

---

Aus dem Biomedizinischen Centrum der  
Ludwig-Maximilians-Universität München-Lehrstuhl Physiologische Chemie  
Vorstand: Prof. Dr. rer.-nat. A. G. Ladurner

# Die Biogenese der mitochondrialen Superoxid-Dismutase 1

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

vorgelegt von  
Caroline A. Burgard  
aus  
Homburg/Saar  
2017

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Kai Hell

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dieter Edbauer  
Priv. Doz. Dr. Peter Reilich  
Prof. Dr. Peter Bartenstein

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dominik Groß

Dekan: Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017

---

# Eidesstattliche Versicherung

**Burgard Caroline**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Biogenese mitochondrialer Sod1“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.03.2017

Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 MITOCHONDRIEN.....	1
1.1.2 <i>Mitochondriale Erkrankungen</i> .....	2
1.1.3 <i>Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)</i> .....	4
1.1.3.1 <i>Rolle der Sod1 in Amyotropher Lateralsklerose (ALS)</i> .....	6
1.2 DER MITOCHONDRIALE PROTEINIMPORT .....	7
1.2.1 <i>Allgemeine Übersicht</i> .....	7
1.2.2 <i>Translokase der äußeren mitochondrialen Membran (TOM-Komplex)</i> .....	9
1.2.3 <i>Translokasen der inneren mitochondrialen Membran</i> .....	9
1.2.4 <i>Proteinimport in den Intermembranraum von Mitochondrien</i> .....	11
1.3 DAS MIA40/ERV1-DISULFID-TRANSFERSYSTEM .....	13
1.3.1 <i>Mia40</i> .....	13
1.3.2 <i>Erv1</i> .....	14
1.3.3 <i>Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems und deren Import</i> .....	16
1.4 SOD1 – DIE SUPEROXID-DISMUTASE 1 .....	19
1.4.1 <i>Funktion und Struktur</i> .....	19
1.5 CCS1 – DAS KUPFER-CHAPERON VON SOD1 .....	21
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	25
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	27
2.2 MEDIEN.....	29
2.2.1 <i>Für die Anzucht von E.coli</i> .....	30
2.2.2 <i>Für Hefekulturen</i> .....	30
2.3 BIOLOGISCHES MATERIAL.....	31
2.3.1 <i>Verwendete Stämme von E.coli</i> .....	31
2.3.2 <i>Verwendete Stämme von S. cerevisiae</i> .....	31
2.4 OLIGONUKLEOTIDE .....	32
2.5 VERWENDETE PLASMIDE.....	32
2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	33
2.6.1 <i>Klonierungsstrategien</i> .....	33
2.6.1.1 <i>Klonierung von pYX142-hSOD1</i> .....	34
2.6.2 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	34
2.6.3 <i>Reinigung und Analyse von DNA</i> .....	35
2.6.3.1 <i>Agarose-Gelelektrophorese von DNA</i> .....	35

2.6.3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	35
2.6.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	35
2.6.3.4 Sequenzierung von DNA .....	35
2.6.4 Restriktionsverdau von DNA .....	36
2.6.5 Ligation .....	36
2.6.6 Transformation.....	36
2.6.6.1 Herstellung elektrokompeter E.coli Zellen.....	36
2.6.6.2 Transformation elektrokompeter E.coli-Zellen.....	37
2.6.6.3 Transformation von S. cerevisiae-Zellen.....	37
2.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli.....	38
2.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	38
2.7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.7.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Westernblot) .....	39
2.7.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) .....	40
2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Test) .....	40
2.7.5 Proteinmodifikation.....	40
2.7.5.1 Proteinmodifikation mit 4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2- (AMS) .....	40
2.7.5.2 Proteinmodifikation mit IAA.....	41
2.7.6 Sod1-Aktivitäts-Test .....	41
2.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	42
2.8.1 Zellen von S. cerevisiae .....	42
2.8.1.1 Kultivierung.....	42
2.8.1.2 Herstellung von Glycerolstocks .....	43
2.8.1.3 Gewinnung von Gesamtzellprotein.....	43
2.8.1.4 Isolierung von Mitochondrien.....	43
2.8.1.5 Isolierung von ultra-reinen Mitochondrien mittels Saccharose-Gradient .....	44
2.8.2 Präparation von Mitoplasten .....	45
2.8.3 Proteasen-Behandlung von Mitochondrien und Mitoplasten .....	45
2.9 IMMUNOLOGISCHE METHODEN .....	46
2.9.1 Immunodekoration von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen.....	46
2.10 GERÄTE UND AUSRÜSTUNG.....	47
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
3.1 DIE CCS1-UNABHÄNGIGE LOKALISATION VON SOD1 IN MITOCHONDRIEN.....	49
3.1.1 Eine Fraktion von endogener Sod1 ist in Zellen, in denen Ccs1 fehlt, in Mitochondrien lokalisiert .....	49
3.1.2 Die mitochondriale Lokalisation endogener Sod1 in $\Delta$ ccs1-Zellen ist von Mia40 abhängig .....	52
3.2 REDOXZUSTAND VON SOD1 IN MITOCHONDRIEN VON $\Delta$ CCS1-ZELLEN.....	54

3.2.1 Eine Fraktion von Sod1 liegt im Intermembranraum von $\Delta ccs1$ -Mitochondrien in reduzierter Form vor .....	54
3.2.2 Überexpression von Mia40 führt zu einem höheren Anteil von Sod1-Proteinen mit Disulfidbrücke in $\Delta ccs1$ -Mitochondrien .....	55
3.3 ENZYMAKTIVITÄT VON SOD1 IN MITOCHONDRIEN .....	57
3.3.1 Die im Aktivitäts-Test gemessene Aktivität von Sod1 ist abhängig von der verwendeten mitochondrialen Proteinmenge .....	57
3.3.2 Mitochondrien von $\Delta ccs1$ -Zellen zeigen keine Sod1-Aktivität .....	58
3.3.3 Erhöhte Mengen von Mia40 in Mitochondrien führen nicht zur Aktivierung von Sod1 in Mitochondrien von $\Delta ccs1$ -Zellen .....	60
3.3.4 Die Bildung von enzymatisch aktiver Sod1 durch Ccs1 ist von bestimmten Cysteinresten in Ccs1 abhängig .....	61
3.3.4.1 Die Sod1-Aktivität in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Variante ist vermindert... 61	
3.3.4.2 Unterschiedliche Mengen von Sod1 in Mitochondrien von Zellen mit Ccs1-Varianten 62	
3.3.4.3 Die Aktivität von Sod1 in Zellextrakten der Ccs1-Mutanten .....	64
3.3.4.4 Die Sod1-Aktivität in Mitochondrien aus Zellen, die mitochondrial lokalisierte Ccs1-Varianten-Fusionsproteine exprimieren .....	65
3.3.5 Rescue der Sod1-Aktivität in Mitochondrien aus $\Delta ccs1$ -Hefezellen durch humanes CCS1 .....	67
3.4 LOKALISATION HUMANER SOD1 IN MITOCHONDRIEN VON HEFE-ZELLEN .....	68
3.4.1 Humane SOD1 ist in ultra-reinen Hefe-Mitochondrien lokalisiert .....	68
3.4.2 Eine Fraktion humaner SOD1 ist im mitochondrialen IMR von WT-Hefe-Zellen lokalisiert .....	69
3.4.3 Eine Fraktion humaner SOD1 ist auch in Hefe-Zellen, in denen Ccs1 fehlt, in Mitochondrien lokalisiert .....	71
3.4.4 Die Fraktion mitochondrialer hSOD1 befindet sich im IMR von $\Delta ccs1$ - Hefe-Mitochondrien .....	72
3.4.5 Unabhängigkeit der mitochondrialen Lokalisation humaner SOD1 von Mia40 in Abwesenheit von Hefe-Ccs1 .....	74
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
4.1 DIE BIOGENESE VON MITOCHONDRIALER HEFE-SOD1 .....	76
4.1.1 Die Lokalisation von Sod1 in Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 .....	76
4.1.2 Der Redoxzustand von mitochondrialer Sod1 in $\Delta ccs1$ -Zellen .....	77
4.1.3 Die Rolle des Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystems für die Lokalisation von mitochondrialer Sod1 in $\Delta ccs1$ -Zellen .....	78
4.1.4 Aktivierung von Sod1 .....	80
4.1.4.1 Die Abhängigkeit der Sod1-Aktivität von Ccs1 und Mia40 .....	80

4.1.4.2 Die Abhängigkeit der Sod1-Aktivität in Mitochondrien von bestimmten Cystein-Resten in Ccs1 .....	81
4.1.4.3 Aktivierung von mitochondrialer Hefe-Sod1 durch hCCS1.....	82
4.1.5 <i>Mechanismus der Biogenese von mitochondrialer Hefe-Sod1</i> .....	83
4.1.5.1 Mitochondrialer Import von Sod1 in Anwesenheit von Ccs1 .....	83
4.1.5.2 Mitochondrialer Import von Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 .....	86
4.2 DIE BIOGENESE VON HSOD1 IM HEFE-MODELL.....	87
4.3 MÖGLICHER ZUSAMMENHANG MIT DER FAMILIÄREN FORM DER ALS .....	88
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6 LITERATUR .....</b>	<b>93</b>
<b>7 PUBLIKATION.....</b>	<b>111</b>
<b>8 ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>112</b>
<b>9 DANKSAGUNG .....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle, etwa 1-2  $\mu\text{m}$  große Zellorganellen, die sich in sehr variabler Anzahl in eukaryotischen Organismen befinden. Sie besitzen eine charakteristische Struktur, die von zwei hochspezialisierten Membranen ausgebildet wird: die Außenmembran und die Innenmembran, welche zwei wässrige Subkompartimente der Mitochondrien umschließen. Die äußere Membran grenzt an das Zytosol und enthält Porine, welche für Moleküle bis zu einer Größe von 6 kDa durchlässig sind, während in der inneren Membran der Molekültransport über zahlreiche Transportsysteme kontrolliert wird. Die Innenmembran umschließt unter Bildung von Invaginationen, die sogenannten Cristae (Mannella et al., 2001), die mitochondriale Matrix. Zwischen der Außen- und Innenmembran befindet sich mit einer Breite von wenigen Nanometern der Intermembranraum.

Nach der Endosymbiontentheorie gingen Mitochondrien auf eine Symbiose eukaryotischer Vorläuferzellen mit  $\alpha$ -Proteobakterien zurück (Andersson et al., 1998, Gray et al., 1999, Margulis, 1971). Die anaerobe Vorläuferzelle konnte mit Hilfe der Atmungskette des aeroben  $\alpha$ -Proteobakteriums den zunehmenden Sauerstoffgehalt der Atmosphäre benutzen und zusätzlich dessen toxischer Komponente entgehen. Unterstützt wird diese Theorie durch mehrere Tatsachen (Kurland and Andersson, 2000, Lang et al., 1999). Zum Beispiel ähnelt die innere Mitochondrienmembran durch ihren hohen Cardiolipin-Anteil an eine Bakterienmembran. Ebenfalls ähneln mitochondriale Ribosomen denen von Bakterien und nicht denen von Eukaryoten. Denn die Masse, die in Svedberg-Einheiten (S) angegeben wird, beträgt sowohl für mitochondriale, als auch für prokaryotische Ribosomen 70S. Zudem fehlt bei der mitochondrialen mRNA die für Eukaryoten typische 5'-Cap-Sequenz, sowie die Polyadenylierung.

Die Existenz eines eigenen mitochondrialen Genoms in der Matrix, mitochondriale DNA (mtDNA), spricht als weiteres Argument für die Endosymbiontentheorie (Andersson et al., 1998, Gray et al., 1999, Kurland and Andersson, 2000). mtDNA besitzt die Form eines zirkulären Plasmids und kodiert in Hefe nur für 8 Proteine, die fast ausschließlich Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe sind (Chen and



Butow, 2005, Foury et al., 1998, Williamson, 2002). Dies entspricht weniger als 1% aller mitochondrialen Proteine. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird von Genen im Zellkern kodiert und nach ihrer Synthese an zytosolischen Ribosomen in die Mitochondrien importiert.

Mitochondrien sind an zahlreichen essentiellen Stoffwechselprozessen beteiligt. So spielen sie als Kraftwerke der Zelle eine zentrale Rolle in der Energieversorgung des Organismus, indem durch oxidative Phosphorylierung in der inneren Membran ATP produziert wird. In der mitochondrialen Matrix befinden sich unzählige Enzyme, zum Beispiel solche, die an der Oxidation von Fettsäuren und am Citratzyklus beteiligt sind. Außerdem läuft hier ein Großteil des Harnstoffzyklus und der Häm biosynthese ab. Zudem sind Mitochondrien in den programmierten Zelltod, die Apoptose, involviert, die eine wichtige Rolle in der Differenzierung und der Gewebemöostase des Organismus spielt (Danial and Korsmeyer, 2004). Dabei werden mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine in das Zytosol freigesetzt. Der wichtigste dieser proapoptotischen Faktoren ist das Cytochrom *c* (Liu et al., 1996), welches Caspasen aktiviert, die für die Ausführung des apoptotischen Programmes verantwortlich sind.

### 1.1.2 Mitochondriale Erkrankungen

Mitochondriale Erkrankungen, die auch Mitochondriopathien genannt werden, sind historisch definiert als durch Genmutationen verursachte Defekte, die das oxidative Phosphorylierungssystem (OXPHOS) der Atmungskette betreffen. Im weiteren Sinne umfassen Mitochondriopathien alle Störungen der mitochondrialen DNA-Replikation, -Transkription und -Translation, Störungen in der mitochondrialen Dynamik oder Störungen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle (Iommarini et al., 2015, Torraco et al., 2015).

Die OXPHOS-Komplexe der Atmungskette sind aus Untereinheiten aufgebaut, die durch nukleäre DNA oder mitochondriale DNA kodiert werden. Des Weiteren benötigen die Atmungskettenkomplexe für den biosynthetischen Prozess eine Vielzahl von Assemblierungsfaktoren, die spezifisch für jeden einzelnen Komplex sind und die keinen Teil des fertigen Enzyms bilden (Fernandez-Vizarra et al., 2009). Mitochondriale Erkrankungen können durch Mutationen der

mitochondrialen DNA verursacht werden und können somit maternal vererbt werden. Dagegen werden nukleär kodierte Mitochondriopathien je nach chromosomaler Lage und Mechanismus der Genmutation sowohl autosomal dominant, autosomal rezessiv als auch X-chromosomal vererbt. Funktionsstörungen der mitochondrialen Stoffwechselprozesse resultieren in einer heterogenen Gruppe von Pathologien und betreffen hauptsächlich Organe mit hohem Energiebedarf, wie zum Beispiel das Herz, Muskeln und Gehirn. Eine mitochondriale Erkrankung zu diagnostizieren, gestaltet sich häufig als schwierig aufgrund der großen Variabilität der klinischen Symptome, dem unterschiedlichen Erkrankungsalter und dem Heteroplasmiegrad. Der letztere Begriff beschreibt den prozentualen Anteil der mutierten mtDNA innerhalb einer Zelle und bestimmt die phänotypische Ausprägung und den Schweregrad der Erkrankung.

Typische Kombinationen von klinischen Symptomen werden zu Syndromen zusammengefasst, denen wiederum unterschiedliche Mutationen zugrunde liegen. So ist die **Chronische progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)** eine sehr häufige Mitochondriopathie, die durch eine zunehmende symmetrische Lähmung der äußeren Augenmuskeln mit Ptose charakterisiert ist (Richardson et al., 2005). Die Erkrankung kann durch singuläre und multiple Deletionen in der mtDNA und in der nukleären DNA verursacht werden. Es sind bislang 13 Gene bekannt, wobei am häufigsten das POLG-Gen betroffen ist (Van Goethem et al., 2003). Als weiteres Syndrom ist das **MELAS-Syndrom** zu nennen (**Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden**), das meist durch die Punktmutation 3243A>G des mitochondrialen Genes *MT-TL1* verursacht wird (Goto et al., 1990). Zudem sind die Patienten kleinwüchsig und leiden unter einem Diabetes mellitus. Die **Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON)** ist eine häufige mitochondriale Erkrankung, die ausschließlich den Sehnerv betrifft und innerhalb weniger Wochen zu einer schmerzlosen Minderung des Sehvermögens bis hin zur Erblindung führt. Die Ursache dieser Krankheit liegt in verschiedenen Punktmutationen, die die Gene des Atmungskettenkomplexes I betreffen (Newman, 1993).

