17) und andererseits in einem analogen, gekoppelten Assay mit L-Cystein-Glutathion Disulfid (GSSCys) als Disulfidsubstrat untersucht.

HEDS-Assay:



GSSCys-Assay:



Dabei ist der signifikante Unterschied zwischen den beiden Assays nach dem traditionellen Katalysemodell (Abbildung 4) der, dass im Standard HEDS-Assay eine nichtenzymatische Reaktion zwischen GSH und HEDS abläuft (Gl. 1), die zur Bildung des gemischten Disulfids GSSEtOH führt. Im GSSCys-Assay hingegen liegt das Substrat bereits in der glutathionylierten Form vor und wird daher direkt umgesetzt (Gl. 3). In beiden Reaktionen ist GSH das Reduktionsmittel, während GSSEtOH und GSSCys als Oxidationsmittel wirken. Desweiteren wurde die Aktivität der Grx sowohl im Insulin-Assay (2.6.19) als auch im Thioredoxinreduktase-Assay (2.6.18) getestet. Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.5.1 ScGrx6 und ScGrx7

Es wurden bereits ausführliche Analysen des Katalysemechanismus von Dithiol-Grx aus humanem Blut sowie Rattenleber durchgeführt [142, 172]. Dabei ergaben die Messungen im HEDS-Assay sequenzielle Reaktionsschemata [142, 172], während die kinetischen Daten des GSSCys-Assays einem typischen Ping-Pong-Mechanismus entsprachen [172]. Auch für das Monothiol ScGrx7 wurden diese unterschiedlichen Mechanismen festgestellt (Abbildung 29, Abbildung 30).

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben katalysieren Grx die Deglutathionierung von gemischten Disulfiden durch die Übertragung der Thiolgruppe eines GSH auf das gemischte Disulfid (Abbildung 4, Gl. 2). Dieser Vorgang besteht aus zwei Reaktionsschritten (Abbildung 4, Schritt 2, 3, Gl. 2a, 2b), in welchen das Enzym zwischenzeitlich glutathionyliert wird. Dies erklärt den im GSSCys-Assay experimentell bestimmten Ping-Pong-Mechanismus (Abbildung 30) [152, 158, 172]. Die Reaktion zwischen GSH und einem gemischten Disulfid an dem kein GSH beteiligt ist, ist jedoch nicht durch Grx katalysiert (Gl. 1), sondern spontan [172]. Daher kann das sequenzielle Reaktionsschema im HEDS-Assay aus der geschwindigkeitsbestimmenden Bildung des gemischten Disulfids GSSEtOH resultieren [142, 158]. Diese Annahme erklärt sowohl die Verzögerungsphase der ScGrx7 katalysierten HEDS-Assays, welche durch Zugabe von HEDS gestartet wurde (Abbildung 28 c), als auch den erhöhten $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ nach der Vorinkubation von HEDS mit GSH (Tabelle 11). Bei der erwarteten enzymatischen Reaktion zwischen GSSEtOH und GSH in zwei Schritten würden die Messungen im Lineweaver-Burk-Plot parallele Linien ergeben. Dies war nicht der Fall wenn der HEDS-Assay nach der Vorinkubation von HEDS mit GSH durch Zugabe von ScGrx7 gestartet wurde (Abbildung 29 c, d). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz ist, dass die nichtenzymatische Bildung des GSSEtOH Disulfids nach zwei Minuten noch nicht abgeschlossen war und die Produktion des Substrats wiederum geschwindigkeitsbestimmend wurde. Allerdings änderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit auch nach zehnminütiger Inkubation nicht. Auch die Limitierung anderer Teile des Reaktionssystems wurde ausgeschlossen, was gegen eine limitierende Substratkonzentration als Ursache für die sequentielle Kinetik spricht. Ein alternativer (sequenzieller) Mechanismus der Umsetzung von GSSEtOH ist somit nicht auszuschließen [158].

Wurde die Aktivität von ScGrx7 im GSSCys-Assay bestimmt, ergaben sich im Lineweaver-Burk-Plot parallele Linien, was wie bereits erwähnt für einen Ping-Pong-Mechanismus charakteristisch ist. Die Existenz des glutathionylierten Enzyms in einem Zwischenschritt der Reaktion (Abbildung 4 Schritt 2, 3) wird weiterhin durch die Glutathionilierbarkeit des Proteins *in*

vitro, die Glutathionylierung eines Teils von ScGrx7 in *E. coli* sowie die volle Aktivität des glutathionylierten Enzyms im HEDS-Assay bestätigt. Dies zeigt, dass die Reaktion von ScGrx7 nach dem traditionellen Mechanismus abläuft, wobei es sich hier um ein Monothiol-Grx handelt [157].

Die Analyse von ScGrx6 im HEDS-Assay war aufgrund einer inhomogenen Proteinpopulation schwierig. Es zeigte sich jedoch, dass das FeS-Cluster gebundene Tetramer inaktiv ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von FeS-Cluster gebundenen humanen holo-Grx2, das im HEDS-Assay ebenfalls inaktiv ist [260]. Dieser Schluss erklärt die erhöhte Aktivität von gealtertem ScGrx6 im Vergleich zu frisch aufgereinigtem Protein, da ersteres den FeS-Cluster zum größten Teil verloren hat. Auch die erhöhte spezifische Aktivität des Dimers im Vergleich zu den Tetramer-Gelfiltrationsfraktionen wird dadurch erklärt. Die geringe Aktivität der Tetramerfraktionen kann durch einen geringen Zerfall des Tetramers während der Reinigung erklärt werden. Der ermittelte $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Wert von Apo-ScGrx6 ist dem von Apo-HsGrx2 sehr ähnlich, wohingegen ScGrx7 40-80-mal aktiver ist. In einer späteren Studie wurde die Aktivität von ScGrx6 im HEDS-Assay erneut untersucht. Bei konstanten HEDS Konzentrationen von 3 mM wurde die GSH-Konzentration bei 30°C variiert. Die ermittelten Parameter waren ein $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ von 37 s^{-1} und ein K_{m} von 3,0 mM [259].

Die strukturellen Voraussetzungen für die enzymatische Aktivität von Monothiol-Grx im HEDS-Assay sind bisher nicht geklärt. Alle inaktiven Monothiol-Grx wie Grx4 aus *E. coli* [157, 165, 166, 168], Glps aus *P. falciparum* [165, 266] und Grx3-5 aus Hefe [156, 168] weisen jedoch zum einen ein WP-Motif und zum anderen eine Insertion zwischen einem hochkonservierten Lysin und dem Cystein im aktiven Zentrum auf. Molekulare Studien zur Glutathionylierung von Monothiol-Grx an *P. falciparum* Grx [165] und ScGrx5 [168] sowie die Struktur von EcGrx4 [221] bestätigen die Annahme, dass das WP-Motiv die Glutathionbindung nicht verhindert. Daher ist die Insertion eine mögliche Ursache für die Inaktivität dieser Monothiol-Grx. Die Deletion dieser Insertion in inaktiven Grx, bzw. die Insertion dieser Aminosäuren in aktive Grx könnte die Theorie in weiteren Studien bestätigen.

4.5.2 ScGrx8

Bei Betrachtung der geringen katalytischen Aktivität von ScGrx8 stellt sich die Frage, ob ScGrx8 glutathionabhängig ist und somit überhaupt als Grx klassifiziert werden kann. Auch das Fehlen eines signifikanten Wachstumsdefekts, von Knock-out-Mutanten unter oxidativem Stress, stellt die Rolle von ScGrx8 als signifikantes physiologisches Reduktionsmittel in Frage. Es sprechen jedoch mehrere Punkte für eine GSH-abhängige Aktivität von ScGrx8. Zum einen zeigen Modelle die Anwesenheit einiger GSH Bindungsstellen im Molekül an, wobei die Struktur des aktiven Zentrums sich deutlich von anderen Grx unterscheidet und mehr Ähnlichkeit zu Trx aufweist (Abbildung 23). Zum anderen ist ScGrx8 im HEDS-Assay aktiv und die $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ -Werte sind mit anderen Grx vergleichbar (Abbildung 31). Des Weiteren ist die Reduktion von oxidiertem ScGrx8 durch GSH keine einfache Reaktion zweiter Ordnung, sondern zeigt eine Halbsättigung im physiologischen millimolaren Bereich (Abbildung 33e, Abbildung 34g). Daher wird die Bezeichnung von ScGrx8 als Glutaredoxin als gerechtfertigt betrachtet [157].