Die folgenden Erkrankungen sind in einem etwas weiter gefassten Sinne mitochondriale Erkrankungen, da sie durch Mutationen nukleärer DNA mitochondriale Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigen. Das Barth-Syndrom ist eine seltene X-chromosomal vererbte Erkrankung mit einem Defekt des

mitochondrialen Phospholipidstoffwechsels, die gekennzeichnet ist durch dilatative Kardiomyopathie, Myopathie der Skelettmuskulatur, Neutropenie, verzögertes Wachstum und Organoazidurie. Ursächlich ist eine Mutation des *TAZ*-Gens (Clarke et al., 2013). Der Friedreich-Ataxie liegt eine autosomal-rezessiv vererbare Mutation des Genes *FXN* auf dem Chromosom 9 zugrunde, das für das mitochondriale Protein Frataxin kodiert. Frataxin ist an der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Komplexen der Atmungskette beteiligt (Martelli et al., 2007). Diese Erkrankung manifestiert sich üblicherweise vor dem 25. Lebensjahr und geht einher mit neurologischen Ausfällen, dilatativer Kardiomyopathie und Diabetes mellitus.

Im Gegensatz zu den angeborenen Mitochondriopathien existieren erworbene Funktionsstörungen der Mitochondrien, die eine Rolle in der Pathophysiologie verschiedener anderer Erkrankungen spielen. Im Laufe des natürlichen Alterungsprozesses kommt es zu einer Häufung von Mutationen innerhalb der mtDNA und vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Pinto and Moraes, 2015). Die Anhäufung der Mutationen in der mtDNA korreliert mit der Zunahme der mitochondrialen Dysfunktion. Mitochondrien spielen auch eine zentrale Rolle bei altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington (Lin and Beal, 2006). Das Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ), das mitunter als ursächlich für Morbus Alzheimer gesehen wird, wird beispielsweise durch den mitochondrialen Transporter der äußeren Membran (TOM) importiert und in die mitochondrialen Cristae abgelagert, was vermutlich zu dysfunktionalen Mitochondrien führt (Hansson Petersen et al., 2008).

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zählt auch zu den oben erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen, bei deren Genese die Dysfunktion von Mitochondrien eine entscheidende Rolle spielt. Dies soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

### **1.1.3 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)**

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche durch den selektiven Verlust von Motoneuronen sowohl im Rückenmark, als auch in den Hirnnervenkernen des Hirnstammes, sowie im

Motorkortex des Gehirns charakterisiert ist (Boillee et al., 2006). Dies resultiert in Muskelatrophie, Muskelschwäche, Faszikulationen und Spastik, die letztendlich aufgrund des fortschreitenden Schwunds besonders der Atemmuskulatur zum Tode führen.

ALS wurde erstmals 1869 vom französischen Neurobiologen Jean-Martin Charcot beschrieben. Der Name der Erkrankung beruht auf Charcots Beobachtung einer Vernarbung oder Verhärtung (Sklerose) in den Seitensträngen des Rückenmarks, wo der Tractus corticospinalis bzw. Pyramidenbahn lokalisiert ist. Dieser repräsentiert die Axone der ersten Motoneurone im Gehirn, die diese mit den zweiten Motoneurone im Rückenmark auf direkten oder indirekten Weg verbinden. Das Erkrankungsalter dieser in den USA mittlerweile unter *Lou Gehrig's disease* bekannten Krankheit liegt zwischen 45 und 60 Jahren mit einem durchschnittlichen Krankheitsverlauf von ein bis fünf Jahren (Pratt et al., 2012). Die durchschnittliche weltweite Inzidenzrate von ALS beträgt 0,3-2,5 Fälle pro 100 000 Menschen (Sathasivam, 2010).

In den meisten Fällen (90%) tritt ALS sporadisch auf, ohne eine ersichtliche genetische Komponente. In 10% der Fälle kommt es jedoch zu einer familiären Häufung (familiäre ALS, fALS). In etwa 20% der Familien ist eine Mutation im Gen nachweisbar, das für das Enzym Superoxid-Dismutase 1 (Sod1) kodiert (Andersen, 2006, van Es et al., 2010) (siehe Abschnitt 1.1.3.1). Auch weitere Gene wurden mit dem familiären Auftreten von ALS in Verbindung gebracht. So wurden beispielsweise Mutationen im Gen für das *TAR DNA binding* Protein (TDP-43) oder im FUS-Gen beschrieben, was beides zu einer RNA-Bindungs-Störung führt (Da Cruz and Cleveland, 2011). Ebenso konnten als Ursache für die fALS Mutationen in den Genen OPTN, ANG und UBQLN2, sowie in zahlreichen anderen Genen nachgewiesen werden (Robberecht and Philips, 2013). Zudem scheint eine Expansion eines repetitiven Genabschnittes im *open reading frame* (Region C9ORF72) des Chromosoms 9 für weitere 20% der fALS verantwortlich zu sein (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011).

Da ALS bis zum heutigen Zeitpunkt nicht heilbar ist, besteht das Hauptziel der Therapie in der Inhibierung des Fortschreitens der Erkrankung oder in der symptomatischen Therapie. Riluzol ist als einziges Medikament zur neuroprotektiven Therapie zugelassen. Als Glutamat-Antagonist hemmt es den Untergang von Motoneuronen und kann somit die Überlebenszeit um durchschnittlich drei Monate verlängern (Bensimon et al., 1994). Mittlerweile

befinden sich weitere Medikamente in der klinischen Testphase, darunter auch ein Wirkstoff, der die Folgen der Mutationen in Sod1 mildern soll (Pratt et al., 2012).

### 1.1.3.1 Rolle der Sod1 in Amyotropher Lateralsklerose (ALS)

Mutationen im Gen, welches für das ubiquitär exprimierte Enzym Sod1 kodiert, sind eine häufige Ursache der familiären Form der ALS (Deng et al., 1993, Rosen et al., 1993). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 130 verschiedene Mutationen bekannt [siehe <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/> (Carri and Cozzolino, 2011)]. Ein kleiner Teil des überwiegend zytosolischen Proteins befindet sich in Mitochondrien (siehe Abschnitt 1.4.1) und viele mutierte Formen von Sod1 (mutSod1) sind im gleichen oder sogar größeren Ausmaß als die Wildtyp-Form (WT-Sod1) in verschiedenen mitochondrialen Subkompartimenten lokalisiert (Deng et al., 1993, Ferri et al., 2006). ALS-assoziierte Mitochondrien in Neuronen und deren Axonen im Vorderhorn des Rückenmarks erscheinen degeneriert [als Übersicht (Magrane and Manfredi, 2009)]. Die Akkumulation einer falsch gefalteten und aggregierten Form von mutSod1 in Mitochondrien dient hierfür als plausible Erklärung (Deng et al., 2006). Für diese Aggregate wurden intermolekulare Disulfidbrücken beschrieben (Deng et al., 2006). Im Maus-Modell beschleunigt die Überexpression von Ccs1 die ALS-bedingten neurologischen Defekte und die mitochondrialen Defizite einer Sod1-Mutante (Son et al., 2007). Bislang ist nicht verstanden, wie es zur Aggregation der Sod1-Mutanten in Mitochondrien und zu den mitochondrialen Defekten kommt.

Außerdem wurde gezeigt, dass im Falle der fALS eine zusätzliche, toxische Aktivität von mutSod1 für die Pathogenese der Erkrankung verantwortlich ist, da einige pathogen mutierte Formen von Sod1 ihre Aktivität beibehalten und die Funktion der WT-Form nicht beeinflussen (Borchelt et al., 1995, Gurney et al., 1994). Die genaue Ursache dieser Toxizität ist bislang nicht geklärt, aber es existieren verschiedene Hypothesen darüber, welche die Ursachen sein könnten, zum Beispiel die aberrierende Produktion freier Sauerstoff-Radikale, die Dysregulation von Neurofilamenten, die Beeinträchtigung des axonalen Transports, die Exzitotoxizität von Glutamat, die Auslösung einer Apoptose oder die Dysfunktion von Proteasomen oder Mitochondrien (Pasinelli and Brown, 2006, Shi et al., 2010).

Als Beispiel für mitochondriale Dysfunktionen bei ALS ist zum einen die gestörte Calcium-Homöostase zu nennen (Jaiswal et al., 2009). So wurde eine erhöhte Calcium-Konzentration verbunden mit mitochondrialen Defekten sowohl bei ALS-

Patienten, als auch in Tier-Modellen gefunden (Reiner et al., 1995). Zusätzlich konnte man eine erniedrigte mitochondriale Calcium-Kapazität in Sod1-Mutanten-Mäusen nachweisen (Damiano et al., 2006). Zum anderen ist die mitochondrial-vermittelte Apoptose an der Degeneration von Motoneuronen bei ALS beteiligt. In Mausmodellen, bei denen Sod1 mutiert war, wurden eine Zunahme der Konzentration von pro-apoptotischen Proteinen wie Bad oder Bax und eine verringerte Menge von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-2 gefunden (Guegan et al., 2001, Vukosavic et al., 1999). Darüber hinaus konnten eine Freisetzung von Cytochrom *c* aus Mitochondrien in das Zytosol als Marker der Apoptose und eine Aktivierung der Caspasen 9, 3 und 7 in Tier- und Zellmodellen nachgewiesen werden, bei denen mutSod1 überexprimiert wurde (Guegan et al., 2001, Kroemer et al., 2007, Pasinelli et al., 2000). Außerdem wurde beschrieben, dass mutSod1 die mitochondriale Protein-Komposition verändert und den Protein-Import in Mitochondrien reduziert (Li et al., 2010).

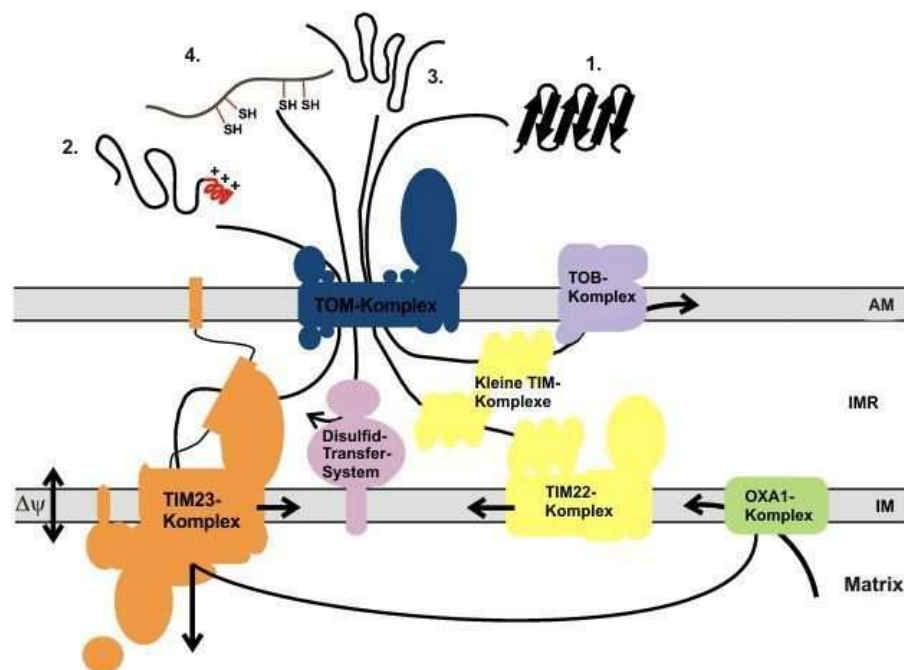
Es ist allerdings nicht bekannt, welche molekularen Grundlagen für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Wie bereits erwähnt, befindet sich ein kleiner Teil von Sod1 im IMR von Mitochondrien (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001, Sturtz et al., 2001, Weisiger and Fridovich, 1973). Möglicherweise spielen Defekte bei der Biogenese, also dem Import und der Faltung der Sod1-Mutanten in Mitochondrien eine Rolle für die mitochondriale Dysfunktion. Deshalb ist es wichtig, die molekularen Mechanismen der Biogenese der mitochondrialen Sod1 zu verstehen.

## 1.2 Der mitochondriale Proteinimport

### 1.2.1 Allgemeine Übersicht

Der mitochondriale Proteinimport wird durch Proteinkomplexe vermittelt, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, den sogenannten Translokasen. In der äußeren mitochondrialen Membran (AM) befindet sich der TOM- (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane) und der TOB-Komplex (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane for Beta-barrel proteins, oder auch SAM-Komplex, Sorting and Assembly Machinery genannt). Der TOB-Komplex ist für die Insertion von Proteinen mit einer speziellen Sekundärstruktur ( $\beta$ -barrel) in die AM

verantwortlich (Neupert and Herrmann, 2007, Paschen et al., 2003, Wiedemann et al., 2003). In der inneren mitochondrialen Membran (IM) sind zwei unterschiedliche TIM-Komplexe (Translocase of the Innere mitochondrial Membrane) und der OXA1-Komplex lokalisiert. Zusätzlich existiert das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem im Intermembranraum [als Übersicht (Mokranjac and Neupert, 2009)]. Im Zytosol werden die Proteine, welche für den mitochondrialen Import bestimmt sind, von Chaperonen (Hilfsproteinen) in einem ungefalteten, importkompetenten Zustand gehalten. Zu diesen Chaperonen gehört unter anderem das Hitzeschockprotein Hsp70 (Chirico et al., 1988).



**Abb.1.1: Übersicht über die Komponenten des mitochondrialen Proteinimports**

**AM:** Außenmembran; **IMR:** Intermembranraum; **IM:** Innere Membran;  $\Delta\Psi$ : Membranpotential  
**1.** Beta-barrel-Proteine, die über den TOB-Komplex in die AM eingebaut werden.  
**2.** Proteine mit N-terminalen positiv geladenem Matrix-Sortierungssignal, die über den TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix transportiert werden.  
**3.** Innenmembranproteine mit mehreren hydrophoben Segmenten, die über den TIM22-Komplex in die IM eingebaut werden.  
**4.** Intermembranraumproteine mit Disulfidbrücken, die über das Disulfid-Transfersystem in den IMR importiert werden. [verändert nach (Mokranjac and Neupert, 2005)]

Ein Großteil der zytosolischen Proteine mit mitochondrialem Bestimmungsort enthält eine Matrixsortierungssequenz, die durch einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäureresten charakterisiert ist und eine amphipathische  $\alpha$ -Helix ausbildet. Die Rezeptorproteine der TOM- Translokase erkennen diese amphipathische  $\alpha$ -Helix. Daneben existieren weitere Signale für den Transport zu der Außen- und Innenmembran oder in den Intermembranraum, die weniger gut analysiert sind.

### 1.2.2 Translokase der äußeren mitochondrialen Membran (TOM-Komplex)

Der TOM-Komplex, welcher in der mitochondrialen Außenmembran integriert ist, vermittelt den Transport nahezu aller mitochondrialen Proteine über die AM in den Intermembranraum. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*, Bäckerhefe) und in *Neurospora crassa* (*N.c.*, roter Brotschimmel) wird er aus sieben Membranproteinen gebildet (Neupert and Herrmann, 2007). Dazu gehören die Rezeptorproteine Tom 20, Tom22 und Tom 70 auf der zytosolischen Seite, welche an der Erkennung von mitochondrialen Proteinen und ihrer Weiterleitung zur Transportpore beteiligt sind. Zusammen mit dem Rezeptor Tom22 besteht der Kernkomplex (core complex) aus der porenbildeten Untereinheit Tom40 und den drei angegliederten Elementen Tom5, Tom6 und Tom7, die strukturelle Bedeutung aufweisen.

Darüber hinaus assoziieren die Rezeptorproteine Tom 20 und Tom70 mit dem Kernkomplex und bilden so den holo-Komplex (Ahting et al., 2001, Ahting et al., 1999, Kunkele et al., 1998). Ungefaltete Vorstufenproteine interagieren mit dem Tom-Komplex auf seiner zytosolischen Seite (cis-Seite) und werden durch den Kanal zur trans-Seite in den IMR geleitet. Dabei besitzt die trans-Bindestelle eine höhere Affinität für das importierte Protein als die cis-Bindestelle, was dazu führt, dass die Translokation in den IMR unabhängig von ATP-Verbrauch und Membranpotential erfolgen kann (Rapaport et al., 1998, Stan et al., 2000).

### 1.2.3 Translokasen der inneren mitochondrialen Membran

Die zentrale Proteintranslokase der inneren Membran ist der **TIM23-Komplex** (**T**ranslocase of the **I**nner **M**embrane). Er ermöglicht den Transport von Proteinen,



die ein N-terminales Matrix-Sortierungssignal enthalten, in die mitochondriale Matrix oder in die innere Membran. Das elektrische Membranpotential und die Hydrolyse von ATP dienen als Triebkraft für den Transport durch die Pore des Komplexes (Krayl et al., 2007, Neupert and Brunner, 2002). Die Bestandteile des TIM23-Komplexes können in kanalbildende Untereinheiten und Komponenten des Importmotors aufgeteilt werden. Dabei sind die Untereinheiten Tim17 und Tim23, sowie Tim 50 und Tim21 in der inneren mitochondrialen Membran verankert und bilden den rezeptor- und kanalbildeten Teil des TIM23-Komplexes (Mokranjac et al., 2003a, Moro et al., 1999). Zu den Motorkomponenten, die auf der Matrix-Seite lokalisiert sind, gehören Tim44, Tim14 und Tim 16, Pam17, Mgr2, sowie das mitochondriale Hsp70-Chaperon (Ieva et al., 2014, Kozany et al., 2004, Mokranjac et al., 2003b, van der Laan et al., 2005). Der membranständige Anteil des TIM23-Komplexes enthält Rezeptoren, die die Matrix-Sortierungssignale der Proteine erkennt, wenn sie durch den TOM-Komplex in den IMR transportiert wurden. Die initiale Translokation des Sortierungssignals durch die IM ist ein Schritt, der rein von dem Membranpotential abhängig ist. Wenn das Sortierungssignal der Proteine die Matrixseite erreicht, wird es von der Motorkomponente gebunden. Durch mehrfaches Binden und Ablösen an das Hsp70-Chaperon unter ATP-Verbrauch wird die Translokation des Proteins in die mitochondriale Matrix abgeschlossen. Des Weiteren zählt Mge1 zu den Bestandteilen des Importmotors, welches das Nukleotid in Hsp70 austauscht.

Der **Tim22**-Komplex ist ebenfalls in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Seine Funktion besteht in der Insertion von Innenmembranproteinen mit mehreren hydrophoben Segmenten. Er besteht aus den kleinen Tims (Tim9, Tim10, und Tim12), die auf der IMR-Seite assoziiert sind und den integralen Membranproteinen Tim22, Tim54 und Tim18. Verschiedene Transporterproteine der Innenmembran, genannt „Carrier“ und die Translokationskomponenten Tim17, Tim23 und Tim22 selbst benutzen diesen Importweg. Hexamere Komplexe aus kleinen Tims binden im Intermembranraum an die stark hydrophoben Polypeptidketten der aus dem TOM-Komplex austretenden Proteine und leiten sie weiter an den Tim22-Komplex. Somit verhindern die kleinen Tims im IMR die Aggregation der importierten Proteine, was der Funktion von Chaperonen ähnelt (Paschen et al., 2000, Vial et al., 2002).

Tim22 selbst bildet den Insertionskanal in der inneren Membran, worüber dann die Vorstufenproteine unter Verwendung des Membranpotentials als treibende Kraft in die Innenmembran inseriert werden (Rehling et al., 2003, Sirrenberg et al., 1996).

Der homooligomere **OXA1-Komplex** (*oxidase assembly*), der ebenfalls in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, vermittelt die Insertion von einigen Membranproteinen in die IM (Hell et al., 2001). Sowohl kernkodierte, als auch mitochondrial kodierte Proteine wie zum Beispiel Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe gehören zu den Substraten des OXA1-Komplexes (Hell et al., 1997, Hell et al., 1998). Dabei werden kernkodierte Proteine nach ihrem Import in die Matrix, vermittelt durch den TIM23-Komplex, wiederum durch den OXA1-Komplex in einem membranpotentialabhängigen Schritt exportiert und in die Innenmembran inseriert.

### 1.2.4 Proteinimport in den Intermembranraum von Mitochondrien

Proteine, die in den Intermembranraum von Mitochondrien importiert werden, können in drei Hauptgruppen unterteilt werden (Herrmann and Hell, 2005, Neupert and Herrmann, 2007).

In der ersten Gruppe befinden sich Proteine mit einer zweiteiligen Präsequenz, die zum einen aus dem typischen Matrixsortierungssignal und zum anderen aus einem hydrophoben Sortierungssignal besteht. Durch diese zweiteiligen Sortierungssequenzen wird der Import über den TOM-Komplex und die TIM23-Translokase ermöglicht. So vermittelt die TIM23-Translokase nach dem Passieren des TOM-Komplexes die laterale Insertion des hydrophoben Segments in die IM, sodass der hydrophile Teil des Proteins in den IMR hinein ragt. Nach dem Abspalten des Matrixsortierungssignals erfolgen je nach Substrat weitere proteolytische Prozesse. In einigen Fällen erfolgt die Spaltung in der Matrix oder an beiden Seiten und es wurde sogar eine Spaltung innerhalb der Membran beschrieben (Esser et al., 2002, Herlan et al., 2004, Urban et al., 2001). Dabei kommen Proteasen zum Einsatz, um letztendlich das prozessierte Protein in den IMR freizusetzen.

Zum Beispiel wird bei dem Hefe-Enzym L-Laktat-Dehydrogenase (Cytochrom *b<sub>2</sub>*) nach dem Import durch den TOM-Komplex und der Insertion in die IM die N-

terminale Signalsequenz in der Matrix durch die Protease MPP „*mitochondrial – processing protease*“ abgespalten. Auf der IMR-Seite erfolgt dann die Spaltung vom hydrophoben Segment durch die IM-Protease Imp1, wobei das gereifte Cytochrom *b*<sub>2</sub>-Protein schließlich in den IMR freigesetzt wird (Glick et al., 1992, Hartl et al., 1987).

Zu der zweiten Gruppe gehören IMR-Proteine, welche unabhängig vom TIM23-Komplex importiert werden, ein relativ niedrige molekulare Masse und ein konserviertes Muster von Cystein- bzw. Histidin-Resten besitzen. Nach dem Transport durch den TOM-Komplex in ungefalteter Form werden der Proteine durch den Einbau von Kofaktoren oder Ausbildung von Disulfidbrücken in ihre stabile, gefaltete Konformation überführt. Auf diese Weise wird eine Rückdiffusion dieser Proteine durch den TOM-Komplex verhindert. Somit befinden sie sich permanent im IMR.

Als Beispiel sei das Cytochrom *c* aufgeführt, das durch den Einbau des Kofaktors Häm durch die Cytochrom *c*-Hämlyase am Verlassen des IMR gehindert wird (Diekert et al., 2001, Dumont et al., 1988, Nargang et al., 1988). Weitere Beispiele sind die kleinen Tim-Proteine mit einem „*twin Cx<sub>3</sub>C*“-Cystein-Aminosäurenreste Motiv, sowie die Cox17-Gruppe mit einem „*twin Cx<sub>9</sub>C*“ Motiv. In diese Proteine baut das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem Disulfidbrücken ein und treibt somit deren Import in den IMR (siehe Abschnitt 1.3) (Neupert and Herrmann, 2007). Über dieses Disulfid-Transfersystem erfolgt ebenfalls der Import des Kupfer-Chaperons Ccs (Copper Chaperone for Sod) und indirekt der Import der Kupfer/Zink Superoxid-Dismutase (Sod). In den folgenden Kapiteln werden die letztgenannten Komponenten näher beschrieben.

Die dritte Gruppe besteht aus Proteinen, die keine mitochondrialen Präsequenzen enthalten und permanent mit Bindungsstellen an der Oberfläche der inneren und der äußeren Mitochondrien-Membran im IMR verbunden sind. Der Importprozess dieser Proteine über die mitochondriale Innenmembran erfolgt ebenfalls unabhängig vom TIM23-Komplex und benötigt weder mitochondriales ATP, noch das Membranpotential. Beispiele hierfür sind die Cytochrom *c*-Hämlyase und die Creatinkinase (Diekert et al., 1999, Steiner et al., 1995).

### 1.3 Das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem

Dieses Disulfid-Transfer-System befindet sich im IMR von Mitochondrien und besteht aus den Proteinen Mia40 und Erv1. Es dient dem Import von Proteinen mit Cystein-Resten vom Zytosol in Mitochondrien und vermittelt die oxidative Faltung von Proteinen im IMR (Deponte and Hell, 2009, Hell, 2008, Mesecke et al., 2005, Stojanovski et al., 2008). Beide Komponenten sind essentiell für das Überleben der Zelle (Chacinska et al., 2004). Obwohl im IMR der Mitochondrien ein reduktives Milieu wie im Zytosol herrscht, gibt es dort dennoch Proteine, die in oxidierte Form mit Disulfidbrücken vorliegen.

So enthalten auch Mia40 und Erv1 Disulfidbrücken und bilden ein eng verzahntes Redox-System zur Oxidation von Substratproteinen, wie im Folgenden näher beschrieben.

#### 1.3.1 Mia40

Der Import-Rezeptor Mia40 (**M**itochondrial **I**mport and **A**ssembly) als Bestandteil des Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystems ist ein essentieller Faktor für das Überleben von *S. cerevisiae*-Zellen (Chacinska et al., 2004, Winzeler et al., 1999, Hell, 2008). Mia40 ist vom einfachen Eukaryoten wie Hefe, bis hin zu Tieren und Pflanzen, sowie im Menschen konserviert.

Mia40 unterscheidet sich in seiner Struktur zwischen den verschiedenen Spezies. So wird das Protein in Hefe und anderen Pilzen mit einem mitochondrialen Sortierungssignal, gefolgt von einem hydrophoben Transmembransegment, synthetisiert. Nach dem ATP-abhängigen Import über den TOM- und TIM23-Komplex wird Mia40 mit dem hydrophoben Segment in der IM verankert, wobei sich der größte Teil des Proteins im IMR befindet (Naoe et al., 2004, Terziyska et al., 2005). Dagegen fehlt in höheren Eukaryoten wie in Pflanzen, Tieren und Menschen sowohl das mitochondriale Sortierungssignal, als auch das Transmembransegment, sodass Mia40 im IMR als lösliches Homolog vorliegt (Hofmann et al., 2005). Dessen ungeachtet kann die humane Form des Mia40 jenes in Hefe funktionell ersetzen (Chacinska et al., 2008). Allen Homologen gemeinsam ist eine hochkonservierte C-terminale Domäne von etwa sechzig Aminosäureresten, darunter sechs invariante Cysteinreste. Diese Cysteinreste sind in einem CPC-Cx<sub>9</sub>C-Cx<sub>9</sub>C-Motiv angeordnet.

Für die Funktion von Mia40 ist allein diese Domäne ausreichend (Terziyska et al., 2009). Die oxidierte Form von Mia40 enthält drei Disulfidbrücken: Eine Brücke verbindet die zwei Cysteinreste im CPC-Motiv. Die C<sub>x</sub>C-Segmente des „*twin* C<sub>x</sub>C“-Motivs sind durch zwei weitere Disulfidbrücken zwischen den proximalen und distalen Cysteinresten verbunden (Grumbt et al., 2007). Die Beschreibungen der Kristallstrukturen bestätigten diese biochemischen Erkenntnisse (Banci et al., 2009, Kawano et al., 2009). Im Gegensatz zu den stabilisierenden Disulfidbrücken im „*twin* C<sub>x</sub>C“-Motiv ist die erste Disulfidbrücke im CPC-Motiv leicht reduzierbar, was für eine katalytisch aktive Disulfidbrücke spricht (Grumbt et al., 2007, Terziyska et al., 2009).

Mia40 spielt eine zentrale Rolle als Importrezeptor und Oxidase für cysteinreiche Proteine im Intermembranraum von Mitochondrien. Unabhängig von der Oxidation wurde auch eine Chaperon-ähnliche Funktion von Mia40 bei der Proteinfaltung beschrieben (Weckbecker et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass die Depletion von Mia40 zu einer Hemmung des Imports von cysteinhaltigen IMR-Proteinen wie zum Beispiel der kleinen Tim-Proteine führt (Chacinska et al., 2004, Naoe et al., 2004). Eine Überexpression von Mia40 führt zu einer erhöhten *in vitro* Importrate dieser Proteine in den IMR (Terziyska et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mia40 über eine Disulfidbrücke mit Substratproteinen während des Importprozesses interagiert (Chacinska et al., 2004, Mesecke et al., 2005). Starke Reduktionsmittel sind in der Lage, die Ausbildung dieser Disulfidintermediate von Mia40 mit Substratproteinen zu verhindern und somit den Import zu beeinträchtigen. Dies zeigt die Bedeutung der Ausbildung eines Disulfidintermediates für die Biogenese der cysteinreichen Substratproteine.

### 1.3.2 Erv1

Die essentielle Sulfhydryl-Oxidase Erv1 (Essential for Respiration and Vegetative growth), die erstmals in Hefe identifiziert wurde (Lange et al., 2001, Lisowsky, 1992), befindet sich im IMR von Mitochondrien und ist die zweite Komponente des Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-Systems. Zellen mit defektem Erv1-Protein haben eine geringere Menge an Mia40-abhängigen IMR-Proteinen in Mitochondrien als Wildtyp-Zellen (Allen et al., 2005, Mesecke et al., 2005, Rissler et al., 2005). Des Weiteren weisen Zellen mit einer defekten Form von Erv1 einen Verlust des

mitochondrialen Genoms, eine Beeinträchtigung der Zellatmung, sowie Veränderungen in der Mitochondrien-Morphologie und -Verteilung auf. Zudem zeigen diese Zellen auch Defekte in der Biogenese von zytosolischen Proteinen, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, und Defekte bei der Bindung von Erv1 an Cytochrom *c* und an die Cytochrom *c*-Peroxidase (Becher et al., 1999, Dabir et al., 2007, Lange et al., 2001, Lisowsky, 1992, Lisowsky, 1994).

Das humane Erv1-Homolog mit dem Namen ALR (Augmenter of Liver Regeneration) wurde als Faktor für Leberregeneration und -Wachstum mit unbekanntem Wirkmechanismus beschrieben. Zudem dient es als diagnostischer Marker für Lebererkrankungen oder -Verletzungen und stimuliert die Synthese von TNF- $\alpha$ , IL-6 und Stickstoffmonoxid in Kupffer-Zellen (Gandhi, 2012, Pawlowski and Jura, 2006). Vertreter der Erv1-Familie sind in Eukaryoten weit verbreitet, zum Beispiel in Pilzen, Pflanzen und Tieren. Gemeinsam mit Erv2, welches sich im Endoplasmatischen Retikulum von Pilzen befindet, und einigen Erv1-ähnlichen Sulfhydryl-Oxidase in Viren repräsentiert Erv1 die Klasse der Erv/ALR-Thiol-Oxidase (Coppock and Thorpe, 2006, Gerber et al., 2001, Senkevich et al., 2000, Sevier et al., 2001, Fass, 2008). Alle Proteine dieser Familie besitzen eine Flavinadenin dinukleotid-(FAD)-Bindedomäne und ein konserviertes CxxC-Motiv, die beide benachbart sind und einen Elektronentransfer vom reduzierten CxxC-Motiv zum FAD-Kofaktor innerhalb von Erv1 ermöglichen (Gross et al., 2002, Wu et al., 2003). Die Homologe in Pilzen und Tieren weisen noch einen erweiterten N-terminalen Abschnitt auf, der ein weiteres CxxC-Motiv enthält. Dieser fungiert als Elektronenüberträger zum zweiten CxxC-Motiv, von wo die Elektronen weiter auf FAD übertragen werden und hierbei Disulfidbrücken über Motive in Substrate eingebaut werden (Bien et al., 2010, Hofhaus et al., 1999, Levitan et al., 2004).

Funktionell interagiert Erv1 mit Mia 40 über eine Disulfidbrücke, wie *in vitro* und *in vivo* gezeigt wurde (Bottinger et al., 2012, Terziyska et al., 2009). Mia40 wird von Erv1 reoxidiert und dabei selbst reduziert (Chacinska et al., 2004, Grumbt et al., 2007, Mesecke et al., 2005). Die dadurch von Erv1 aufgenommenen Elektronen werden entweder weiter über Cytochrom *c* auf die Cytochrom *c* Oxidase oder auf die Cytochrom *c* Peroxidase transferiert. Letztendlich werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen (Allen et al., 2005, Bihlmaier et al., 2007, Dabir et al., 2007, Farrell and Thorpe, 2005). Somit besteht eine molekulare Verbindung zwischen dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System und der Atmungskette.