4.6 Limitationen des traditionellen Glutaredoxin-Katalysemodells

Bei Betrachtung der Vielzahl an Grx stellt sich die Frage, warum die meisten Monothiol-Grx inaktiv sind und warum ScGrx8 im Gegensatz zu den bisher untersuchten Dithiol-Grx eine geringe Dithiol abhängige Aktivität aufweist. Mögliche Erklärungen sind eine sehr langsame, oder aus thermodynamischen Gründen nicht stattfindende reduktive- bzw. oxidative Halbreaktion. Im Hinblick auf das zweite Cystein des aktiven Zentrums wurde die Bildung eines internen Disulfids im traditionellen Modell der Grx-Katalyse bisher als irrelevant für die Reduktion glutathionierter Substrate angesehen, wobei die reversible Bildung eines Disulfids in einer Seitenreaktion der Katalyse durchaus für möglich erachtet wurde (Abbildung 4 Schritt 7) [152, 155, 157, 172-174]. Studien an humanem Grx zeigten, dass diese Seitenreaktion sogar in hohem Maße stattfinden und zur Verringerung der enzymatischen Aktivität führen kann [155]. Weder mutierte Dithiol-Grx [152, 155, 174, 267] noch Monothiol-Grx [158] benötigten für die GSH-abhängige Reduktion von HEDS ein zweites Cystein im aktiven Zentrum. Daher war die Inaktivität von sowohl ScGrx8^{C25S} als auch ScGrx8^{C28S} überraschend und weist darauf hin, dass die geringe Aktivität des WT-Enzyms im Gegensatz zu den bisher untersuchten Dithiol-Grx ausschließlich auf einem Dithiol-Mechanismus beruht [157]. Es gibt mehrere Erklärungen für die Diskrepanz zwischen dem traditionellen Modell und den Resultaten für ScGrx8. Zum einen könnte das Modell zu einfach sein, zum anderen wäre es möglich, dass ScGrx8 direkt mit HEDS reagiert (Abbildung 4 Schritt 5,6). Letzteres würde auch die Inaktivität der meisten Monothiol-Grx erklären, da die Reduktion des schnell gebildeten gemischten Disulfids Grx-SSEtOH langsam sein könnte und damit das Protein inaktivieren würde. Für Dithiol-Grx ist die Reaktivierung durch das zweite Cystein des aktiven Zentrums und die damit verbundene Freisetzung von 2-ME möglich. Diese Erklärung ist jedoch aufgrund mehrerer Punkte unwahrscheinlich. Zum einen zeigt das Monothiol-Grx PfGlP1-N [165, 266] ebenfalls keine signifikante Aktivität im GSH-GSSCysThioltransferase-Assay, obwohl das potentielle inaktivierende Nicht-Glutathion-Disulfid in diesem Assay fehlt. Zum anderen ist auch die Aktivität von ScGrx8 in diesem Assay sehr gering (Abbildung 31c) [157]. Des Weiteren sind die K_m^{app} -Werte von ScGrx8 denen anderer Grx sehr ähnlich [142, 158, 164, 225] und können als vergleichbare Substrataffinität für GSSEtOH angesehen werden. Ein weiterer Punkt ist die bei menschlichem Grx [142], ScGrx7 [158] und ScGrx8 (Abbildung 31c) auftretende Verzögerungsphase, sofern der Assay mit HEDS gestartet wird. Diese resultiert aus der Bildung des gemischten Disulfids GSSEtOH in einer nichtenzymatischen Reaktion, welche bei einer direkten Reaktion von HEDS mit dem Enzym keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hätte. Daher ist es wahrscheinlich, dass der bisherige Reaktionsmechanismus zu einfach ist [157].

4.6.1 Reaktionsgeschwindigkeitsbegrenzung der oxidativen Halbreaktion

Eine mögliche Ursache für die geringe Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Inaktivität vieler Grx im HEDS-Assay ist, dass die oxidative Halbreaktion (Abbildung 4, Schritt 2) geschwindigkeitsbestimmend ist. Mögliche Ursachen sind erhöhte Werte in Bezug auf die Aktivierungsenergie, das Redoxpotential und den Thiol-pK_s sowie sterische Hinderung. Dies würde in der Verringerung der Grx-SSG Konzentration und von $k_{cat}^{app} = V/[E_0]$ resultieren. Von den vier genannten Ursachen ist die unwahrscheinlichste, dass bei einem pH von acht nicht genug Thiolat für einen nucleophilen Angriff gebildet wird. Zum einen hat das N-terminale Cystein von Trp14, wel-

ches das gleiche Cystein-Motiv wie ScGrx8 aufweist, einen pK_S^{app} -Wert von 6.1 [224], zum anderen wurde für zwei weitere inaktive Monothiol Grx ein Cystein pK_S^{app} von etwa 5 bestimmt [165, 168]. Daher liegen die Cysteine des aktiven Zentrums sowohl *in vivo* als auch im Assay deprotoniert vor [157].

Ein hohes Redoxpotential des Grx_{red}/Grx-SSG Systems aller inaktiven Grx ist ebenfalls unwahrscheinlich, da für einige Grx gezeigt wurde, dass diese effektiv durch GSSG glutathionyliert werden können [157, 165, 166, 168]. Falls die oxidative Halbreaktion geschwindigkeitsbegrenzend ist, sind zum einen sterische Hinderung und zum anderen eine hohe Aktivierungsenergie die wahrscheinlichsten Gründe für die geringe Aktivität von ScGrx8, bzw. die Inaktivität vieler Monothiol-Grx [157].

4.6.2 Reaktionsgeschwindigkeitsbegrenzung der reduktiven Halbreaktion

Eine weitere mögliche Ursache für die geringe Aktivität von ScGrx8 sowie die Inaktivität vieler Monothiol-Grx ist, dass die reduktive, nicht die oxidative Halbreaktion geschwindigkeitsbegrenzend ist (Abbildung 4, Schritt 3, Gl. 2b, 3b). Die reduktive Halbreaktion startet mit dem nucleophilen Angriff einer Glutathionylthiolatspezies. Für humane Dithiol-Grx wurde angenommen, dass dieser Schritt zum größten Teil aufgrund des hohen pK_A -Werts von GSH geschwindigkeitsbestimmend ist [157, 173]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass GSH ein schlechtes Reduktionsmittel für einige Monothiol-Grx ist [157, 166, 168, 169].

Die für ScGrx8 bestimmten Werte von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ im HEDS Assay ($0,018 \text{ s}^{-1}$), k^{app} der Reduktion von ScGrx8-Disulfid ($0,045 \text{ s}^{-1}$) und k^{app} der Reduktion von ScGrx8^{C28S}-SSG ($0,029 \text{ s}^{-1}$) (Abbildung 34e) sind sehr ähnlich und unterstützen diese Annahme. Da $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ kleiner ist als beide k^{app} -Werte könnte die reduktive Halbreaktion während der Umsetzung inhibiert worden sein, oder ein anderer Prozess könnte etwas langsamer gewesen sein. Da die Reduktion von ScGrx8(S₂) (Abbildung 4 Schritt 7,8) schneller ist als die Reduktion von ScGrx8^{C28S}-SSG, scheint Schritt 7 schneller abzulaufen als Schritt 8 und die Mutation des aktiven Zentrums hat einen geringen negativen Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Insgesamt erscheint wahrscheinlicher, dass die reduktive Halbreaktion für die Reaktion von ScGrx8 im HEDS-Assay geschwindigkeitsbestimmend ist, jedoch können Aktivierungsenergien und sterische Hinderung für bestimmte Grx als wichtige Einflussfaktoren nicht ausgeschlossen werden [157].

4.6.3 Konformationsänderung als Kontrollfaktor der Katalyse in Grx und Trx

Überraschenderweise ist die kinetische Konstante für die Regeneration von ScGrx7 ($k=0,15 \text{ s}^{-1}$) fast drei Zehnerpotenzen kleiner als der k_{cat} -Wert ($k_{\text{cat}}^{\text{app}}=76 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}=133 \text{ s}^{-1}$ im HEDS- bzw. GSSCys-Thioltransferase-Assay) [157, 220]. Da bestätigt wurde, dass ScGrx7-SSG die gleiche Aktivität wie unmodifiziertes Protein im HEDS-Assay aufweist (wobei der Assay ohne vorherige Inkubation des Enzyms mit GSH durch Zugabe von ScGrx7-SSG gestartet wird), ist der einzige Unterschied zwischen den Experimenten die An- oder Abwesenheit von HEDS/GSSEtOH und die Enzymkonzentration. Es stellt sich die Frage, wie die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion schneller sein kann, als die der reduktiven Halbreaktion. Mögliche Erklärungen sind unterschiedliche Proteinkonformationen, welche zu Abweichungen der en-

zymatischen Aktivität führen [157]. Im Fall von ScGrx8 weisen ebenfalls einige Faktoren auf Konformationsänderungen hin [157]. Unter aeroben Bedingungen werden Dithiol-Grx häufig in Form von Disulfiden aufgereinigt. Die Autooxidation von ScGrx8(SH)₂ (Abbildung 32b) hingegen ist sehr langsam, obwohl es eine gute GSSG-Reduktionskapazität aufweist, und ist nicht von der Proteinkonzentration abhängig. Dies weist darauf hin, dass die Thiolgruppen geschützt sind. Die nicht-lineare und nicht-hyperbolische GSH-Konzentrationsabhängigkeiten von $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ und k^{app} (Abbildung 31f, Abbildung 33g, h, Abbildung 34k) weisen ebenfalls auf eine GSH bedingte Konformationsänderung hin [157]. Die meisten ScGrx8 Moleküle könnten ohne das physiologische Substrat in einer inaktiven, geschützten Konformation vorliegen, was den kleinen $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ -Wert erklären würde. Die Aktivierung des Proteins könnte nur nach der Bindung des physiologischen Substrats stattfinden. Ein „induced fit“ während der oxidativen oder reduktiven Halbreaktion ist ebenfalls eine Erklärung dafür, dass Trp14 in vielen Redox-Assays nahezu inaktiv ist, obwohl es ein niedriges Redoxpotential von -257 mV hat [224]. Auch für EcGrx3 wurden nach der Glutathionylierung Konformationsänderungen festgestellt [268] und dieser Mechanismus wurde auch für EcGrx4 vorgeschlagen [221]. In einer Studie über *E. coli* Trx wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bildung einer korrekten S_N2-Geometrie während der Substratreduktion geschwindigkeitsbestimmend sein kann [269]. Insofern können auch kleine Konformationsänderungen in der Oxidoreduktase und/oder dem Substrat ähnlich starke Auswirkungen wie das Redoxpotential oder der pK_s haben [157].

4.6.4 Verfeinertes Modell des Glutaredoxin Katalysemechanismus

Zahlreiche enzymatische und strukturelle Studien an Grx haben das Verständnis dieser Proteine in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert. Trotzdem gibt es bisher kein genaueres, von dem Schema in Abbildung 4 abweichendes, Reaktionsmodell dieser Enzyme. Im Folgenden werden drei neue Modelle vorgestellt: das „Glutathiongerüst-Modell“, das „Glutathionaktivierungs-Modell“ und das „Cysteinauflösungs-Modell“. Die Modelle basieren auf bekannter Thiol-Chemie und unterscheiden zwischen dem Proteinbereich, welcher mit dem Glutathionanteil des Disulfids interagiert, und dem Bereich, der mit dem freiem Reduktionsmittel GSH interagiert (Abbildung 39b) [157].

In Abbildung 39a dient das Protein als Gerüst für das Disulfidsubstrat, was zu einer optimalen Reaktionsgeometrie führt. Entsprechend ist die oxidative Halbreaktion optimiert (Schritt 1-4) während die reduktive Halbreaktion (Schritt 5-8) weniger deutlich definiert ist. Bei diesem Modell wird das zweite Cystein nicht für die Katalyse benötigt. Das Glutathiongerüst-Modell erklärt warum alle, auch die inaktiven Monothiol-Grx, leicht glutathionylierbar sind und deckt sich des Weiteren mit der Beobachtung, dass das reduzierende Substrat kein Glutathion sein muss (in den Schritten 5-8 kann GS⁻ durch RS⁻ ersetzt werden), und dass die Deprotonierung des schwachen Nucleophils GSH geschwindigkeitsbestimmend werden kann [166, 169, 171, 173]. Die Strukturen einiger glutathionylierter Grx könnte daher Spezies V ähneln. Das Modell trifft auch dann zu, wenn die reduktive Halbreaktion *in vivo* unerwünscht ist, z. B. wenn die Grx den Glutathionylierungsgrad bestimmter Proteine erkennen [141, 157] oder als Gerüst für glutathionabhängige Synthesen dienen (z. B. FeS-Cluster [270]). In letzterem Fall wäre es möglich, dass Spezies I mit GSH anstatt von RSSG interagiert [157]. Trotzdem erklärt das Glutathiongerüst-Modell nicht, weshalb die meisten Monothiol-Grx in enzymatischen Assays inaktiv sind

und warum die Reduktion von ScGrx7-SSG durch GSH viel langsamer als die katalytische Umsetzung ist.

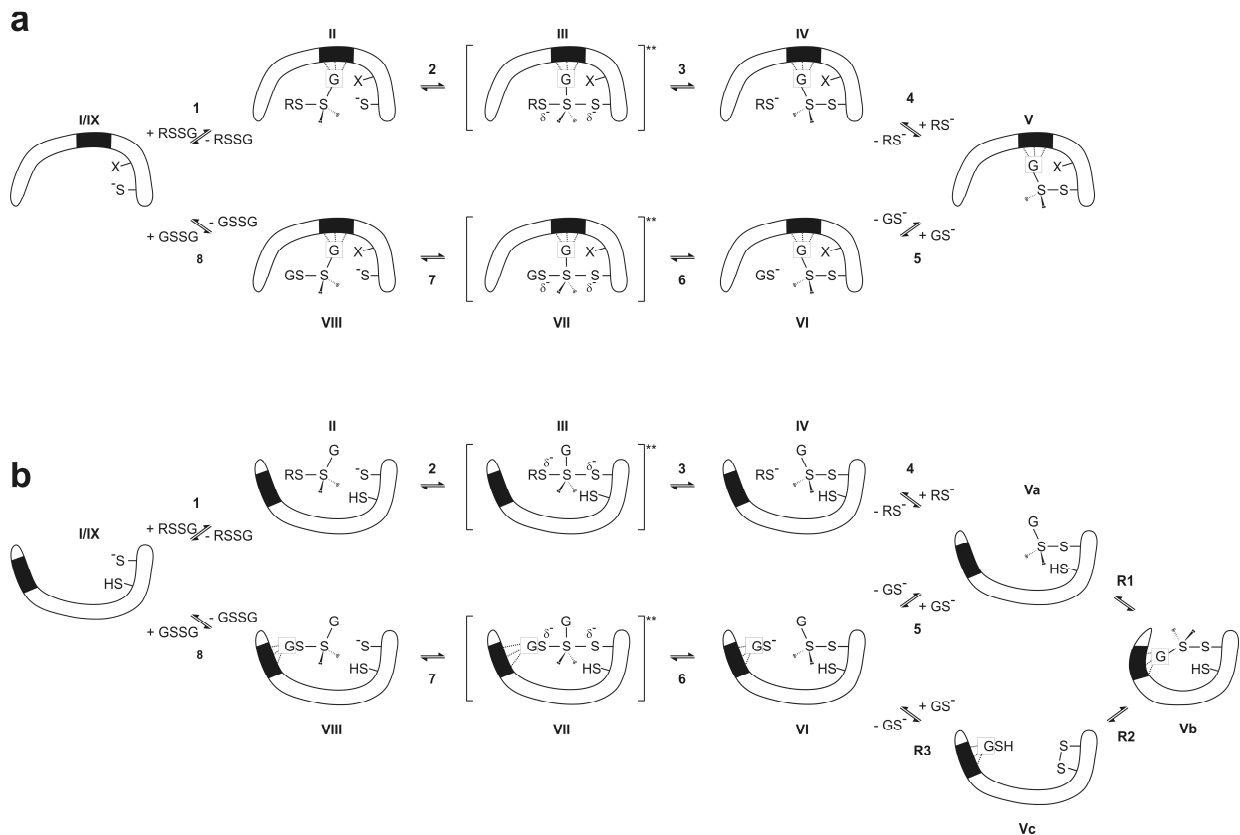


Abbildung 39: Verfeinerte Modelle des Grx-Katalysemechanismus

Um den trigonalen, bipyramidalen Übergangszustand einer S_N2 -Reaktion zu erhalten, ist ein 180° Winkel zwischen der Disulfidbrücke des Substrats und dem angreifenden Thiolat ideal [270]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Enzym-Substrat-Komplexe in ihrer Geometrie eingeschränkt sind und die Glutathionylreste des Disulfidsubstrats und des GSH während der Katalyse unterschiedliche Positionen einnehmen, sofern keine Konformationsänderungen stattfinden. a) Im Glutathiongerüst-Modell bleibt der Glutathionylrest während der gesamten Katalyse in der Glutathionbindungsstelle gebunden. Das zweite Cystein des CxxC-Motivs im aktiven Zentrum kann durch eine andere AS ersetzt werden. b) Im Glutathionaktivator-Modell ist die Interaktion von Grx mit GSH während der reduktiven Halbreaktion für die Katalyse am wichtigsten (Schritt 6,7). Das Cystein-Auflösungs-Modell umfasst die Reaktionen R1-R3 und erklärt den Aktivitätsverlust von Monothiol-Grx und einigen mutierten Dithiol-Grx. Schritt 5 scheint in ScGrx8 nicht in nennenswertem Maße stattzufinden. Beide Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus.