### 1.3.3 Substratproteine des Mia40/Erp1-Systems und deren Import

Die typischen Substratproteine für diesen Importweg können in mehrere Gruppen unterteilt werden. Zum einen existiert eine Gruppe von Proteinen, die ein „*twin*“ (doppeltes) C<sub>x</sub>C“-Motiv aufweisen und somit zwischen den disulfidbrückenbildenden Cysteinresten aus neun anderen Aminosäureresten bestehen. Daneben gibt es noch C<sub>x</sub>C-Proteine, welche Cysteinreste ebenfalls in Form eines „*twin*“-Motivs aufweisen, jedoch nur drei Aminosäurenreste dazwischen Abstand haben. Schließlich gibt es noch eine Gruppe von Substraten ohne diese Motive. Eine Übersicht bereits bekannter Substratproteine in *S. cerevisiae* ist in Tabelle 1.1 erfasst.

Substratproteine mit	Funktion	Referenz
<b>1) „<i>twin</i> C<sub>x</sub>C“-Motiv</b>		
Tim8	Proteintransport/Untereinheit des Tim8-Tim13-Komplexes	(Chacinska et al., 2004)
Tim9	Proteintransport/Untereinheit des Tim9/Tim10-Komplexes	(Chacinska et al., 2004, Naoe et al., 2004)
Tim10	Proteintransport/Untereinheit des Tim9/Tim10-Komplexes	(Chacinska et al., 2004, Naoe et al., 2004, Terziyska et al., 2005)
Tim12	Proteintransport/Untereinheit des Tim9/Tim10/Tim12-Komplexes	(Naoe et al., 2004)
Tim13	Proteintransport/Untereinheit des Tim8-Tim13-Komplexes	(Chacinska et al., 2004, Terziyska et al., 2005)
<b>2) „<i>twin</i> C<sub>x</sub>C“-Motiv</b>		
Cox17	Kupfer-Chaperon der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	(Chacinska et al., 2004, Mesecke et al., 2005, Terziyska et al., 2005)
Cox19	Assemblierungsfaktor der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	(Chacinska et al., 2004)
Mic14	nicht bekannt	(Gabriel et al., 2007)
Mic17	nicht bekannt	(Gabriel et al., 2007)
Mdm35	mitochondriale Morphologie	(Gabriel et al., 2007, Potting et al., 2010, Tamura et al., 2010)

Pet191	Assemblierungsfaktor für den Komplex IV der Atmungskette	(Khalimonchuk et al., 2008)
<b>3) andere Motive</b>		
Erv1	Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem	(Terziyska et al., 2007)
Ccs1	Kupferchaperon von Sod1	(Reddehase et al., 2009)
Tim22	Proteintransport/Untereinheit des TIM22-Komplexes	(Wrobel et al., 2013)
Atp23	Prozessierung der Untereinheit 6 der mitochondrialen ATPase	(Weckbecker et al., 2012)
Coa6	Assemblierungsfaktor Cytochrom <i>c</i> Oxidase Komplex	(Vogtle et al., 2012)
Cox12	Untereinheit IVb der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	(Vogtle et al., 2012)

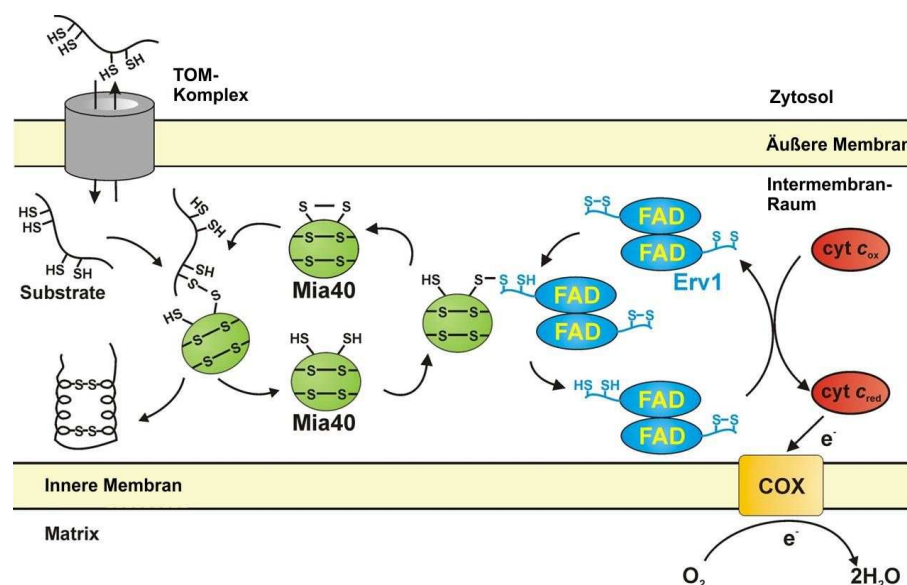
**1.1: Substratproteine des Mia40/Erv1-Systems in *S. cerevisiae***

Zum Beispiel konnte von Vogtle et. al., 2012 gezeigt werden, dass die IMR-Proteine Coa6 und Cox12 ein „*single-Cx9C-Cx10C*“-Motiv aufweisen und ihr mitochondrialer Import von dem Mia40/Erv1-System abhängig ist. Die im IMR lokalisierte Protease Atp23 besitzt 10 Cysteinreste ohne bestimmtes Motiv und fünf Disulfidbrücken und konnte ebenfalls als Substrat von Mia40 identifiziert werden (Weckbecker et al., 2012). Tim22, eine Untereinheit des TIM22-Komplexes in der mitochondrialen IM besitzt zwei Cysteinreste. Mia40 ist nicht nur für die Bildung der Disulfidbrücke zwischen diesen Cysteinresten verantwortlich, sondern unterstützt die Integration von Tim22 in die IM (Wrobel et al., 2013). Auch Ccs1 ist ein Substrat des Mia40/Erv1-Systems, das kein „*twin-CxC*“-Motiv besitzt (Abschnitt 1.5) (Reddehase et al., 2009).

Der Import dieser Substratproteine über das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem beginnt im Zytosol (Herrmann and Riemer, 2012) (siehe Abbildung 1.2). Von dort werden sie als Vorstufenproteine in ungefalteter und reduzierter Form durch den TOM-Komplex in den mitochondrialen IMR transportiert. Bei diesem Vorgang spielt Mia40 eine essentielle Rolle, denn im IMR dient es als Bindungs-Faktor für die Substratproteine. Dabei interagieren das Redox-aktive CPC-Motiv von Mia40 und ein Cysteinrest des Substratproteins miteinander (Banci et al., 2009, Kawano et al.,



2009, Terziyska et al., 2009). Bei dieser Reaktion wird eine gemischte intermediäre Disulfidbrücke ausgebildet (Chacinska et al., 2004, Naoe et al., 2004, Mesecke et al., 2005). Durch diese starke kovalente Bindung wird der Importmechanismus von Präproteinen in den IMR über die Außenmembran verbessert. In einem abschließenden Schritt führt die vollständige Übertragung der Disulfidbrücke zu einer Freisetzung des Substrats von Mia40 in den IMR. In seinem gefalteten Zustand kann das Substrat den IMR nicht mehr verlassen. Nach der Interaktion des oxidierten Mia40 mit dem Substratprotein am CPC-Motiv wird Mia40 in reduzierter Form freigegeben (Chacinska et al., 2004, Grumbt et al., 2007, Mesecke et al., 2008, Milenkovic et al., 2007, Muller et al., 2008, Sideris and Tokatlidis, 2007, Terziyska et al., 2009). Dieser Schritt geschieht mit Hilfe von Erv1 (Rissler et al., 2005, Terziyska et al., 2007). Dabei geht die N-terminale Domäne von Erv1 mit dem CPC-Motiv von Mia40 eine gemischte Disulfidbrücken-Bindung ein (Mesecke et al., 2005), wobei die Disulfidbrücke auf Mia40 übertragen wird und Erv1 im reduzierten Zustand zurück bleibt. Es erfolgt die Reoxidation von Erv1 über Cytochrom *c* wie im Abschnitt 1.3.2 beschrieben.



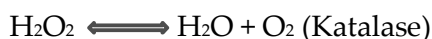
**Abbildung 1.2: Modell des Mia40/Erv1-Systems.**

Cyt *c*: Cytochrom *c*; COX: Cytochrom *c* Oxidase [verändert nach (Deponite and Hell, 2009)]  
 Eine Beschreibung des Modells ist dem Abschnitt 1.3.3 zu entnehmen.

## 1.4 Sod1 – die Superoxid-Dismutase 1

### 1.4.1 Funktion und Struktur

Das Enzym Superoxid-Dismutase1 (Sod1), das bereits 1969 erstmals beschrieben wurde, katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid und schützt somit die Zelle gegen reaktive Sauerstoff-Spezies (McCord and Fridovich, 1969). In dieser Haber-Weiss genannten Reaktion wird das Superoxid zunächst durch Sod1 zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff disproportioniert (sowohl oxidiert, als auch reduziert). Das entstandene Wasserstoffperoxid wird von Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff reduziert.



Superoxid-Anionen werden in vielen zellulären Stoffwechselprozessen produziert. Die Hauptquelle dieser reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) bildet die mitochondriale Atmungskette. Mitochondrien besitzen gleich zwei verschiedene Enzyme, die diese ROS entgiften (Han et al., 2001, Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001, Sturtz et al., 2001). Zum einen existiert die bereits erwähnte Kupfer- und Zink-Ionen enthaltende Cu/Zn-Sod (Sod1) und zum anderen die Manganhaltige Mn-Sod (Sod2) (Weisiger and Fridovich, 1973). Die Kupferhaltige Sod1 findet sich überwiegend in Eukaryoten, wohingegen die Manganhaltige Sod2 häufiger in prokaryotischen Organismen und in der Matrix von Mitochondrien zu finden ist. Zusätzlich ist auch die Existenz einer Eisenhaltigen Sod (Fe-Sod) in Bakterien und einer extrazellulären Cu/Zn-Sod in höheren Eukaryoten beschrieben worden (Yost and Fridovich, 1973). Die in Sod enthaltenen Metall-Ionen fungieren als Elektronenakzeptor während der Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff.

Sod1 ist hauptsächlich im Zytosol der Zelle lokalisiert, ein kleiner Teil befindet sich jedoch auch in anderen zellulären Kompartimenten wie zum Beispiel im Nukleus (Crapo et al., 1992), im Endoplasmatischen Retikulum (Kikuchi et al., 2006), und, wie oben erwähnt, im IMR von Mitochondrien (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001, Sturtz et al., 2001, Weisiger and Fridovich, 1973).

Sod1 weist eine hohe Konservierung zwischen allen Vertretern von Eukaryoten auf und ist in allen Zellen und Geweben vertreten. Sod1 ist für das Überleben von Zellen nicht essentiell. Bei fehlender Sod1 in Hefe treten Auxotrophien für die Aminosäuren Methionin und Lysin auf, eine verkürzte replikative Lebensdauer, eine verringerte Wachstumsrate unter fermentativen Bedingungen und eine verminderte Stressresistenz (Liu et al., 1992, Zadrag et al., 2008). Sod1 bzw. Sod2 defiziente Mauslinien weisen eine verkürzte Lebensdauer, Defekte des Nervensystems und des Hörsinnes und eingeschränkte Reproduktionsfähigkeit auf (Matzuk et al., 1998).

Sod1 bildet ein Homodimer, um enzymatisch aktiv zu sein (Leitch et al., 2009b). Jede Untereinheit enthält jeweils ein Kupfer- und ein Zink-Ion, sowie eine intramolekulare Disulfidbrücke (Strange et al., 2006, Forman and Fridovich, 1973, Roe et al., 1988). Das Kupfer-Ion ist an der Katalyse beteiligt, wohingegen das Zink-Ion und die Disulfidbrücke zur Stabilisierung der Proteinstruktur und Ausbildung des aktiven Zentrums beitragen. Die Cysteinreste, die an der Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke beteiligt sind, sind in vielen Spezies konserviert, was ihre Bedeutung für die Funktion von Sod1 unterstreicht (siehe Abb. 1.3). Die Aktivität von Sod1 kann auf einem posttranslationalen Level durch das Einsetzen des Kupfer-Ions und der Ausbildung der Disulfidbrücke reguliert werden. Derzeit existieren zwei Wege, um Sod1 zu aktivieren (Leitch et al., 2009b). Zum einen erfolgt das Einsetzen der Disulfidbrücke und auch des Kupfers durch Ccs1 (Culotta et al., 1997) (siehe auch Abschnitt 1.5), einem für Sod1 spezifischen Chaperon, zum anderen gibt es in einigen Organismen einen Ccs1-unabhängigen Aktivierungsweg. Letzterer wurde zum ersten Mal von Wong in einem CCS-Knock-Out-Mausmodell beschrieben, bei dem neben eines stark erhöhten Anteils von inaktivem Sod1 ein Anteil von aktiver Sod1 nachgewiesen wurde (Wong et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Sod1 in dem Modellorganismus *C.elegans*, einem Fadenwurm, aktiviert wird, obwohl dieser Organismus kein Ccs1-Homolog besitzt (Jensen and Culotta, 2005). Im Gegensatz dazu haben viele Studien gezeigt, dass die Aktivierung von Sod1 durch Ccs1 in *S.cerevisiae* obligat ist. Als Erklärung dafür wurde eine strukturelle Besonderheit der Aminosäure-Sequenz von Sod1 nahe dem C-Terminus in Organismen mit Ccs1-obligatem Aktivierungsweg wie der Hefe gefunden. So ist ein Prolin-Rest an der Position 144 der Hefe-Sod1 für die Ccs1-Abhängigkeit verantwortlich. Wird das Prolin gegen ein Leucin ausgetauscht, wie es in der humanen Form der Sod1 der Fall ist, wird Ccs1 zur Sod1-Aktivierung nicht

mehr länger benötigt (Leitch et al., 2009a). Der Prolinrest an dieser Position scheint die Oxidation des nahegelegenen Cysteinrests zur Ausbildung einer Disulfidbrücke deutlich zu erschweren.

Sod1 im menschlichen Organismus besitzt im Gegensatz zu Hefe-Sod1 vier Cysteinreste (siehe Abb. 1.3). Zwei davon, die Cysteinreste an der Position 57 und an Position 146 (siehe Pfeile Abb.1.3), bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke aus. Diese beiden Cysteinreste sind ebenfalls für die Faltung und für die enzymatische Aktivität von humaner SOD1 wichtig (Kawamata and Manfredi, 2008).

Hs	MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVVWGSIKG.LTEGLHGFHVHEF	51
Mm	MAMKAVCVLKGDPVQGTIHFEQKASGEPVVLSGQITG.LTEGQHGFVHQY	51
Dm	MVVKAVCVINGD..AKGTVFFEQESSGTPVKVSGEVCG.LAKGLHGFHVHEF	49
Nc	.MVKAVAVVRGDSNVKGTVIFEQESAPTTITYDISGNDPNAKRGFHIHTF	51
Sc	.MVQAVAVLKG DAGVSGVVKFEQASESEPTTVSYEILAGNSPNAERGFHIHEF	51
Hs	GDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKLEERHVGD LGNVTADKDG VADVSI EDS	103
Mm	GDNTQGCTSAGPHFNPHSKKHGGFALEERHVGD LGNVTAGKDG VANVSI EDR	103
Dm	GDNTNGCMS SSGPHFNPYGKEHGAEVLENRHLGD LGNIEATGDCPTKVNITDS	101
Nc	GDNTNGCTSAGPHFNPHGTTTHGDRTAEVVRHVGD LGNIETDAQGN AKGTVTDN	103
Sc	GDA TNGCVSAGPHFNPFKKTHGAE TLEVRHVGD MGNVKTDENGVAKGSFKDS	103
Hs	VISLSGDHCIIIGRTL VVHEKADDLGGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ.	154
Mm	VISLSGEHSIIIGRTM VVHEKQDDLGGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ.	154
Dm	KITLFGADSIIGRTV VVHADADDLGGGGHELSKSTGNAGARIGCGVIGIAKV	153
Nc	LVKLIGPESVIGRTV VVHAGTDDLGGGNEESLKTGNAGPRPACGVIGISQ.	154
Sc	LIKLIGP TSVVGRSVV I HAGQDDLGGGDT EESLKTGNAGPRPACGVIGL TN.	154

**Abb. 1.3: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Sod1 in verschiedenen Spezies.** Hs: Homo sapiens; Mm: Mus musculus; Dm: Drosophila melanogaster; Nc: Neurospora crassa; Sc: Saccharomyces cerevisiae; Zahlen rechts: Position der letzten Aminosäure dieser Zeile im Protein; Pfeile: Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden.