Ein weiterer Punkt der ungeklärt bleibt ist, warum die Mutation eines zweiten Cysteins die Aktivität einiger Grx *in vitro* extrem verringert oder diese sogar komplett inaktiviert [152, 157, 168, 267]. Diese Punkte können mit dem Aktivator-Modell in Kombination mit dem Cystein-Auflösungs-Modell erklärt werden (Abbildung 39b). Der Cysteinthiolatrest der meisten, jedoch nicht aller Grx, ist wahrscheinlich sehr reaktiv. Daher ist die oxidative Halbreaktion nicht notwendiger Weise von starken Interaktionen, jedoch von der korrekten Orientierung des Disulfidsubstrates abhängig (Schritt 1-3). Die Bindung und Aktivierung des schwachen Nucleophils GSH (Schritt 6, 7) kann, wie für humanes Grx gezeigt, ausschlaggebend für die Katalyse sein [173], und daher können alternative GSH Aktivierungsstellen zu signifikant veränderten enzymatischen Aktivitäten führen. So deuten die Messungen in Abbildung 33e und Abbildung 34g

darauf hin, dass oxidiertes ScGrx8 im unteren millimolaren Bereich mit GSH halb gesättigt ist, während der K_m von ScGrx7 für GSH im mittleren mikromolaren Bereich liegt [158], was eine Anpassung an die Lokalisation im sekretorischen Stoffwechselweg darstellen kann [157].

Die Stabilität des Zwischenprodukts Va in Abbildung 39a ist ein kritischer Punkt im Cystein-Auflösungs-Modell (Schritte R1-R3). Abgesehen von der Nutzung von nicht-Glutathionsubstraten (Abbildung 4, Schritt 5) liefert dieses Modell eine alternative Erklärung dafür, warum einige Grx ein zweites Cystein behalten haben. Nach der Freisetzung des ersten Produkts (Abbildung 39b, Schritt 4) kann die Reaktion entweder ohne Probleme über Schritt 5 fortgesetzt werden, oder das kovalent gebundene Glutathion kann die GSH-Aktivierungsstelle aufgrund der identischen Struktur einnehmen (Spezies Vb). Falls Reaktion R1 in erhöhtem Maße stattfindet (z. B. ScGrx8) kann dies aufgrund struktureller Änderungen zur Verlangsamung der kompletten Reaktion führen. Im Fall vieler Monothiol-Grx und ScGrx8^{C28S} könnte Reaktion R1 zur Inaktivierung des Proteins führen, wenn das Gleichgewicht stark auf der Seite von Spezies Vb liegt. Diese Spezies könnte *in vivo* einen guten Redoxsensor darstellen [157]. Für Dithiol-Grx, wie ScGrx8, oder spezielle Monothiol-Grx, wie ScGrx5 [168], könnte ein zweites Cystein diese intermolekulare Disulfidbrücke auflösen (Spezies Vc), und das Enzym würde *in vivo* und *in vitro* in den Katalysezyklus zurück geführt werden. Im Gegensatz zu den meisten Monothiol-Grx scheint Reaktion R1 im HEDS-Assay mit ScGrx7 nicht stattzufinden. Trotzdem kann die komplette Entfernung von nichtkovalent gebundenem GSH bei der Reinigung von ScGrx7-SSG die Bildung von Spezies Vb fördern. Dementsprechend würde die von GSH unabhängige Rückreaktion R1 für die reduktive Halbreaktion von gereinigtem ScGrx7-SSG geschwindigkeitsbestimmend werden (Abbildung 34h, j, l) [157].

Die vorgestellten Modelle müssen sich nicht gegenseitig ausschließen. Eine Möglichkeit ist, dass es mehrere GSH-Interaktionsstellen in jedem Grx gibt, eine Gerüststelle und eine Aktivatorstelle. So könnten ein oder zwei Aminosäuren die als Säure-Base-Katalysator fungieren ausreichend für die Aktivatorstelle sein und in einigen Monothiol-Grx ersetzt worden sein. Alternativ könnte Spezies V aus Abbildung 39a (Schritt 1-4) die Konformation ändern was zur Freisetzung des Glutathion und der Umwandlung dieser Spezies in Spezies V aus Abbildung 39b führen würde.

In diesem Fall könnten das Glutathiongerüst- und das Glutathionaktivator-Modell identisch sein und beide Halbreaktionen katalysieren. Letztendlich kann das verfeinerte Modell bei der Unterscheidung verschiedener Grx-Klassen helfen und als Ausgangspunkt für die genaue Definition des Katalysemechanismus von Grx dienen [157].

5 Zusammenfassung

Kinetoplastiden bilden eine Gruppe von Organismen, die sich wahrscheinlich sehr früh in der eukaryotischen Evolution gebildet hat. Erste bioinformatische Untersuchungen des mitochondrialen Proteinimports von Kinetoplastiden weisen deutliche Unterschiede zu den vor allem an Opisthokonten etablierten Modellen auf. Die auffälligsten Ergebnisse dieser Studien waren das Fehlen einiger essentieller Komplexe sowie die rudimentäre Zusammensetzung der anderen bekannten Komplexe. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher Komponenten der Importmaschinerie von *Leishmania tarentolae* identifiziert und der Organismus als Modellsystem des mitochondrialen Proteinimports in nicht-Opisthokonten etabliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in *L. tarentolae* zusätzlich zu den wenigen in früheren, bioinformatischen Studien bestimmten Komponenten des mitochondrialen Proteinimports Homologe von ScErv1, den kleinen-Tim-Proteinen sowie eine neue Gruppe von kleinen-Tim-ähnlichen-Proteinen identifiziert. Letztere zeichnet sich durch die Abwesenheit der äußeren Disulfidbrücke in den Proteinen aus. Die experimentell ermittelte, submitochondriale Lokalisation der Proteine LtTob55, LtTim17, LtHsp60, LtErv und LtsTim1 entspricht ihren Homologen in Hefe, wobei sowohl LtErv als auch LtsTim1 eine auffällig starke Membranassoziation aufwiesen. Damit wurden zum ersten Mal Komponenten aller mitochondrialer Kompartimente eines einzelligen Nicht-Opisthokonten experimentell untersucht und als Marker etabliert. Die funktionelle Analyse des mitochondrialen Proteinimports in *L. tarentolae* ergab, dass sowohl die potentiellen Substratproteine LtTob55, LtTim17, LtHsp60, LtsTim1 sowie LtErv, als auch die Hefe- und *N. crassa*-Substratproteine NcPorin, NcAAC, ScDLD, NcSu9 und NcTim9 in isolierte Leishmanienmitochondrien importiert werden. Dass der Import der *L. tarentolae* Substrate auch in isolierte Hefemitochondrien gelang, lässt auf eine starke funktionelle Konservierung des mitochondrialen Proteinimports trotz der signifikanten strukturellen Unterschiede der Importmaschinerien schließen. Das Mia-Erv-Disulfidtransfersystem in *L. tarentolae* wurde exemplarisch näher charakterisiert. Dabei wurde kein zu ScMia40 homologes Protein identifiziert. Auch das Flavoprotein LtErv weist im Vergleich zu ScErv1 deutliche Unterschiede in Position und Sequenz der Cysteinmotive, sowie eine große zusätzliche Kinetoplastiddomäne unbekannter Funktion auf. Äquivalent zu ScErv1 ist LtErv eine Thiol-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase und bildet Homodimere deren Cysteinmotive spezifisch miteinander interagieren. Eine Komplementation von ScErv1 durch das Leishmanienprotein ist jedoch trotz der Lokalisation im IMS der Hefemitochondrien nicht möglich. Dies deutet auf signifikante Unterschiede im Katalysemechanismus des Erv-Proteins in Leishmanienmitochondrien hin. Für die detaillierte Charakterisierung weiterer Importkomplexe wurden Konstrukte erstellt. Diese Konstrukte wurden erfolgreich in *L. tarentolae* exprimiert und erlauben es die Komplexe zu isolieren und zu charakterisieren.

Glutaredoxine sind eine funktionell heterogene Gruppe von Redox-Proteinen die eine Thioredoxin-Faltung besitzen und üblicherweise als Monomer vorliegen. Sie werden entsprechend der Cysteinanzahl im aktiven Zentrum in Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxine eingeteilt. In Hefe wurden bisher zwei Dithiol-Glutaredoxine sowie drei Monothiol-Glutaredoxine charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die drei neuen Hefeglutaredoxine ScGrx6, ScGrx7 und ScGrx8 bezüglich ihrer Struktur sowie ihrer Enzymaktivität vergleichend charakterisiert wer-

den. Das Strukturmodell des Dithiol-Glutaredoxin ScGrx8 hat eine typische Glutaredoxinfaltung, weist jedoch einige ungewöhnliche Merkmale auf. So ist die Substratbindungsstelle gegenüber klassischen Dithiol-Glutaredoxinen deutlich verändert und das Cysteinmotiv im aktiven Zentrum weist Ähnlichkeiten zu Trp14 auf. Wie die meisten Glutaredoxine liegt es als Monomer vor. Im Gegensatz dazu bilden die beiden Monothiol-Glutaredoxine Grx6 und 7 nicht-kovalent verknüpfte Dimere aus. Die ScGrx6 Dimere sind zum Teil ebenfalls über kovalente Bindungen verbunden. Des Weiteren ist ScGrx6 das erste Monothiol-Glutaredoxin für welches die direkte Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters nachgewiesen wurde. Die Bindung des Eisen-Schwefel-Clusters wird durch reduziertes Glutathion stabilisiert und der Verlust des Clusters führt zum Zerfall des Tetramers in Dimere. Alle drei Glutaredoxine sind im Standardassay aktiv, womit ScGrx6 und ScGrx7 die ersten in diesem Assay aktiven Monothiol-Glutaredoxine überhaupt sind. Die Bindung des Eisen-Schwefel-Clusters führt jedoch zum Verlust der Aktivität von ScGrx6. Die Steady-State-Kinetiken von ScGrx7 sind denen von Dithiol-Glutaredoxinen ähnlich, wobei der apparente k_{cat} ca. drei Zehnerpotenzen höher ist als bei ScGrx8. Der apparente K_m beider Proteine ist sehr ähnlich. Sowohl ScGrx8 als auch ScGrx7 scheinen dem bisherigen Katalysemodell entsprechend nach einem Ping-Pong-Mechanismus zu reagieren, in dessen Zwischenschritt die Proteine glutathionyliert vorliegen. Im Unterschied zu diesem Modell sind jedoch beide Cysteine des aktiven Zentrums von ScGrx8 für die Aktivität des Enzyms nötig. Daher wurde ein erweitertes Modell der Katalyse von Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen aufgestellt, das bisher ungeklärte Resultate der Glutaredoxinkatalyse erklären könnte und unterschiedliche Funktionen für die Glutaredoxine *in vivo* andeutet.

6 Literatur

1. Margulis, L., *Symbiosis and evolution*. Sci Am, 1971. **225**(2): p. 48-57.
2. Muhlenhoff, U. and R. Lill, *Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 370-82.
3. Borst, P. and L.A. Grivell, *The mitochondrial genome of yeast*. Cell, 1978. **15**(3): p. 705-23.
4. Mokranjac, D. and W. Neupert, *Energetics of protein translocation into mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 758-62.
5. Roise, D., et al., *Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function*. EMBO J, 1988. **7**(3): p. 649-53.
6. Heijne, G., *The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology*. EMBO J, 1986. **5**(11): p. 3021-7.
7. Gakh, O., P. Cavadini, and G. Isaya, *Mitochondrial processing peptidases*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 63-77.
8. Brix, J., K. Dietmeier, and N. Pfanner, *Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20730-5.
9. Wiedemann, N., A.E. Frazier, and N. Pfanner, *The protein import machinery of mitochondria*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14473-6.
10. Hill, K., et al., *Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 516-21.
11. Kunkele, K.P., et al., *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1009-19.
12. Model, K., et al., *Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(4): p. 361-70.
13. Rapaport, D., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(4): p. 191-7.
14. Krimmer, T., et al., *Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex*. J Cell Biol, 2001. **152**(2): p. 289-300.
15. Neupert, W. and J.M. Herrmann, *Translocation of proteins into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 723-49.
16. Hoppins, S.C. and F.E. Nargang, *The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12396-405.
17. Habib, S.J., et al., *Assembly of the TOB complex of mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6434-40.
18. Wiedemann, N., et al., *Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 565-71.
19. Chan, N.C. and T. Lithgow, *The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(1): p. 126-36.
20. Kozjak, V., et al., *An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48520-3.
21. Paschen, S.A., et al., *Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 862-6.
22. Dukanovic, J., et al., *Genetic and functional interactions between the mitochondrial outer membrane proteins Tom6 and Sam37*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(22): p. 5975-88.
23. Becker, T., et al., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 120-7.
24. Boldogh, I.R., et al., *A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(11): p. 4618-27.
25. Meisinger, C., et al., *Mitochondrial protein sorting: differentiation of beta-barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22819-26.
26. Meisinger, C., et al., *The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane*. Dev Cell, 2004. **7**(1): p. 61-71.
27. Harner, M., W. Neupert, and M. Deponte, *Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria*. EMBO J, 2011. **30**(16): p. 3232-41.

28. Stojanovski, D., et al., *Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins*. J Cell Biol, 2007. **179**(5): p. 881-93.
29. Thornton, N., et al., *Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of alpha-helical outer membrane proteins*. J Mol Biol, 2010. **396**(3): p. 540-9.
30. Papic, D., et al., *Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway*. J Cell Biol, 2011. **194**(3): p. 397-405.
31. Glick, B.S., et al., *Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism*. Cell, 1992. **69**(5): p. 809-22.
32. Esaki, M., et al., *Two distinct mechanisms drive protein translocation across the mitochondrial outer membrane in the late step of the cytochrome b(2) import pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(21): p. 11770-5.
33. Haucke, V., et al., *Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b5 reductase to two locations within yeast mitochondria*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 4024-32.
34. Hartl, F.U., et al., *Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide*. Cell, 1987. **51**(6): p. 1027-37.
35. Popov-Celeketic, D., et al., *Role of the import motor in insertion of transmembrane segments by the mitochondrial TIM23 complex*. EMBO Rep, 2011. **12**(6): p. 542-8.
36. Martin, J., K. Mahlke, and N. Pfanner, *Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 18051-7.
37. Manning-Krieg, U.C., P.E. Scherer, and G. Schatz, *Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix*. EMBO J, 1991. **10**(11): p. 3273-80.
38. Neupert, W. and M. Brunner, *The protein import motor of mitochondria*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 555-65.
39. Pfanner, N., et al., *The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria*. J Biol Chem, 1987. **262**(31): p. 14851-4.
40. Smagula, C. and M.G. Douglas, *Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in Saccharomyces cerevisiae. Sequences required for receptor binding and membrane translocation*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6783-90.
41. Smagula, C.S. and M.G. Douglas, *ADP-ATP carrier of Saccharomyces cerevisiae contains a mitochondrial import signal between amino acids 72 and 111*. J Cell Biochem, 1988. **36**(4): p. 323-7.
42. Palmisano, A., et al., *Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 1): p. 151-8.
43. Curran, S.P., et al., *The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1017-27.
44. Vial, S., et al., *Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36100-8.
45. Rehling, P., et al., *Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1747-51.
46. Sirrenberg, C., et al., *Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22*. Nature, 1996. **384**(6609): p. 582-5.
47. Herrmann, J.M. and W. Neupert, *Protein transport into mitochondria*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(2): p. 210-4.
48. Endo, T., H. Yamamoto, and M. Esaki, *Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 16): p. 3259-67.
49. Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner, *Mitochondrial import and the twin-pore translocase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 519-30.
50. Hell, K., W. Neupert, and R.A. Stuart, *Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1281-8.
51. Lutz, T., W. Neupert, and J.M. Herrmann, *Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space*. EMBO J, 2003. **22**(17): p. 4400-8.
52. Kurz, M., et al., *Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(7): p. 2461-74.
53. Morgan, B. and H. Lu, *Oxidative folding competes with mitochondrial import of the small Tim proteins*. Biochem J, 2008. **411**(1): p. 115-22.