## 1.5 Ccs1 – das Kupfer-Chaperon von Sod1

Ccs1 (Copper Chaperone for Sod1) vermittelt die Ausbildung der Disulfidbrücke sowie den Einbau des Kupferatoms in Sod1 und überführt die Sod1 somit in ihre aktive Form (Culotta et al., 1997).

Das in vielen Spezies vertretene Protein trägt vier konservierte Cysteinreste, von denen zwei an der Bildung der Disulfidbrücke in Sod1 beteiligt sind. Allerdings ist Ccs1 nicht essentiell für das Überleben der Zelle. So ergeben sich mildere Effekte durch die Deletion des Ccs1-Gens in *Drosophila* und Maus als bei einem Sod1-*knock out* (Kirby et al., 2008, Matzuk et al., 1998, Wong et al., 2000). In Hefe treten Auxotrophien für Lysin und Methionin auf, wie auch schon im Sod1-Deletionsstamm.

Ccs1 ist ein Protein, das aus drei Domänen aufgebaut ist und in Hefe sieben Cysteinreste besitzt (siehe Abbildung 1.4) (Lamb et al., 1999, Rae et al., 2001, Schmidt et al., 1999).

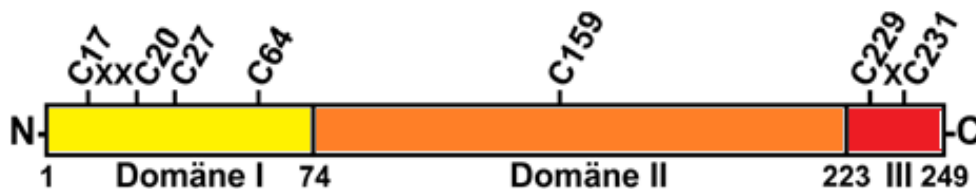


Abb. 1.4: Schematische Übersicht der Domänen von Ccs1 in *S.cerevisiae*. III: Domäne III; C: Cysteinrest; X: Aminosäurerest; Zahlen: Position der Aminosäuren

Die N-terminale Domäne I von Ccs1 mit 74 Aminosäureresten in *Saccharomyces cerevisiae* enthält ein CxxC-Motiv (Cysteinreste an der Position 17 und 20) und weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem Kupfer-Chaperon Atx1 auf, das die Fähigkeit besitzt, Kupfer-Ionen zu binden (Pufahl et al., 1997). Zusätzlich beinhaltet diese Domäne zwei weitere Cysteinreste an den Positionen 27 und 64. Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Cysteinreste ausschlaggebend für den mitochondrialen Import in den IMR und für die Interaktion mit Mia40 sind (Gross et al., 2011, Kloppel et al., 2011). Nach der Interaktion des Cysteinrests C64 von Ccs1 mit Mia40 kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C27 und C64, die die Faltung der Domäne I von Ccs1 stabilisiert.

Die Domäne II von Ccs1, die sich von den Aminosäureresten 79 bis 223 erstreckt, besitzt Ähnlichkeit mit Sod1 und vermittelt die Interaktion mit Sod1 (Lamb et al.,

1999, Lamb et al., 2000). Somit wird die Voraussetzung für die Aktivierung von Sod1 geschaffen.

Die C-terminale Domäne III des Ccs1 besteht aus 26 Aminosäureresten und beinhaltet ein CxC-Motiv (Cysteinreste an der Position 229 und 231), das für die Aktivierung von Sod1 verantwortlich ist (Lamb et al., 2001, Rae et al., 2001, Schmidt et al., 1999). Die Cysteinreste dieses Motivs spielen vermutlich eine ausschlaggebende Rolle für den Transfer des Kupfer-Ions und für die Ausbildung einer Disulfidbrücke in Sod1.

Übereinstimmend mit seiner Funktion ist Ccs1, wie auch Sod1, zum größten Teil im Zytosol, aber auch in geringerem Ausmaß im mitochondrialen IMR lokalisiert (Sturtz et al., 2001). Diese mitochondriale Fraktion von Ccs1 spielt für die Lokalisation von Sod1 im IMR von Mitochondrien eine Rolle (Field et al., 2003). So wird Sod1 in seiner reduzierten und ungefalteten apo-Form über die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex) in den IMR transportiert. Dort wird Sod1 mit Hilfe von Ccs1 durch die Aufnahme des Kupfer-Ions und der Ausbildung einer Disulfidbrücke gefaltet, was zu seiner Retention im IMR führt (Field et al., 2003). Folglich führen erhöhte Mengen an Ccs1 im IMR zu erhöhten Mengen von Sod1 (Sturtz et al., 2001).

Hs	....MASDSGNCGLTCTLEFAVQMT..CQSCVDAVRKSLQGVAVQDV	44
Mm	....MASKSGDGGTVCALEFAVQMS..CQSCVDAVHKTKGVAEVQNV	44
Dm	....MSS.....IKIEFAVQMRGDES YAGALRSALDGVG...QVEI	35
Nc	KIAGNMSITTP...FKTLEFAVPMH..CESCVNDVSGALYKLPINKVEA	45
Sc	....MTTNDT....YEATFAVPMH..CENCVNDIKACLKNVPSINS	39
Hs	HLEDQMVLVHTTLPSEVQALLEGTGRQAVLKCMG...SGQLQNLGA	92
Mm	QLENQMVLVQTTLPSEVQALLESTGRQAVLKCMG...SSQLQNLGA	92
Dm	DTQEGRVIIQTRPWESEIQDKIEATCVRAVLSGFG...GQSAVALINTTGS	83
Nc	NLKDCLLTIEGTAAPSAIVNAIQSIRDAILRSGSDSQGAAVSILETYH	96
Sc	DIEQQINSVSESSVAPSTIINTLRNCKDAITRGAGKPNSSAVAILP	90
Hs	LGEPGT.....VQGVVREIQLTPER...CLIDGTIDCLEP..GLHGLH	130
Mm	LEGCGS.....IQGVVREIQLSSEL...CLIEGTIDCLEP..GLHGLH	130
Dm	VVDKTP.....IQGVVRETTITADKKPGVVVDGVVDCLESP..GLHGLH	124
Nc	TLDKITPAPGASDRMVRGLARMVQVNNST...TIVDLILRGLAP..GT	143
Sc	TIDQKK.....DTAVRGLARIVQVGENK...TIFDITVNCVPEAGNY	132
Hs	VHQYGDLTNNCNSCGNHFNPD...GASHGGPQD..SDRHRGDLGNVRAD	176
Mm	VHQYGDLTTRDCNSCGDHFNPD...GASHGGPQD..TDRHRGDLGNVRAE	176
Dm	IHESGDTFAGCSSVGEHYNER...QSPHGSFAAGAEERHAGDLGNIRADEN	172
Nc	IREFGDLARGVESAGPVWSGTATLTADTKAQISGDPNAPRVLGTVEINKD	194
Sc	IHEKGDVSKGVESGKVVWH.....KFDEPIECFNESDLGKNLYS.....	171
Hs	GRAIFRMEDEQLKVVWDVIGRSLIIDEGEDDLGRGGHPLSKITGNSGERLAC	227
Mm	GRATFRIEDKQLKVVWDVIGRSLVIDEGEDDLGRGGHPLSKITGNSGKRLAC	227
Dm	SRATERFVDFVLEWDDIIGRAVVLITANADDLGRGGNDQSLIDGNSGERIAC	223
Nc	GRGSVFLSHP..FCWVEVIGHAFVAVP..VSVDESAGSTLENDENT...VV	238
Sc	..GKTFLSAP..LPTWQLIGRSFVIS...KSNHFPENEPSSVKDYS...FL	212
Hs	GIARSAGLFQNERKQICSDGLTIWBERGRPIAGKGRKESAQPPAHL	274
Mm	GIARSAGLFQNERKQICSDGLTIWBERGRPIAGQGRKDSAQPPAHL	274
Dm	GIARSAGILENERKICCDGLTIWBERNKLEAGKERSQKL.....	264
Nc	GIARSAGVWENRRTVCSCTGRTLWBERKDEVEKGM.....	275
Sc	GIARSAGVWENNKQVCACTGRTVWBERKDALANNIK.....	249

**Abb. 1.5: Vergleich von Aminosäuresequenzen von Ccs1 in verschiedenen Spezies.** Hs: Homo sapiens; Mm: Mus musculus; Dm: Drosophila melanogaster; Nc: Neurospora crassa; Sc: Saccharomyces cerevisiae; Zahlen rechts: Position der letzten Aminosäure dieser Zeile im Protein.

Der Import von Ccs1 in den mitochondrialen IMR ist abhängig von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem (siehe Abschnitt 1.3). Ccs1 ist allerdings kein klassisches Substratprotein, denn es enthält kein „*twin Cx<sub>n</sub>C*“-Motiv. Dennoch sind die Cysteinreste in Ccs1 wichtig für den mitochondrialen Import. Wie weiter oben schon erläutert wurde, wird in Ccs1 nach Interaktion mit Mia40 eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten 27 und 64 ausgebildet (Gross et al., 2011). Diese beiden Cysteinreste sind somit für den mitochondrialen Import von Ccs1 ausschlaggebend, denn in ihrer Abwesenheit ist die mitochondriale Fraktion von Ccs1 stark reduziert. In Übereinstimmung mit der Rolle von Mia40 im Import von Ccs1 in Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Mia40 die Menge an mitochondrialem Ccs1 und folglich auch Sod1 erhöht (Reddehase et al., 2009).



## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in dem Gen für die Superoxid-Dismutase, Sod1, verursachen 20% der Fälle der erblich bedingten Amyotrophen Lateralsklerose (fALS) (Boillee et al., 2006). Dabei wurden Sod1-Aggregate gefunden, die mit Mitochondrien assoziiert waren und mitochondriale Defekte verursachten (Deng et al., 2006, Ferri et al., 2006). Ebenso führte eine Überexpression von Ccs1, dem Kupferchaperon von Sod1, das den mitochondrialen Import von Sod1 und ihre Aktivierung vermittelt, zu einem beschleunigten ALS-Verlauf im Maus-Modell (Son et al., 2007). Sod1 ist überwiegend im Zytosol, aber in kleinen Mengen auch im IMR von Mitochondrien lokalisiert. Die mitochondriale Fraktion der Sod1 und ihre Biogenese könnten für den Pathomechanismus der Sod1-abhängigen fALS eine Rolle spielen. Deshalb ist es wichtig, die molekularen Mechanismen der Biogenese von mitochondrialer Sod1 zu verstehen, das heißt zu klären, welche Faktoren ihre Translokation in die Mitochondrien und ihre Aktivierung beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen zur Biogenese von mitochondrialer Sod1 im Modellorganismus *S. cerevisiae* adressiert werden.

Neben der Ccs1-abhängigen Aktivierung kann Sod1 in vielen Organismen auch unabhängig von Ccs1 aktiviert werden. Es stellte sich die Frage, ob Sod1 auch unabhängig von Ccs1 in geringen Mengen in Mitochondrien importiert werden kann. Wird Sod1 nicht nur über Ccs1, sondern in Abwesenheit von Ccs1 auch direkt vom Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System importiert? Diese Frage wurde in Deletionsstämmen von Ccs1 analysiert, in denen die Depletion oder die Überexpression von Mia40 durch regulierte Expression induziert werden können. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die mitochondriale Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 in ihrem Redoxzustand verändert ist und ob sie enzymatische Aktivität aufweist. Dabei sollte auch der Einfluß von Mia40 auf die Aktivität von mitochondrialer Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 analysiert werden.

Für den Ccs1-abhängigen Biogeneseweg der mitochondrialen Sod1 sollte geklärt werden, welche Cysteinreste in Ccs1 für den mitochondrialen Import und die Aktivierung von Sod1 bedeutend sind. Diese Frage sollte mit Hilfe von Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 beantwortet werden.

Humane SOD1 kann in Säugern und in Hefe in Abwesenheit von Ccs1 funktionell exprimiert werden (Carroll et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob humane SOD1 nach Expression in Hefe-Wildtyp-Zellen und  $\Delta ccs1$ -



Zellen im IMR von Mitochondrien lokalisiert ist. Es sollte getestet werden, ob der mitochondriale Import von humaner SOD1 in Abwesenheit von Ccs1 von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System abhängt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2-disulfonsäure (AMS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Aceton	J.T. Baker, Deventer
Acrylamid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Adenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Amicon Ultra Zentrifugationsfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Hefeextrakt	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Bacto-Pepton	USB Corporation, Cleveland Ohio (USA)
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bradfordreagenz, Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Molekularbiologische Ansätze)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
BSA (Proteinchemische Ansätze)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Chymotrypsin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digitonin	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Desoxyribonukleosid-triphosphat (dNTP) Mix	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Dithiothreitol (DTT)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Ethylen-diamin-tetra-acetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## MATERIAL UND METHODEN

<i>Fetal bovine serum</i> (FBS)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FUJI Medical X-Ray film, Super RX, 100 NIF	FUJIFILM Cooperation, Tokyo (Japan)
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Galaktose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzin	Merck KGaA, Darmstadt
Greiner bio-one cuvettes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Harnstoff	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Hepes	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Histidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
KOH	Merck KGaA, Darmstadt
Leucin	USB Corporation, Cleveland Ohio (USA)
Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Mannitol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer
Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Milchsäure	Merck KGaA, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium (Sodium) Dodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Nucleospin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Orange G Farbstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago Illinois (USA)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K (PK)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
PureYield Plasmid Midiprep-System	Promega, Madison Wisconsin (USA)
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Riboflavin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sekundärer Ziegenantikörper Anti-Hase oder Anti-Maus – Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Bio-Rad Laboratories, München
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Transferpipetten	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Trichloressigsäure (acetic acid) TCA	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Uracil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Whatman-Blottingpapier	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison Wisconsin (USA)
Yeast Nitrogen Base	Life Technologies GmbH, Invitrogen, Darmstadt
Zymolyase	Seikagaku Biobusiness Corporation, Tokyo (Japan)

## 2.2 Medien

Vor ihrer Benutzung wurden alle Medien autoklaviert und vor Zugabe von Antibiotika und Aminosäuren auf 50 °C abgekühlt. Für die Herstellung von Platten wurden die Medien mit 1% Bacto-Agar versetzt.

### 2.2.1 Für die Anzucht von E.coli

LB-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl
LB-Amp	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Platten	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar, 100 µg/ml Ampicillin
SOC Medium	2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose

### 2.2.2 Für Hefekulturen

Lactatmedium	0,3% (w/v) Hefeextrakt, 7,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 18,7 mM NH <sub>4</sub> Cl, 3,4 mM CaCl <sub>2</sub> , 8,6 mM NaCl, 4,8 mM MgSO <sub>4</sub> , 18,5 mM FeCl <sub>3</sub> , 2% (v/v) Milchsäure, pH 5,5 mit KOH einstellen
YPD	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, pH 5,5, 2% (v/v) Glukose
YPGal	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, pH 5,5, 2% (v/v) Galaktose
Selektivmedium (Synthetic Dropout)	0,17% (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> ( ohne Aminosäuren und (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), 37,8 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,02 mg/ml Adenin, 0,02 mg/ml Histidin, 0,03 mg/ml Leucin, 0,03 mg/ml Lysin, 0,02 mg/ml Tryptophan, 0,02 mg/ml Uracil (Zur Selektion auf einen Auxotrophiemarker wurde die entsprechende Aminosäure oder Base nicht hinzugefügt.) Als Kohlenstoffquelle wurden hinzugefügt: 2% (w/v) Glukose (SD), 2%

	(w/v) Galaktose (SGal) oder 2% (v/v) Milchsäure (SLac, pH 5,5 mit KOH eingestellt)
--	--

## 2.3 Biologisches Material

### 2.3.1 Verwendete Stämme von E.coli

Stamm	Genotyp	Referenzen
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17 (r <sup>k</sup> <sup>-</sup> m <sup>k</sup> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	(Meselson and Yuan, 1968)

Tab.2.1: Verwendete Stämme von E.coli. Für Klonierungen wurden DH5 $\alpha$ -Zellen eingesetzt.