54. Nicholson, D.W. and W. Neupert, *Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4340-4.
55. Dumont, M.E., J.F. Ernst, and F. Sherman, *Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 15928-37.
56. Dumont, M.E., et al., *Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5487-96.
57. Nargang, F.E., et al., *A mutant of Neurospora crassa deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria*. J Biol Chem, 1988. **263**(19): p. 9388-94.
58. Lamb, A.L., et al., *Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(9): p. 751-5.
59. Furukawa, Y., A.S. Torres, and T.V. O'Halloran, *Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS*. EMBO J, 2004. **23**(14): p. 2872-81.
60. Tokatlidis, K., *A disulfide relay system in mitochondria*. Cell, 2005. **121**(7): p. 965-7.
61. Mesecke, N., et al., *A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1059-69.
62. Allen, S., et al., *Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c*. J Mol Biol, 2005. **353**(5): p. 937-44.
63. Rissler, M., et al., *The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins*. J Mol Biol, 2005. **353**(3): p. 485-92.
64. Grumbt, B., et al., *Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37461-70.
65. Bien, M., et al., *Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione*. Mol Cell, 2010. **37**(4): p. 516-28.
66. Sideris, D.P., et al., *A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding*. J Cell Biol, 2009. **187**(7): p. 1007-22.
67. Milenkovic, D., et al., *Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(10): p. 2530-9.
68. Riemer, J., M. Fischer, and J.M. Herrmann, *Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(3): p. 981-9.
69. Lisowsky, T., *Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast*. Mol Gen Genet, 1992. **232**(1): p. 58-64.
70. Becher, D., et al., *A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution*. Yeast, 1999. **15**(12): p. 1171-81.
71. Lisowsky, T., *ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1994. **26**(1): p. 15-20.
72. Lange, H., et al., *An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 715-20.
73. Gross, E., et al., *A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 61-7.
74. Wu, C.K., et al., *The crystal structure of augments of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase*. Protein Sci, 2003. **12**(5): p. 1109-18.
75. Vitu, E., et al., *Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide*. J Mol Biol, 2006. **362**(1): p. 89-101.
76. Rodriguez, I., et al., *African swine fever virus pB119L protein is a flavin adenine dinucleotide-linked sulfhydryl oxidase*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3157-66.
77. Dym, O. and D. Eisenberg, *Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins*. Protein Sci, 2001. **10**(9): p. 1712-28.
78. Fass, D., *The Erv family of sulfhydryl oxidases*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 557-66.
79. Hofhaus, G., et al., *The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre*. Eur J Biochem, 2003. **270**(7): p. 1528-35.
80. Lee, J., G. Hofhaus, and T. Lisowsky, *Erv1p from Saccharomyces cerevisiae is a FAD-linked sulfhydryl oxidase*. FEBS Lett, 2000. **477**(1-2): p. 62-6.
81. Williams, C.H., et al., *Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6110-7.

82. Deponte, M., et al., *Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20628-37.
83. Deponte, M. and K. Hell, *Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria*. J Biochem, 2009. **146**(5): p. 599-608.
84. Lionaki, E., et al., *The N-terminal shuttle domain of Erv1 determines the affinity for Mia40 and mediates electron transfer to the catalytic Erv1 core in yeast mitochondria*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(9): p. 1327-39.
85. Terziyska, N., et al., *Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 179-84.
86. Farrell, S.R. and C. Thorpe, *Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity*. Biochemistry, 2005. **44**(5): p. 1532-41.
87. Bihlmaier, K., et al., *The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): p. 389-95.
88. Margulis, L., *Five kingdoms: An illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*. 1998, New York: W. H. Freeman and Company.
89. Simpson, A.G. and A.J. Roger, *The real 'kingdoms' of eukaryotes*. Curr Biol, 2004. **14**(17): p. R693-6.
90. Baldauf, S.L., *The deep roots of eukaryotes*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1703-6.
91. Schneider, A., D. Bursac, and T. Lithgow, *The direct route: a simplified pathway for protein import into the mitochondrion of trypanosomes*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(1): p. 12-8.
92. Shapiro, T.A. and P.T. Englund, *The structure and replication of kinetoplast DNA*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 117-43.
93. Trager, W., *The kinetoplast and differentiation in certain parasitic protozoa*. The American Naturalist, 1965. **69**(907): p. 11.
94. Stuart, K.D., et al., *Complex management: RNA editing in trypanosomes*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(2): p. 97-105.
95. Stuart, K., *RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(2): p. 68-72.
96. Malvy, D. and F. Chappuis, *Sleeping sickness*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(7): p. 986-95.
97. WHO, *Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update*. Wkly Epidemiol Rec, 2006. **81**(8): p. 71-80.
98. Parsons, M., *Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose*. Mol Microbiol, 2004. **53**(3): p. 717-24.
99. Clayton, C., T. Hausler, and J. Blattner, *Protein trafficking in kinetoplastid protozoa*. Microbiol Rev, 1995. **59**(3): p. 325-44.
100. Fenn, K. and K.R. Matthews, *The cell biology of Trypanosoma brucei differentiation*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(6): p. 539-46.
101. Michels, P.A., et al., *Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(12): p. 1463-77.
102. WHO. *Chagas disease (american trypanosomiasis)*. 2010; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html.
103. Andrews, N.W., *Living dangerously: how Trypanosoma cruzi uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm*. Biol Res, 1993. **26**(1-2): p. 65-7.
104. Dvorak, J.A. and C.L. Howe, *The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells in vitro*. J Protozool, 1976. **23**(4): p. 534-7.
105. Rodriguez, A., et al., *Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 93-104.
106. Andrews, N.W., et al., *Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol, 1987. **64**(3): p. 474-84.
107. Ley, V., et al., *Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infective cycle in mammalian cells*. J Exp Med, 1988. **168**(2): p. 649-59.
108. Tyler, K.M. and D.M. Engman, *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*. Int J Parasitol, 2001. **31**(5-6): p. 472-81.
109. Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern, *Leishmaniasis and poverty*. Trends Parasitol, 2006. **22**(12): p. 552-7.
110. Colotti, G. and A. Ilari, *Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione*. Amino Acids, 2011. **40**(2): p. 269-85.
111. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. **64**: p. 1-109.
112. Opperdoes, F.R. and G.H. Coombs, *Metabolism of Leishmania: proven and predicted*. Trends Parasitol, 2007. **23**(4): p. 149-58.

113. Gentle, I., et al., *The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria*. J Cell Biol, 2004. **164**(1): p. 19-24.
114. Bennion, D., et al., *Dissection of beta-barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2010. **77**(5): p. 1153-71.
115. Lithgow, T. and A. Schneider, *Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1541): p. 799-817.
116. Berriman, M., et al., *The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei*. Science, 2005. **309**(5733): p. 416-22.
117. Burri, L., et al., *Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15916-20.
118. Hausler, T., et al., *Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes Crithidia, Trypanosoma and Trichomonas*. Eur J Cell Biol, 1997. **73**(3): p. 240-51.
119. Priest, J.W. and S.L. Hajduk, *In vitro import of the Rieske iron-sulfur protein by trypanosome mitochondria*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20060-9.
120. Priest, J.W. and S.L. Hajduk, *Trypanosoma brucei cytochrome c1 is imported into mitochondria along an unusual pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 15084-94.
121. Tasker, M., et al., *Cytochrome oxidase subunit VI of Trypanosoma brucei is imported without a cleaved presequence and is developmentally regulated at both RNA and protein levels*. Mol Microbiol, 2001. **39**(2): p. 272-85.
122. Priest, J.W., Z.A. Wood, and S.L. Hajduk, *Cytochromes c1 of kinetoplastid protozoa lack mitochondrial targeting presequences*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1144**(2): p. 229-31.
123. Uboldi, A.D., et al., *A mitochondrial protein affects cell morphology, mitochondrial segregation and virulence in Leishmania*. Int J Parasitol, 2006. **36**(14): p. 1499-514.
124. Hurt, E.C., U. Muller, and G. Schatz, *The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane*. EMBO J, 1985. **4**(13A): p. 3509-18.
125. Alvarez-Fortes, E., et al., *Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in Leishmania major promastigotes*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **93**(2): p. 191-202.
126. Bhaduri-McIntosh, S. and A.B. Vaidya, *Plasmodium falciparum: import of a phosphate carrier protein into heterologous mitochondria*. Exp Parasitol, 1998. **88**(3): p. 252-4.
127. Bowler, C., et al., *A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(9): p. 3237-41.
128. Dolezal, P., et al., *Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10924-9.
129. Murcha, M.W., et al., *Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis*. Plant Physiol, 2003. **131**(4): p. 1737-47.
130. Macasev, D., et al., *Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2004. **21**(8): p. 1557-64.
131. Pusnik, M., et al., *Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin*. Curr Biol, 2011. **21**(20): p. 1738-43.
132. Dolezal, P., et al., *Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria*. Science, 2006. **313**(5785): p. 314-8.
133. Gentle, I.E., et al., *Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(5): p. 1149-60.
134. Janssen-Heininger, Y.M., et al., *Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(1): p. 1-17.
135. Imlay, J.A., *Pathways of oxidative damage*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 395-418.
136. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. Curr Med Chem, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
137. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
138. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
139. Ottaviano, F.G., D.E. Handy, and J. Loscalzo, *Redox regulation in the extracellular environment*. Circ J, 2008. **72**(1): p. 1-16.
140. Flohe, L., *Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation*. Methods Enzymol, 2010. **473**: p. 1-39.

141. Mieyal, J.J., et al., *Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(11): p. 1941-88.
142. Mieyal, J.J., et al., *Thioltransferase in human red blood cells: kinetics and equilibrium*. *Biochemistry*, 1991. **30**(36): p. 8883-91.
143. Bonham, C.A. and P.O. Vacratsis, *Redox regulation of the human dual specificity phosphatase YVH1 through disulfide bond formation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(34): p. 22853-64.
144. Figtree, G.A., et al., *Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation*. *Circ Res*, 2009. **105**(2): p. 185-93.
145. Leonard, S.E., K.G. Reddie, and K.S. Carroll, *Mining the thiol proteome for sulfenic acid modifications reveals new targets for oxidation in cells*. *ACS Chem Biol*, 2009. **4**(9): p. 783-99.
146. Nadeau, P.J., S.J. Charette, and J. Landry, *REDOX reaction at ASK1-Cys250 is essential for activation of JNK and induction of apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(16): p. 3628-37.
147. Becker, K., et al., *Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite Plasmodium falciparum*. *Biol Chem*, 2003. **384**(4): p. 551-66.
148. Krauth-Siegel, R.L., H. Bauer, and R.H. Schirmer, *Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005. **44**(5): p. 690-715.
149. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(33): p. 17205-8.
150. Holmgren, A., *Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide*. *Structure*, 1995. **3**(3): p. 239-43.
151. Lillig, C.H., C. Berndt, and A. Holmgren, *Glutaredoxin systems*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(11): p. 1304-17.
152. Bushweller, J.H., et al., *Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione*. *Biochemistry*, 1992. **31**(38): p. 9288-93.
153. Bushweller, J.H., et al., *The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between Escherichia coli glutaredoxin(C14S) and glutathione*. *J Mol Biol*, 1994. **235**(5): p. 1585-97.
154. Johansson, C., et al., *Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(5): p. 3077-82.
155. Yang, Y., et al., *Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity*. *Biochemistry*, 1998. **37**(49): p. 17145-56.
156. Herrero, E. and M.A. de la Torre-Ruiz, *Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(12): p. 1518-30.
157. Eckers, E., et al., *Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from Saccharomyces cerevisiae: the catalytic redox mechanism redux*. *Biochemistry*, 2009. **48**(6): p. 1410-23.
158. Mesecke, N., et al., *Two novel monothiol glutaredoxins from Saccharomyces cerevisiae provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins*. *Biochemistry*, 2008. **47**(5): p. 1452-63.
159. Rouhier, N., S.D. Lemaire, and J.P. Jacquot, *The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation*. *Annu Rev Plant Biol*, 2008. **59**: p. 143-66.
160. Holmgren, A., *Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(9): p. 3664-71.
161. Hopper, S., et al., *Glutaredoxin from rabbit bone marrow. Purification, characterization, and amino acid sequence determined by tandem mass spectrometry*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(34): p. 20438-47.
162. Luikenhuis, S., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(5): p. 1081-91.
163. Luthman, M. and A. Holmgren, *Glutaredoxin from calf thymus. Purification to homogeneity*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(12): p. 6686-90.
164. Vlamis-Gardikas, A., et al., *Cloning, overexpression, and characterization of glutaredoxin 2, an atypical glutaredoxin from Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): p. 11236-43.
165. Deponte, M., K. Becker, and S. Rahlfs, *Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins*. *Biol Chem*, 2005. **386**(1): p. 33-40.
166. Fernandes, A.P., et al., *A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(26): p. 24544-52.

167. Filser, M., et al., *Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of Trypanosoma brucei monothiol glutaredoxin-1*. Biol Chem, 2008. **389**(1): p. 21-32.
168. Tamarit, J., et al., *Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25745-51.
169. Zaffagnini, M., et al., *Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 8868-76.
170. Haunhorst, P., et al., *Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(2): p. 372-6.
171. Gallogly, M.M., et al., *Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: implications for intracellular roles*. Biochemistry, 2008. **47**(42): p. 11144-57.
172. Gravina, S.A. and J.J. Mieyal, *Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase*. Biochemistry, 1993. **32**(13): p. 3368-76.
173. Srinivasan, U., P.A. Mieyal, and J.J. Mieyal, *pH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis*. Biochemistry, 1997. **36**(11): p. 3199-206.
174. Yang, Y.F. and W.W. Wells, *Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12759-65.
175. Karplus, P.A. and G.E. Schulz, *Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution*. J Mol Biol, 1989. **210**(1): p. 163-80.
176. Schulz, G.E., et al., *The structure of the flavoenzyme glutathione reductase*. Nature, 1978. **273**(5658): p. 120-4.
177. Pedrajas, J.R., et al., *Two isoforms of Saccharomyces cerevisiae glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 3): p. 617-23.
178. Porrás, P., et al., *One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16551-62.
179. Porrás, P., et al., *Structure and function of yeast glutaredoxin 2 depend on postranslational processing and are related to subcellular distribution*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(4): p. 839-45.
180. Collinson, E.J. and C.M. Grant, *Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22492-7.
181. Collinson, E.J., et al., *The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16712-7.
182. Rodríguez-Manzanéque, M.T., et al., *Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8180-90.
183. Lopreiato, R., et al., *Analysis of the interaction between p1D261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of Saccharomyces cerevisiae, and the Grx4 glutaredoxin*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 395-405.
184. Ojeda, L., et al., *Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17661-9.
185. Pujol-Carrion, N., et al., *Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 21): p. 4554-64.
186. Mercier, A. and S. Labbe, *Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1*. J Biol Chem, 2009. **284**(30): p. 20249-62.
187. Rodríguez-Manzanéque, M.T., et al., *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1109-21.
188. Molina, M.M., et al., *Nuclear monothiol glutaredoxins of Saccharomyces cerevisiae can function as mitochondrial glutaredoxins*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 51923-30.
189. Rojo, E.E., et al., *Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8040-7.
190. Eckers, E., et al., *Mitochondrial protein import pathways are functionally conserved among eukaryotes despite compositional diversity of the import machineries*. Biol Chem, 2012. **393**(6): p. 513-24.
191. Mayer, A., R. Lill, and W. Neupert, *Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria*. J Cell Biol, 1993. **121**(6): p. 1233-43.

192. Pfanner, N., M. Tropschug, and W. Neupert, *Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors*. Cell, 1987. **49**(6): p. 815-23.
193. Vasiljev, A., *Isolation and characterisation of the intermembrane space components of the mitochondrial TIM22 protein import machinery of Neurospora crassa*. 2004.
194. LeBowitz, J.H., et al., *Development of a stable Leishmania expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9736-40.
195. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
196. Rothstein, R.J., *One-step gene disruption in yeast*. Methods Enzymol, 1983. **101**: p. 202-11.
197. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**(1): p. 19-27.
198. Sherman, F., G.R. Fink, and J. Hicks, eds. *Methods in yeast genetics: A laboratory course*. 1986, Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York.
199. Daum, G., P.C. Bohni, and G. Schatz, *Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria*. J Biol Chem, 1982. **257**(21): p. 13028-33.
200. Griffiths, G., et al., *Immunolectron microscopy using thin, frozen sections: application to studies of the intracellular transport of Semliki Forest virus spike glycoproteins*. Methods Enzymol, 1983. **96**: p. 466-85.
201. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
202. Laemmli, U., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
203. Fairbanks, G., T.L. Steck, and D.F. Wallach, *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. Biochemistry, 1971. **10**(13): p. 2606-17.
204. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
205. van Dooren, G.G., L.M. Stimmler, and G.I. McFadden, *Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(4): p. 596-630.
206. Baker, M.J., et al., *Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 769-79.
207. Meier, S., W. Neupert, and J.M. Herrmann, *Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7777-85.
208. Rassow, J., et al., *The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution*. J Mol Biol, 1999. **286**(1): p. 105-20.
209. Herrmann, J.M., W. Neupert, and R.A. Stuart, *Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p*. EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2217-26.
210. Braly, P., L. Simpson, and F. Kretzer, *Isolation of kinetoplast-mitochondrial complexes from Leishmania tarentolae*. J Protozool, 1974. **21**(5): p. 782-90.
211. Bringaud, F., et al., *Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 1995. **74**(1): p. 119-23.
212. Eckers, E. and M. Deponte, *No need for labels: the autofluorescence of Leishmania tarentolae mitochondria and the necessity of negative controls*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47641.
213. Simpson, L. and F. Kretzer, *The mitochondrion in dividing Leishmania tarentolae cells is symmetric and circular and becomes a single asymmetric tubule in non-dividing cells due to division of the kinetoplast portion*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **87**(1): p. 71-8.
214. Hell, K., *The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 601-9.
215. Chacinska, A., et al., *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins*. EMBO J, 2004. **23**(19): p. 3735-46.
216. Eckers, E., et al., *Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl:cytochrome C oxidoreductase Erv in opisthokonts and parasitic protists*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2676-88.
217. McMillan, P.J., et al., *Identification of acid-base catalytic residues of high-Mr thioredoxin reductase from Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 32967-77.
218. Huang, H.H., et al., *Acid-base catalysis in the mechanism of thioredoxin reductase from Drosophila melanogaster*. Biochemistry, 2008. **47**(6): p. 1721-31.