### 2.3.2 Verwendete Stämme von S. cerevisiae

Stamm	Genotyp	Referenzen
YPH 499	MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1	Sikorski (Sikorski and Hieter, 1989)
YPH 499 $\Delta$ Ccs1	YPH499 <i>ccs1::</i> KanMX	S. Reddehase, (Gross et al., 2011)
YPH 499 Gal-Mia40	MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 P <sub>GAL10</sub> -MIA40	Terziyska et al., 2005
YPH 499 Gal-Mia40 $\Delta$ Ccs1	YPH499 <i>ccs1::</i> KanMX His3-PGAL10-MIA40	S. Reddehase, (Gross et al., 2011)
BY4742	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0;	Euroscarf, (Brachmann et

	lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0	al., 1998)
BY4742 $\Delta$ Sod1	BY4742 <i>sod1::KanMX</i>	Klonkollektion <i>Openbiosystems Pharmacon</i>

Tab.2.2: Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

## 2.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in *ApE* (A plasmid Editor M. Wayne Davis, <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) und *CONTRAFold* (<http://contra.stanford.edu/contrafold/server.html>) entworfen und von Metabion, Martinsried hergestellt. In Tabelle 2.4 sind die verwendeten Primer für die Klonierung der untenstehenden Konstrukte aufgelistet.

Name des Primers	Nukleotidsequenz
CB 4: hSOD1-Stop- <i>Hind</i> III	5'-CGC CGG AAGCTT CTA TTG GGC GAT CCC -3'
CB 5: <i>Eco</i> RI-hSOD1	5'- CTC GAATTC ATG GCG ACG AAG GCC GTG -3'

Tab.2.4: Verwendete Primer

## 2.5 Verwendete Plasmide

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Name	Antibiotikumresistenz	Hefe-Selektionsmarker	Referenz
pYX 142	Ampicillin (100 $\mu$ g/ml)	Leucin	Novagen Inc., Madison Wisconsin (USA)
pYX 142- Mia40His	Ampicillin (100 $\mu$ g/ml)	Leucin	C. Kozany, unveröffentlicht
pRS314	Ampicillin	Tryptophan	(Sikorski and

	(100µg/ml)		Hieter, 1989)
pRS314-Ccs1 WT	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314-Ccs1 C17/20S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314-Ccs1 C27/64S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314-Ccs1 C229/231S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314- cytb2(1-88) Ccs1 WT	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314- cytb2(1-88) Ccs1 C17/20S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314- cytb2(1-88) Ccs1 C27/64S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS314- cytb2(1-88) Ccs1 C229/231S	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	(Gross et al., 2011)
pRS 316- hCCS1	Ampicillin (100µg/ml)	Uracil	(Leitch et al., 2009b)
pYX 142- hSOD1	Ampicillin (100µg/ml)	Leucin	Diese Arbeit

**Tab.2.5: Verwendete Plasmide**

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Klonierungsstrategien

Die gewünschte Nukleotidsequenz wurde mit den entsprechenden Primern mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (siehe Tab.2.4 und 2.5). Nach Restriktionsverdau sowohl der PCR-Produkte, als auch des leeren Vektors mit Restriktions-Endonukleasen, wurden die Fragmente in einem 1%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up*



*System* nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Anschließend wurden die geschnittenen PCR-Produkte mit dem geschnittenen Vektoren ligiert und positive Klone wurden nach der Transformation in DH5 $\alpha$  *E.coli*-Zellen auf LB-Amp-Platten selektioniert. Durch Aufreinigung der DNA aus *E.coli*-Zellen mittels *Nucleospin Plasmid QuickPure* nach Angaben des Herstellers und erneutem Restriktionsverdau wurden Kolonien mit dem erwünschten Plasmid identifiziert. Schließlich wurden größere Mengen an DNA aus DH $\alpha$ -Zellen mit Hilfe des *PureYield Plasmid Midiprep-System* isoliert und mittels erfolgter Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

#### 2.6.1.1 Klonierung von pYX142-hSOD1

Die kodierende Sequenz des hSOD1-Gens wurde aus genomischer Hefe-DNA durch PCR (siehe Abschnitt 2.6.2) mit den Primern CB4 und CB5 (Tabelle 2.4) amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die in die Primer eingebauten Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in den Vektor pYX142 kloniert.

### 2.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von Plasmid- oder genomischer DNA erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) mittels Taq-Polymerase. Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.6 bzw. Tabelle 2.7 aufgelistet.

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Taq-Standard-Puffer	10x (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
dNTPs	0,2 - 0,4 $\mu$ M
Primer 1	0,5 $\mu$ M
Primer 2	0,5 $\mu$ M
DNA	cDNA: ca. 10 – 50 ng genomische DNA: ca. 400 ng
Taq Polymerase	0,25 Einheiten
ddH <sub>2</sub> O	x $\mu$ l
Gesamt-Volumen	20 – 100 $\mu$ l

**Tabelle 2.6: Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion**

Schritt	Temperatur (° C)	Dauer
Erste Denaturierung	94	4 min
<b>Zyklus:</b>		
Denaturierung	94	30 sek
Primer-Anlagerung	55 - 65	30 sek
Verlängerung	72	1 min pro kb
<i>Wiederholung des Zyklus 30 mal</i>		
Zusätzliche Elongation	72	10 min

**Tabelle 2.7: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion**

### 2.6.3 Reinigung und Analyse von DNA

#### 2.6.3.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarosegel-Elektrophorese in TAE-Puffer aufgetrennt. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) in einer Mikrowelle geschmolzen, auf circa 60 °C abgekühlt und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit Auftragspuffer (5x) (30% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 mM EDTA) versehen. Abhängig von der Größe des Agarosegels erfolgte die Auftrennung der Proben zwischen 60 bis 140 V.

#### 2.6.3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht (302 nm) analysiert und mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die DNA aus den Gel-Stücken wurde dem Protokoll des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* folgend isoliert und standardmäßig in einem Volumen von 30 µl eluiert.

#### 2.6.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch das *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* nach dem Auftragen von 1 µl der zu untersuchenden Probe bei 260/280 nm.

#### 2.6.3.4 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurde eine Probe mit einem Volumen von 15 µl und einer Konzentration von 80 ng/µl unter Zugabe eines Primers an die Firma Eurofins

MWG Operon (Ebersberg) geschickt und das Ergebnis mittels des Computer-Programmes ApE (A plasmid Editor) ausgewertet.

### 2.6.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA durch Restriktions-Endonukleasen wurde zur Überprüfung isolierter Plasmide, sowie zur Vorbereitung von amplifizierten DNA-Fragmenten zur Ligation mit einem Vektor eingesetzt. Ca. 1 µg der gereinigten DNA wurde in einem Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 40 µl durch 2-5 U Enzym und der von der Firma NEB empfohlenen Reaktionspuffer (NEB 1 bis 4; 10x) (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) geschnitten. Der Ansatz für Testverdaue wurde bei 37 °C für 10 min inkubiert und der Ansatz für präparative Verdaue wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Analyse auf präparativen Agarosegelen bzw. die Reinigung mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* und Weiterverarbeitung.

### 2.6.5 Ligation

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden DNA-Fragmente, die vorher von Restriktionsenzymen geschnitten wurden, mit ebenso vorbehandelter Vektor DNA verknüpft. Dazu wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz 150 ng linearisierter Vektor mit einem ca. 8fachen molaren Überschuss an DNA-Fragment vermischt und 2 U T4-Ligase mit dem dazugehörigen Puffer von NEB (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) hinzugefügt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 20 min inkubiert.

### 2.6.6 Transformation

#### 2.6.6.1 Herstellung elektrokompenter E.coli Zellen

Um *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformieren zu können, erfolgte die Herstellung von elektrokompenten Zellen. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml der über Nacht gewachsenen *E.coli*-Kultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd

inkubiert. Nach dem Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,6 wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt und dann bei 2700 xg bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellsediment vorsichtig in 200 ml eiskaltem 10% (w/v) Glycerin resuspendiert und erneut bei 2700 xg mit 4 °C für 20 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine erneute Resuspension des entstandenen Zellsediments in 50 ml 10% (w/v) Glycerin und eine erneute Sedimentation wie zu den vorherigen Bedingungen. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 ml 10% (w/v) Glycerin aufgenommen und nach Aliquotierung in 45 µl-Einheiten bei -80 °C gelagert.

### 2.6.6.2 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Für die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* oder zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde die gewünschte DNA-Matrize in *E.coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Zu diesem Zweck wurde 1 µl Plasmid-DNA bzw. 1 µl Ligationsansatz mit 45 µl elektrokompenter Zellen gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Durch ein Elektroporationsgerät (*Gene Pulser System*) wurde diese Küvette einem Stromstoß (1,2 kV, 400 Ω, 25 µFD) ausgesetzt und die Suspension nach Zugabe von 1 ml SOC Medium in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 37°C für 30 bis 45 min unter Schütteln inkubiert, vorsichtig abzentrifugiert und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Schließlich wurden sie auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 2.6.6.3 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Eine 50 ml-Kultur des zu transformierenden Hefestammes wurde über Nacht in YPD- oder YPGal-Medium bei 30 °C angezogen und am darauffolgenden Morgen auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,2 verdünnt. Nach dem Erreichen einer  $OD_{600}$  von etwa 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 g, 3 min, RT) sedimentiert und mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die weiteren Schritte der Transformation erfolgten nach dem *Quick and Easy TRAF0 Protocol* (Woods and Gietz, 2001). Die transformierten Hefezellen wurden anschließend auf Selektiv-Platten ohne den entsprechenden Auxotrophiemarker ausgestrichen und bei 30 °C für mehrere Tage inkubiert.

### 2.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus E.coli-Kulturen wurde das *Nucleospin Plasmid QuickPure* System der Firma Macherey-Nagel GmbH verwendet. Dazu wurden 2ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser Kultur sedimentiert und die DNA nach Anleitung des Herstellers präpariert.

Zur Präparation größerer Mengen DNA wurde das *PureYield Plasmid Midiprep-System* von Promega eingesetzt und die DNA ausgehend von 50 ml einer Übernachtskultur nach Hersteller-Angaben isoliert.

## 2.7 Proteinbiochemische Methoden

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

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurden Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden Gele mit einer Gesamtgröße von 14 x 10 cm angefertigt, deren Bestandteile sich aus einem 1 cm hohen Bodengel aus Agarose, einem 7 cm hohen Trenngel und einem 2 cm hohen Sammelgel, jeweils mit einer Breite von 1 mm, zusammensetzten. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine variierte die Konzentration des Acrylamids im Trenngel von 8 bis 16% (w/v). Zu den Proben wurde Laemmli-Puffer hinzugegeben, der zusätzlich mit oder ohne 5% (v/v)  $\beta$ -ME versetzt war, um reduzierende bzw. nicht reduzierende Bedingungen für die Elektrophorese zu schaffen. Danach wurden die Proben bei 95 °C für 3 min hitzedenaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung wurde bei 35 mA für 1,5 bis 2 h durchgeführt. Dann wurden die im Gel aufgetrennten Proteine für die Immunodekoration auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

SDS-PAGE Bodengel	1% Agarose in SDS-PAGE Laufpuffer
SDS-PAGE Trenngel	8-16% Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,6%,

	0,375 Tris pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,6% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
SDS-PAGE Sammelgel	5% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,06% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Laemmli-Puffer	2%(w/v) SDS, 5% $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (w/V) Glyzerin, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8 Falls angegeben, ohne Zugabe von $\beta$ -ME.
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 62 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS

### 2.7.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Westernblot)

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden unter Anwendung des *semi dry* Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Hierzu wurden zunächst zwei Whatman-Blottingpapiere à 17 x 12 cm, dann das Gel selbst und schließlich die Nitrozellulosemembran (15 x 9,5 cm) mit Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glyzin, 0,02% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) durchtränkt und in folgender Reihenfolge auf einer Graphitanode platziert: Whatman-Blottingpapier, Nitrozellulosemembran, SDS-PA-Gel und Whatman-Blottingpapier. Dieser Stapel wurde mit einer Graphitkathode bedeckt. Der Transfer wurde bei 250 mA für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurden die auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine reversibel mit Ponceau-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) TCA) angefärbt.

### 2.7.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zum Zwecke der Präzipitation von Proteinen aus einer Lösung wurde 72% TCA zu einer finalen Konzentration von 12% hinzugegeben und 30 min bei -20 °C inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte eine Zentrifugation der gefällten Proteine für 20 min bei 20000 xg und 4 °C. Das Sediment wurde anschließend mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert (20000 xg, 15 min, 4 °C). Nach 5 min Trocknungszeit bei RT wurde das Präzipitat in einem gewünschten Puffer resuspendiert und weiter verarbeitet.

### 2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Test)

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden die Proteinlösungen mit einem Volumen von 1 bis 10 µl mit 1ml der Bradfordreagenz (1:5 verdünnt) versetzt. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Bio-Photometer gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer gleichzeitig angesetzten Standardmessreihe aus 0, 3, 6, 12 und 24 µg/ml IgG bestimmt.

### 2.7.5 Proteinmodifikation

#### 2.7.5.1 Proteinmodifikation mit 4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2- (AMS)

Die Substanz AMS bildet kovalente Bindungen mit den freien Thiolgruppen von Cysteinresten. Da die so modifizierten Thiolgruppen nicht weiter reagieren können und AMS mit einer Größe von 500 Da zu einem sichtbaren Mobilitätsunterschied in SDS-Polyacrylamid-Gelen führt, eignet es sich somit zur Darstellung des Reduktionszustandes von Proteinen.

Als erster Schritt wurden 100 µg Mitochondrien mit oder ohne 10 mM DTT für 10 min bei 25 °C vorinkubiert. Dann folgte nach 5-facher Verdünnung mit SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) die Proteinfällung mit TCA. Anschließend wurden die präzipitierten mitochondrialen Proteine in 40 µl SDS-Puffer (2% (w/v) SDS, 100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl) mit oder ohne Zusatz von 15 mM AMS resuspendiert und für jeweils 30 min bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Schließlich

wurden die Proben mit 10 µl Laemmli-Puffer (siehe Abschnitt 2.7.1) versetzt und nach dem Kochen (95 °C, 3 min) mit oder ohne 20 mM DTT mit 0,5 M IAA gemischt. Die Proben wurden mit SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert.

### 2.7.5.2 Proteinmodifikation mit IAA

Das Reagenz Iodoacetamid (IAA) reagiert ebenfalls mit freien Thiolgruppen und geht mit diesen kovalente Bindungen ein. IAA-Modifikationen werden zur Stabilisierung von transienten Disulfidbrücken eingesetzt, wie der Interaktion von Mia 40 mit verschiedenen Substraten, wobei diese Behandlung im Gegensatz zur AMS-Modifikation nicht mit einer sichtbaren Veränderung der Proteinmobilität einhergeht.

Hierzu wurden 100 µg Mitochondrien in SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) 10-fach mit 80 mM IAA verdünnt und für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation sedimentiert und nach Bedarf weiterverarbeitet.

### 2.7.6 Sod1-Aktivitäts-Test

Sod1-Aktivitäts- in modifizierter Form wurden nach der Methode von Flohé und Otting (Flohe and Otting, 1984) durchgeführt. Dazu wurden Hefe-Mitochondrien wie unter 2.9.1.5 beschrieben isoliert und eine Menge von 150 bis 500 µg für 10 min bei 20000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Digitonin-Puffer in einem Verhältnis von ungefähr 1 µg Mitochondrien zu 1 µl Puffer resuspendiert und die Mitochondrien somit lysiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden nicht solubilisiertes Material durch Ultra-Zentrifugation (20 min, 90000 xg, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit Laemmli-Puffer ohne SDS (siehe Abschnitt 2.7.1) gemischt und auf einem nativen PA-Gel elektrophoretisch bei 4 °C und 35 mA für 1,5 h aufgetrennt. Dann wurde das Gel in 40 ml nativer PA-Gel Färbelösung bei Dunkelheit gefärbt und nach einer Inkubationszeit von 45 min durch UV-Licht einer 60 Watt-Glühlampe für 5 min entwickelt. Helle Banden zeigten eine Aktivität der Sod an, wobei langsamer laufende Banden eine Aktivität der Sod2, und schneller laufende Banden eine Sod1-Aktivität repräsentierten.