219. Koehler, C.M., *New developments in mitochondrial assembly*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 309-35.
220. Mesecke, N., et al., *A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2673-80.
221. Fladvad, M., et al., *Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Grx4, a monothiol glutaredoxin from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24553-61.
222. Aslund, F., K.D. Berndt, and A. Holmgren, *Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30780-6.
223. Woo, J.R., et al., *Structural basis of cellular redox regulation by human TRP14*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48120-5.
224. Jeong, W., et al., *Identification and characterization of TRP14, a thioredoxin-related protein of 14 kDa. New insights into the specificity of thioredoxin function*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3142-50.
225. Johansson, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7537-43.
226. van Wilpe, S., et al., *Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 485-9.
227. Kutik, S., et al., *Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1011-24.
228. Pusnik, M., et al., *The single mitochondrial porin of Trypanosoma brucei is the main metabolite transporter in the outer mitochondrial membrane*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(3): p. 671-80.
229. Walther, D.M., et al., *Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2531-6.
230. Chacinska, A., et al., *Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms*. Cell, 2009. **138**(4): p. 628-44.
231. Endo, T. and K. Yamano, *Multiple pathways for mitochondrial protein traffic*. Biol Chem, 2009. **390**(8): p. 723-30.
232. Hauser, R., et al., *In vitro import of proteins into mitochondria of Trypanosoma brucei and Leishmania tarentolae*. J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 2)**: p. 517-23.
233. Hewitt, V., F. Alcock, and T. Lithgow, *Minor modifications and major adaptations: the evolution of molecular machines driving mitochondrial protein import*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(3): p. 947-54.
234. Dagley, M.J., et al., *The protein import channel in the outer mitochondrial membrane of Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(9): p. 1941-7.
235. Dolezal, P., et al., *The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of Entamoeba histolytica*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000812.
236. McMillan, P.J., et al., *The human malaria parasite Plasmodium falciparum possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases*. Mol Microbiol, 2005. **55**(1): p. 27-38.
237. Sato, S., K. Rangachari, and R.J. Wilson, *Targeting GFP to the malarial mitochondrion*. Mol Biochem Parasitol, 2003. **130**(2): p. 155-8.
238. Singha, U.K., et al., *Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 2008. **159**(1): p. 30-43.
239. Singha, U.K., et al., *Protein Translocase of Mitochondrial Inner Membrane in Trypanosoma brucei*. J Biol Chem, 2012. **287**(18): p. 14480-93.
240. Allen, J.W., S.J. Ferguson, and M.L. Ginger, *Distinctive biochemistry in the trypanosome mitochondrial intermembrane space suggests a model for stepwise evolution of the MIA pathway for import of cysteine-rich proteins*. FEBS Lett, 2008. **582**(19): p. 2817-25.
241. Naoe, M., et al., *Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47815-21.
242. Bauer, H., et al., *The mechanism of high Mr thioredoxin reductase from Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33020-8.
243. Banci, L., et al., *An electron-transfer path through an extended disulfide relay system: the case of the redox protein ALR*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(3): p. 1442-5.
244. Andersson, H., et al., *Autofluorescence of living cells*. J Microsc, 1998. **191**(Pt 1): p. 1-7.
245. Chorvat, D., Jr., *Mitochondrial Autofluorescence Induced by Visible Light in Single Rat Cardiac Myocytes Studied by Spectrally Resolved Confocal Microscopy*. Laser Physics, 2004. **14**(2): p. 10.
246. Davis, R.W., et al., *Accurate detection of low levels of fluorescence emission in autofluorescent background: francisella-infected macrophage cells*. Microsc Microanal, 2010. **16**(4): p. 478-87.

247. Aubin, J.E., *Autofluorescence of viable cultured mammalian cells*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(1): p. 36-43.
248. Benson, R.C., et al., *Cellular autofluorescence--is it due to flavins?* J Histochem Cytochem, 1979. **27**(1): p. 44-8.
249. Kunz, W., *Spectral properties of fluorescent flavoproteins of isolated rat liver mitochondria*. FEBS J, 1985. **195**(1): p. 5.
250. Duchen, M.R., A. Surin, and J. Jacobson, *Imaging mitochondrial function in intact cells*. Methods Enzymol, 2003. **361**: p. 353-89.
251. Kunz, W.S. and W. Kunz, *Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 1985. **841**(3): p. 237-46.
252. Huang, S., A.A. Heikal, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2811-25.
253. Kunz, W.S., *Spectral properties of fluorescent flavoproteins of isolated rat liver mitochondria*. FEBS Lett, 1986. **195**(1-2): p. 92-6.
254. Romashko, D.N., E. Marban, and B. O'Rourke, *Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1618-23.
255. van Weelden, S.W., et al., *New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic Trypanosoma brucei, a cycle not operating as a cycle*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12451-60.
256. Esseiva, A.C., et al., *Temporal dissection of Bax-induced events leading to fission of the single mitochondrion in Trypanosoma brucei*. EMBO Rep, 2004. **5**(3): p. 268-73.
257. Morgan, G.W., D. Goulding, and M.C. Field, *The single dynamin-like protein of Trypanosoma brucei regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10692-701.
258. Tyler, K.M., K.R. Matthews, and K. Gull, *Anisomorphic cell division by African trypanosomes*. Protist, 2001. **152**(4): p. 367-78.
259. Luo, M., et al., *Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6*. J Mol Biol, 2010. **398**(4): p. 614-22.
260. Lillig, C.H., et al., *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8168-73.
261. Rouhier, N., et al., *Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7379-84.
262. Izquierdo, A., et al., *Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(8): p. 1415-26.
263. Feng, Y., et al., *Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site*. Biochemistry, 2006. **45**(26): p. 7998-8008.
264. Kelley, J.J., 3rd, et al., *Comparison of backbone dynamics of reduced and oxidized Escherichia coli glutaredoxin-1 using 15N NMR relaxation measurements*. Biochemistry, 1997. **36**(16): p. 5029-44.
265. Noguera, V., et al., *NMR reveals a novel glutaredoxin-glutaredoxin interaction interface*. J Mol Biol, 2005. **353**(3): p. 629-41.
266. Rahlfs, S., M. Fischer, and K. Becker, *Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37133-40.
267. Rouhier, N., E. Gelhaye, and J.P. Jacquot, *Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis*. FEBS Lett, 2002. **511**(1-3): p. 145-9.
268. Nordstrand, K., et al., *NMR structure of oxidized glutaredoxin 3 from Escherichia coli*. J Mol Biol, 2000. **303**(3): p. 423-32.
269. Wiita, A.P., et al., *Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 124-7.
270. Pappas, J.A., *Theoretical studies of the reactions of the sulphur-sulphur bond. Part 3. R3S3 ions as intermediates in thiol-disulphide exchange reactions*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1979(1): p. 67-70.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Neupert für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen, für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die sehr lehrreiche Zeit an seinem Lehrstuhl.

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Marcel Deponte, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit angefertigt wurde. Sein fachliches und persönliches Engagement, seine Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Marek Cyrklaff für die Unterstützung am Elektronenmikroskop, Carmelina Petrunaro für die Enzymaktivitätsmessungen an LtErv und Helmut Hartl für die Durchführung der Metallionenanalyse bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an Christine Werner, die immer für uns Doktoranden da war und uns zusammen mit Frau Hauck in allen organisatorischen Dingen den Weg wies. Auch an das gesamte Neupert-Labor geht ein herzlicher Dank für die vielen netten Gespräche und fachlichen Diskussionen die häufig zu neuen Ideen und Anregungen führten. Einen ganz besonderen Dank an Regina, Marianne und Frau Reisenauer, die uns mit ihrer unermüdlichen Arbeit das Laborleben so sehr erleichtert haben. Auch bei Peter Reiser und Gerd Fried möchte ich mich bedanken die sich aller technischen Probleme angenommen haben. Vielen Dank auch an Petra Heckmeyer für ihre Unterstützung und Bemühungen auch kryptische Anweisungen zu entschlüsseln.

Ein ganz besonderer Dank geht Miri, Max, Silvia, Sarah Marta und Romy, für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit die wir zusammen hatten. Für die Gesellschaft beim Mittagessen und all die schönen Dinge, die sie sicher selber noch in guter Erinnerung haben. War eine tolle Zeit!

Auch meiner Familie einen herzlichen Dank für ihre immerwährende Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegen gebracht haben.