Digitonin-Puffer	3% Digitonin, 20 mM Hepes pH 7,4, 80 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM BCS
Natives PA-Bodengel	1% Agarose in nativem PA-Gel - Laufpuffer
Natives PA-Trenngel	16% Acrylamid/Bisacrylamid 30%/ 0,6%, 0,375 Tris pH 8,8, 0,6% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Natives PA-Sammelgel	5% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris pH 6,8, 0,06% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Natives PA-Gel-Laufpuffer	25 mM Tris, 62 mM Glyzin
Natives PA-Gel-Färbelösung	490 µM NBT, 106 µM Riboflavin, 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,8, 160 µM (v/v) TEMED

## 2.8 Zellbiologische Methoden

### 2.8.1 Zellen von *S. cerevisiae*

#### 2.8.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *S.cerevisiae* erfolgte in verschiedenen Medien bei 30 °C, wobei Flüssigkulturen mit 130 rpm geschüttelt wurden. Als Vorbereitung einer Mitochondrien-Präparation wurden die Hefezellen mindestens drei Tage in Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

Für Stämme, in denen Gene in ihrer Expression durch den GAL-Promotor reguliert werden, wurden für die Überexpression Medien mit 0,1% (w/v) Galaktose und für die Repression mit 0,1% (w/v) Glukose verwendet. Parallel hierzu wurden die dazugehörigen Wildtypstämme im gleichen Medium kultiviert.

Zur Selektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese in Selektivmedium kultiviert, dem die entsprechenden Marker-Aminosäuren oder -Basen (Adenin, Histidin, Leucin, Lysin, Tryptophan, Uracil) fehlten.

### 2.8.1.2 Herstellung von Glycerolstocks

Die entsprechenden Hefezellen wurden auf eine Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C solange inkubiert, bis Kolonien deutlich sichtbar waren. Dann wurde ein Zellhaufen mit einem Volumen von ca. 100 µl unter Verwendung einer sterilen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 800 µl 15% (v/v) Glycerol überführt und nach der Resuspension bei -80 °C gelagert.

### 2.8.1.3 Gewinnung von Gesamtzellprotein

Zur Gewinnung von Gesamtzellprotein wurden Hefezellen alkalisch aufgeschlossen. Hierfür wurden Hefekulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 2 durch Zentrifugation geerntet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden die präzipitierten Proteine für ebenfalls 5 min bei 18000 xg und RT sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Laemmli-Puffer (2% (w/v) SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% (w/V) Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8) aufgenommen und bei 95 °C für 3 min erhitzt. Dann folgte eine erneute Zentrifugation (18000 xg, 1 min, RT), um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Nachfolgend wurde der Überstand durch SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert.

### 2.8.1.4 Isolierung von Mitochondrien

Mitochondrien aus Hefezellen wurden nach der von Daum beschriebenen Methode (Gasser et al., 1982) isoliert. Hierfür wurden Hefekulturen in Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-1,5 kultiviert, bei 3000 xg für 10 min bei RT geerntet und das Zellsediment einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde dann entsprechend dem Feuchtgewicht (FG) in 2 ml Mito-Präp-Puffer 1 pro 1 g FG resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 min bei 30 °C unter Schütteln erfolgte erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 xg und RT. Auf einen Waschschriff mit 1,2 M Sorbitol folgte dann die Resuspension des Sediments in 6,6 ml Mito-Präp-Puffer 2 je 1 g FG. Nachfolgend wurde die Suspension für 30 bis 60 min bei 30 °C geschüttelt, um die Zellwand zu lysieren.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die durch den vorangehenden Schritt entstandenen Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (2000 xg, 5 min, 2 °C) geerntet und in 6,6 ml Mito-Präp-Puffer 3 pro 1 g FG resuspendiert. Diese Suspension wurde für den Zellaufschluss in einen Glashomogenisator überführt und durch zehn Stöße mit dem Pistill vorsichtig

aufgebrochen. Danach folgte die Isolierung der mitochondrialen Fraktion durch differentielle Zentrifugation. Noch verbliebene intakte Zellen, Membranen und Zellkerne wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt (1900 xg, 5 min, 4 °C) abgetrennt. Auf eine Wiederholung dieser Zentrifugation folgte die Sedimentation der Mitochondrien bei 12000 xg und 2°C für 12 min. Auch dieser Schritt wurde wiederholt. Sedimentierte Mitochondrien wurden anschließend in 25 ml SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) resuspendiert und erneut zentrifugiert (1900 xg, 5 min, 4 °C). Der daraus entstandene Überstand wurde zur Isolation von Mitochondrien bei 18000 xg für 12 min bei 4° C zentrifugiert und das Sediment in 0,5-1,5 ml SH-Puffer resuspendiert. Dann wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und auf 10 mg/ml mit SH-Puffer verdünnt, bevor die 50 µl Aliquots der isolierten Mitochondrien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

Mitopräp-Puffer I	100 mM Tris, 100 mM DTT
Mitopräp-Puffer II	1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase, 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Mitopräp-Puffer III	0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA, 0,2% (w/v) BSA, 1mM PMSF

### 2.8.1.5 Isolierung von ultra-reinen Mitochondrien mittels Saccharose-Gradient

Um Verunreinigungen von Mitochondrien durch andere Zellorganellen oder andere Zellbestandteile wie zum Beispiel Zytoskelett-Bestandteile zu vermeiden, wurden Hefe-Mitochondrien wie oben beschrieben isoliert und mittels Saccharose-Gradient (Meisinger et al., 2006) weiter aufgereinigt. Dazu wurden Saccharose-Puffer 1 bis 4 mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen hergestellt und in der Reihenfolge absteigender Konzentrationen in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde eine Menge von 1000 µg Mitochondrien in SH-Puffer auf den Gradienten geladen und in einem Schwing-Rotor für 1 h bei 134000 xg und 2 °C zentrifugiert. Als nächster Schritt wurden die Mitochondrien, die sich nach der Zentrifugation zwischen Puffer 1 und Puffer 2 wiederfanden, mit einem zweifachen Volumen in SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) verdünnt und bei 12000 xg und 2 °C für 12 min pelletiert. Schließlich wurde das Pellet erneut in SH-Puffer auf eine

Endkonzentration von 10 mg/ml resuspendiert und die Mitochondrien nach Schockgefrieren bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

EH-Puffer	20 mM Hepes pH 7,4, 1 mM EDTA
Saccharose-Puffer 1	60% Saccharose in EH-Puffer
Saccharose-Puffer 2	32% Saccharose in EH-Puffer
Saccharose-Puffer 3	23% Saccharose in EH-Puffer
Saccharose-Puffer 4	15% Saccharose in EH-Puffer

### 2.8.2 Präparation von Mitoplasten

Unter Mitoplasten versteht man Mitochondrien, deren äußere Membran durch Schwellen in hypotonem Medium geöffnet wurde, wobei die innere Membran intakt bleibt. Zur Präparation wurden Mitochondrien in SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) einer zehnfachen Verdünnung in 20 mM Hepes pH 7,4 für 20 min auf Eis inkubiert.

### 2.8.3 Proteasen-Behandlung von Mitochondrien und Mitoplasten

Mitochondrien oder Mitoplasten wurden jeweils zehnfach in SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4) verdünnt und nicht durch eine Membran geschützte Proteine wurden durch Zugabe von Proteinasen wie zum Beispiel PK (100 µg/ml), Trypsin (50 µg/ml) oder Chymotrypsin (50 µg/ml) abgebaut. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteasen durch Zugabe von 2 mM PMSF inhibiert und die Mitoplasten durch Zentrifugation (10 min, 20000 xg, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 500 µl SH-KCl-Puffer (0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes pH 7,4, 80 mM KCl) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Mitochoplasten-Pellet wurde anschließend in Laemmli-Puffer (siehe Abschnitt 2.7.1) resuspendiert, 5 min bei 95 °C gekocht und durch SDS-PAGE weiter analysiert.

## 2.9 Immunologische Methoden

### 2.9.1 Immunodekoration von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Zunächst wurden mit Ponceau-Lösung (siehe Abschnitt 2.8.2) gefärbte Nitrozellulose-Membranen mit TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen, bis sie entfärbt waren. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen mit einer 5%igen (w/v) Milchpulverlösung in TBS bei RT unter Schütteln für 20 min inkubiert. Daraufhin folgte eine zweite Inkubation mit dem ersten Antikörper entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Konzentration der Antikörper wurde individuell abgestimmt. Danach erfolgten weitere Waschriffe für 10 min zunächst mit TBS, dann 10 min mit TBS und 0,05% (v/v) Triton-X 100 und wiederum 10 min TBS bei RT. Als nächstes wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, der den ersten Antikörper erkennt und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, in einer Verdünnung von 1:10.000 für 45 min RT inkubiert. Die Membran wurde nach drei weiteren Waschriffen, wie oben beschrieben, mit ECL-Reagenz benetzt. Dazu wurden je 750 µl ECL 1 und ECL 2 in einem Reaktionsgefäß gemischt und auf die Membran aufgetragen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgestreift und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm solange auf der Membran exponiert (z.B. 1 s, 15 s, 30 s, 1 min und 5 min), bis nach dem Entwickeln des Films in einer Maschine deutliche Banden erkennbar waren.

ECL 1	300 µl Luminol (440 mg/10 ml DMSO) und 133 µl Cumarinsäure ( 150 mg/10 ml DMSO) in 30 ml 100 mM Tris pH 8,5
ECL 2	0,02 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 30 ml 100 mM Tris pH 8,5

## 2.10 Geräte und Ausrüstung

96-Loch-Platten	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
Allegra X-22R Centrifuge	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht
Automatik-Pipetten	Gilson Inc., Middleton Wisconsin (USA)
Avanti J-20 XP Centrifuge	Beckman Coulter, Brea Kalifornien (USA)
Avanti J-25 Centrifuge	Beckman Coulter, Brea Kalifornien (USA)
Benchtop 2UV Transilluminator	UVP, Upland Kalifornien (USA)
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5417 R (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5424 (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5810 R (große Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
Digital graphic printer Up-D897	Sony. Co, Surrey (Großbritannien)
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Mailand (Italien)
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf (Schweiz)
Electrophoresis Power Supply EPS601	GE Healthcare, München
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Entwickler-Maschine (Agfa Curix 60)	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel (Belgien)
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
GelDoc-It Imaging System	UVP, Upland Kalifornien (USA)
Gene Pulser System (Elektroporator)	Bio-Rad Laboratories, München
GFL, -80 °C Gefriertruhe	Bavaria Kälte- und Klimatechnik
Gefrierschrank , -20 ° C	Premium No Frost Liebherr
Glasmaterial (Kolben, Flaschen)	Schott Instruments AG, Mainz
IKA cobimag RCT (Magnet-Mixer)	Janke und Kunkel, Staufen
Inkubationsschüttler, Multitron Standard	Infors HT, Bottmingen
Inkubatorschrank (30 °C, 67 °C)	Memmert, Schwabach
Inkubatorschrank (37 °C)	Haraeus Senatech GmbH, Osterode
Kanüle 26 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr

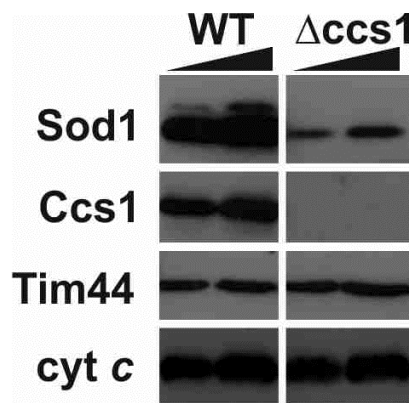
Magnetic 80 (Magnet-Mixer)	Edwards Kniese & Co. Hochvakuum GmbH, Marburg
Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 2000C Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Optima Max-E Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea Kalifornien (USA)
pH552 (pH-Elektrode)	WTW GmbH, Weilheim
Photometer	Ultraspec 10, Amersham Biosciences
Pipettenspitzen	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Primus (PCR)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Schwing-Rotor SW41 TI	Beckman Coulter, Brea Kalifornien (USA)
Spritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilabzüge, BDK	Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraspec 3000pro (UV Spectrophotometer)	Amersham Biosciences, Freiburg
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)
Waage CP22025	Sartorius AG, Göttingen

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Ccs1-unabhängige Lokalisation von Sod1 in Mitochondrien

##### 3.1.1 Eine Fraktion von endogener Sod1 ist in Zellen, in denen Ccs1 fehlt, in Mitochondrien lokalisiert

Die Sod1 befindet sich sowohl im Zytosol, als auch im Intermembranraum von Mitochondrien (Sturtz et al., 2001). Sie wird in Hefe über Ccs1 durch den Einbau einer Disulfidbrücke und eines Kupferatoms aktiviert (Culotta et al., 1997). Die Fraktion von Ccs1 im IMR von Mitochondrien spielt eine große Rolle für den mitochondrialen Importvorgang von Sod1, indem es die Faltung der apo-Form von Sod1 vermittelt und es am Verlassen des IMR hindert (Field et al., 2003). Was passiert aber in Hefe-Zellen, in denen die chromosomale Kopie von Ccs1 fehlt ( $\Delta ccs1$ ) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen? Befindet sich trotzdem Sod1 in diesen Mitochondrien? Um diese Frage zu klären, wurde die Lokalisation von Sod1 zwischen Mitochondrien von Wildtyp-Hefezellen und  $\Delta ccs1$ -Hefezellen verglichen (Abb. 3.1).

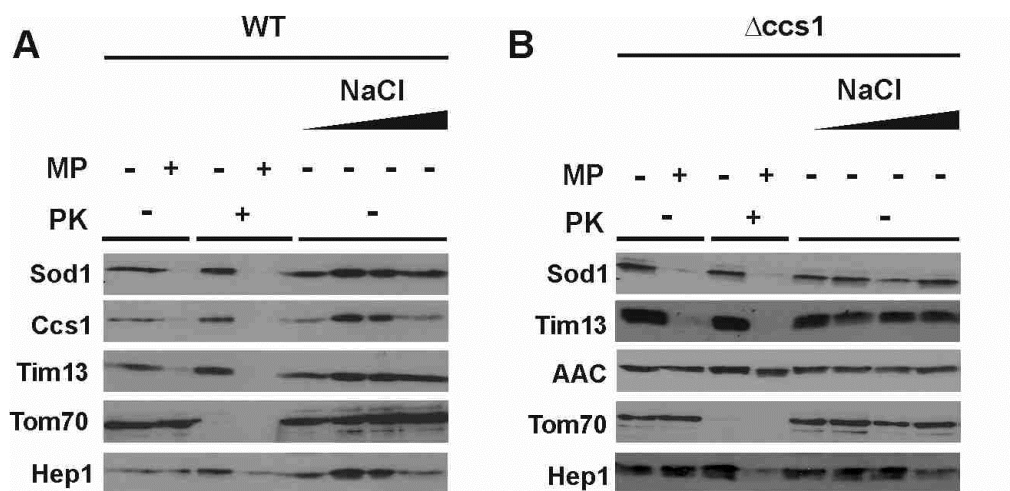


**Abb.3.1: Sod1 befindet sich in Mitochondrien von Wildtyp-Hefezellen und  $\Delta ccs1$ -Zellen.** Mitochondrien sowohl aus WT Hefe-Zellen, als auch aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen, wurden isoliert und mit Laemmli-Puffer gemischt. Dann wurden die Proben (25 und 50  $\mu\text{g}$ ) auf ein SDS-PA-Gel geladen und anschließend mittels Immundekoration gegen die gezeigten Proteine analysiert.



Hierzu erfolgte zunächst eine Isolierung von Mitochondrien aus WT und  $\Delta ccs1$  - Hefe-Zellen. Diese wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert. In Abbildung 3.1 ist zu sehen, dass sich Sod1 nicht nur in Mitochondrien von WT Hefe-Zellen, sondern auch in denen von  $\Delta ccs1$  Hefe-Zellen befand, wenn auch nur in verminderter Menge. Außerdem wurde kontrolliert, dass kein endogenes Ccs1 in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien vorhanden war. Die mitochondrialen Proteine Tim13 und Tim44 fungierten als Kontrolle und waren in den Mitochondrien beider Zelltypen gleichermaßen vorhanden.

Als Nächstes stellte sich die Frage, in welchem mitochondrialen Subkompartiment sich Sod1 befand oder ob es sich bei dem vorher gezeigten Ergebnis nur um eine zytosolische Kontamination handelte, bei der Sod1 durch ionische Wechselwirkungen mit der Außenmembran assoziiert war.



**Abb. 3.2: Sod1 befindet sich im IMR von Mitochondrien in Wildtyp-Hefezellen und in  $\Delta ccs1$ -Zellen.** Mitochondrien wurden aus YPH499-WT-Zellen (A) und aus YPH499- $\Delta ccs1$ -Zellen (B) isoliert und entweder mit SH-Puffer versetzt oder durch Zugabe von 20 mM HEPES zu Mitoplasten (MP) prozessiert. Danach wurden die Mitoplasten bzw. die Mitochondrien mit Proteinase K (PK) behandelt und verschiedene Mengen NaCl zugegeben. Die Proben wurden auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen, nach der Größe getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, sowie mit verschiedenen Antikörpern immunodekoriert.

Zunächst wurden Mitochondrien aus Wildtyp- und  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert. Mitoplasten (MP) wurden hergestellt, indem Mitochondrien durch Verdünnen in hypotonischem Medium zum Schwellen gebracht wurden, sodass die äußere Membran platzte. Ein Teil dieser Mitoplasten und auch ein Teil der intakten Mitochondrien wurde mit Proteinase K (PK), behandelt und somit Proteine im ursprünglichen IMR der Mitoplasten, sowie Proteine außerhalb der äußeren Membran der intakten Mitochondrien verdaut. Andere Fraktionen intakter Mitochondrien wurden wiederum in isotonischem SH-Puffer mit verschiedenen molaren Mengen an NaCl versetzt, um die über ionische Wechselwirkungen assoziierten Proteine von der äußeren Mitochondrien-Membran abzulösen. Anschließend wurden die mitochondrialen Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels *Western-Blotting* auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Schließlich wurden die gewünschten Proteine mit Hilfe von Immunodekoration sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.9.1).

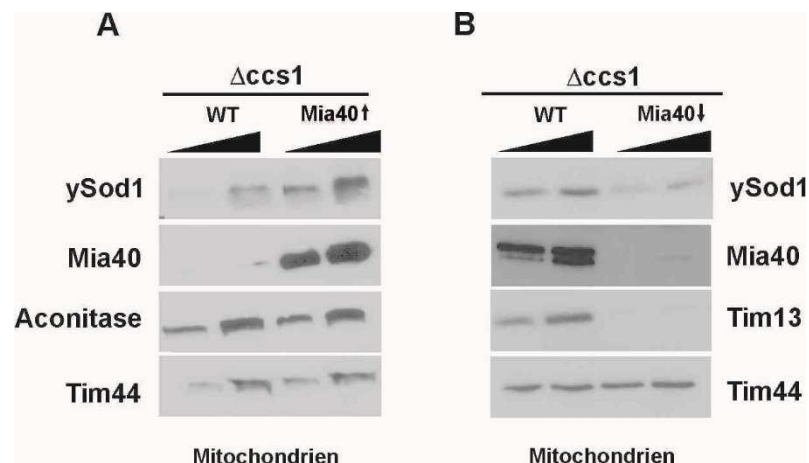
Wie in Abbildung 3.2 A dargestellt ist, zeigte sich kein Signal für endogene Sod1 in Mitoplasten. Dies deutete daraufhin, dass sich endogene Sod1 im IMR von Mitochondrien befand und durch die Zerstörung der AM wegdiffundierte. Sod1 verhielt sich genauso wie andere IMR-Proteine, wie zum Beispiel Tim13 und Ccs1, die als Kontrolle für lösliche IMR-Proteine ebenfalls immunodekoriert wurden. Die PK-Behandlung von Mitochondrien führte nicht zu einem Verlust des Sod1-Signals, während das mitochondriale Außenmembranprotein Tom70 durch die PK verdaut wurde. Dies deutete daraufhin, dass die Sod1 nicht auf den Mitochondrien assoziiert war, sondern in den Mitochondrien lokalisiert war. Selbst nach der Behandlung der Proben mit verschiedenen Mengen an NaCl wurde Sod1 nicht entfernt, was dafür sprach, dass Sod1 nicht auf der Außenmembran durch ionische Wechselwirkungen assoziiert war. Die Innenmembran der Mitoplasten war intakt, da Hep1, ein Matrixprotein, nicht freigesetzt wurde.

Wie in Abbildung 3.2 B zu sehen ist, befand sich endogene Sod1 trotz Abwesenheit von Ccs1 im IMR von Mitochondrien, denn es verhielt sich genauso wie Tim13, das wiederum als Kontrolle für lösliche IMR-Proteine diente. Tim13 wurde durch die äußere Mitochondrienmembran vor dem PK-Abbau geschützt und das Signal verschwand, als diese Membran durch hypotones Medium zum Platzen gebracht wurde. Der ATP/ADP-Translokator (AAC) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und sein Signal ähnelte bei vielen Versuchsbedingungen dem von Hep1, das sich in der mitochondrialen Matrix befindet, mit der Ausnahme,

dass ein Teil der AAC bei Zerstörung der AM von der PK verdaut wurde (Abb. 3.2 B, +MP, +PK). Dies deutet daraufhin, dass bei diesem Versuch eine Intaktheit der mitochondrialen Matrix und inneren Membran unter allen Bedingungen gegeben war. Tom70, ein Protein der Außenmembran, wurde jedoch durch die Proteinase K (PK) abgebaut, was die Wirkung der PK bewies. Es kann also zusammenfassend gesagt werden, dass sich eine Fraktion von endogener Sod1, wenn auch in geringerer Menge, trotz Abwesenheit von Ccs1 im Intermembranraum von Hefemitochondrien befindet.

### **3.1.2 Die mitochondriale Lokalisation endogener Sod1 in $\Delta ccs1$ -Zellen ist von Mia40 abhängig**

Wie bereits gezeigt wurde, spielt das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem der Mitochondrien eine bedeutende Rolle in der Biogenese der mitochondrialen Fraktionen von Ccs1 und Sod1 (Reddehase et al., 2009). Um herauszufinden, ob Mia40 auch in Abwesenheit von Ccs1 den mitochondrialen Import von Sod1 vermittelt, wurden Proteinmengen von Sod1 in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen analysiert, in denen die Proteinmenge von Mia 40 mit Hilfe eines GAL-Promotors reguliert wurde. So konnte durch die eingesetzte Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums eine Überexpression von Mia40 (unter Verwendung von Galaktose, Mia40  $\uparrow$ ) oder eine Depletion von Mia40 (unter Verwendung von Glukose, Mia40  $\downarrow$ ) bewirkt werden. Die Überexpression und Depletion von Mia40 waren deutlich in Mitochondrien zu sehen, die aus diesen Zellen isoliert worden waren (für die Überexpression Abb. 3.3 A und für die Depletion Abb. 3.3 B).



**Abb. 3.3: Die mitochondriale Biogenese von Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Zellen ist abhängig von Mia40.** Hefezellen mit fehlendem chromosomalen CCS1 und einem MIA40-Gen, das durch einen GAL-Promotor in der Expression regulierbar ist, wurden verwendet, um die Proteinmengen von Mia40 zu beeinflussen. Dazu wurde 0,1 % galaktose- (A) bzw. 0,1 % glukosehaltiges Laktat-Medium eingesetzt, damit die Expression von Mia40 erhöht (A) bzw. gehemmt (B) wurde. Zunächst wurden beide Fraktionen über mehrere Tage bei 30 °C in galaktosehaltigem Medium kultiviert und im Falle einer Reprimierung des Mia40-Gens anschließend für 16h in glukosehaltiges Medium transferiert. Als Kontrolle wurden simultan die dazugehörigen WT-Stämme unter denselben Bedingungen herangezogen. Aus diesen diversen Hefezellen wurden schließlich Mitochondrien isoliert und in einer Menge von 25 und 50  $\mu$ g mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immunodekoriert.

Mitochondrien mit erhöhten Proteinmengen von Mia40 enthielten trotz Fehlen von Ccs1 eine erhöhte Menge an Sod1 (Abb. 3.3 A), wohingegen die Proteinmengen anderer mitochondrialer Proteine wie das Matrixprotein Aconitase oder Tim44, welches auf der Matrixseite der Innenmembran anheftet, unverändert blieben. Dagegen wiesen Mitochondrien aus Zellen, in denen die Expression von Mia40 gehemmt wurde, reduzierte Mengen an mitochondrialer Sod1 auf (Abb. 3.3 B). Auch Tim13, das bekannter Weise Mia40 abhängig importiert wird, zeigte diesen Effekt. Die Quantität anderer Proteine, wie Tim44, die unabhängig von Mia40 in Mitochondrien importiert werden, war dagegen unverändert. Daraus lässt sich zusammenfassend schließen, dass endogene Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 über einen Mia40-abhängigen Weg in den IMR von Mitochondrien importiert wird.

## 3.2 Redoxzustand von Sod1 in Mitochondrien von $\Delta ccs1$ -Zellen

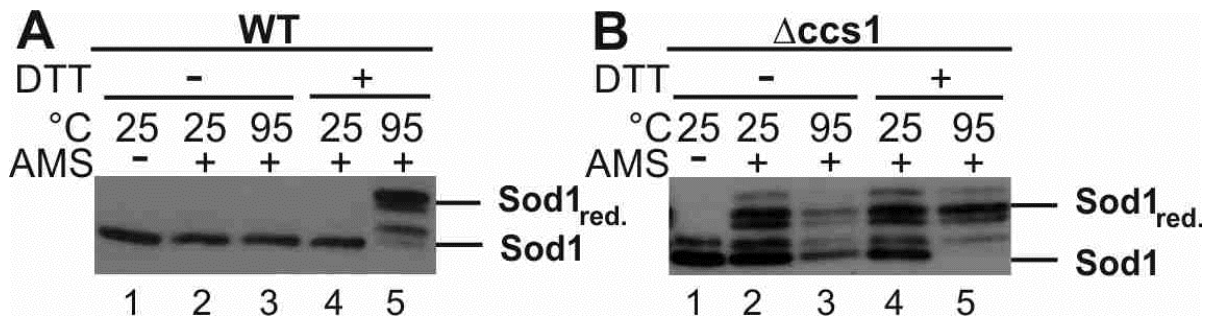
### 3.2.1 Eine Fraktion von Sod1 liegt im Intermembranraum von $\Delta ccs1$ -Mitochondrien in reduzierter Form vor

Culotta et al. (1997) zeigten, dass Ccs1 die Ausbildung einer Disulfidbrücke in Sod1 vermittelt. Um zu testen, ob eine Disulfidbrücke in Sod1 von Mitochondrien ohne die Anwesenheit von Ccs1 gebildet werden kann, wurden Experimente mit AMS (4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2-disulfonsäure) durchgeführt. AMS bindet an freie Thiol-Gruppen und vergrößert damit das entsprechende Protein um 500 Da. Durch die daraufhin sichtbare Veränderung der Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE kann auf die Anzahl der freien Thiol-Reste und somit auch auf die Anwesenheit von Disulfidbrücken in einem Protein geschlossen werden (siehe Abschnitt 2.7.5.1). Mitochondrien, isoliert aus einem Hefe-Wildtyp- und aus einem  $\Delta ccs1$ -Stamm, wurden in 20 mM Hepes (pH 7,4) mit oder ohne DTT bei 25 oder 95 °C für 10 min inkubiert. Darauf folgte eine Proteinfällung mit 72% TCA. Das Pellet wurde in SDS-Puffer resuspendiert und ein Teil der Proben mit AMS inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und eine Immundekoration mit Antikörper gegen Hefe-Sod1 analysiert.

Dabei zeigte sich eine verlangsamte Laufgeschwindigkeit bei den Wildtyp-Mitochondrien bei einem Zusatz von DTT und AMS bei 95 °C (Spalte 5, Abb. 3.4 A), wodurch sich schließen ließ, dass sich die Disulfidbrücke von Sod1 erst bei harschen Bedingungen öffnete und die damit frei gewordenen Thiol-Reste von AMS modifiziert werden konnten. Dagegen zeigte sich in Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 ein anderes Laufverhalten (Abb. 3.4 B). Schon unter nicht reduzierenden Bedingungen, wie in Spalte 2 (Abb. 3.4 B) zeigte sich für Sod1 eine Doppelbande, deren Laufgeschwindigkeit sich auch nicht nach Zugabe von DTT oder bei einer Inkubation mit 95 °C änderte (Spalte 5, Abb. 3.4 B). Dies deutete daraufhin, dass ein signifikanter Teil der mitochondrialen Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 keine stabile Disulfidbrücke ausbilden konnte.

Jedoch zeigte sich bei 25 °C und ohne Zugabe von DTT (Spalte 2) ein Teil der Sod1, der nicht durch AMS modifiziert worden war (untere Bande). Dies ließ darauf schließen, dass die Sod1 auch in Abwesenheit von Ccs1 oxidierte Thiol-Gruppen in Form einer Disulfidbrücke besaß, die unter nicht denaturierenden Bedingungen

nicht für das AMS zugänglich war und sich erst nach Hitzedenaturierung öffnete (Spalte 5).



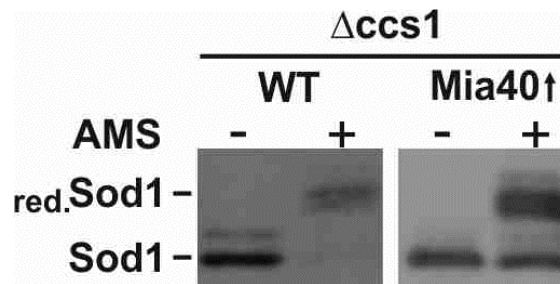
**Abb. 3.4: Eine Fraktion von Cu/Zn- Superoxid-Dismutase 1 liegt im Intermembranraum von  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien in reduzierter Form vor.** 100  $\mu$ g isolierte Mitochondrien des Wildtyp- (A) und des  $\Delta ccs1$ -Hefestammes (B) wurden mit bzw. ohne 20 mM DTT und 20 mM Hepes für 10 min entweder bei 25 oder 95 °C inkubiert. Danach erfolgte eine TCA-Fällung und das daraufhin entstandene Proteinpellet wurde in SDS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 30 min im Dunkeln bei 37 °C mit oder ohne AMS (10 mM) inkubiert. Anschließend wurde 20mM DTT und 50 mM IAA sowie Laemmli-Puffer hinzugefügt. Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE erfolgte eine Immunodekoration mit Antikörpern gegen Sod1. red.: reduziert

Somit lässt sich schließen, dass Sod1 in WT-Mitochondrien eine stabile Disulfidbrücke ausbildet und vollständig in dieser oxidierten Form präsent ist, wohingegen ein signifikanter Anteil der Sod1 in Mitochondrien, bei denen Ccs1 fehlt, in reduzierter Form ohne Disulfidbrücke vorliegt.

### 3.2.2 Überexpression von Mia40 führt zu einem höheren Anteil von Sod1-Proteinen mit Disulfidbrücke in $\Delta ccs1$ -Mitochondrien

Wie schon in Abschnitt 3.1.2 erläutert wurde, ist die mitochondriale Biogenese von Sod1 in Hefezellen in Abwesenheit von Ccs1 von Mia40 abhängig. Um die Frage zu klären, ob Mia40 auch einen Einfluss auf die Disulfidbrücken-Ausbildung von Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Hefezellen hat, wurden AMS-Experimente mit isolierten Mitochondrien aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen mit und ohne Überexpression von Mia40 durchgeführt. Diese wurden zunächst mit 20 mM Hepes (pH 7,4) versetzt und für 10 min bei 25 °C

inkubiert. Anschließend erfolgte eine Proteinfällung mit 72% TCA. Nach Waschen des Proteinpellets mit Aceton wurde dieses in SDS-Puffer resuspendiert und bei einem Teil der Proben AMS hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C in Dunkelheit wurden Laemmli-Puffer, 20 mM DTT und 50 mM IAA ergänzt und die Proben anschließend durch eine SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Hefe-Sod1 analysiert.



**Abb. 3.5: Erhöhte Mengen von Mia40 führen zu einem höheren Anteil von Sod1-Molekülen mit Disulfidbrücke in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien.** Isolierte Mitochondrien aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen mit und ohne Überexpression von Mia40 wurden mit 20 mM HEPES (pH 7,4) versetzt und bei 25 °C für 10 min inkubiert. Nach einer Proteinfällung mit TCA wurde das Proteinpellet in SDS-Puffer resuspendiert und 30 mM AMS hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert. Danach wurden Laemmli-Puffer, 20 mM DTT und 50 mM IAA ergänzt. Die Analyse erfolgte schließlich mittels SDS-PAGE und durch Immunodekoration mit einem Antikörper gegen Hefe-Sod1 (unterschiedliche Expositionen). red.: reduziert

Der Anteil von Sod1-Molekülen mit Disulfidbrücken-Bildung ist bei Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 vermindert, was zu einer Verstärkung der reduzierten Fraktion führt (Abb. 3.5, zweite Spalte, AMS +, obere Bande). Wird allerdings Mia40 in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien überexprimiert, erhöht sich der Anteil der Sod1-Moleküle mit Disulfidbrücke erneut und führt somit dazu, dass eine verminderte Fraktion von AMS an freie Thiol-Reste binden und zu einem verlangsamten Laufverhalten führen kann. Dies wird in der rechten Spalte (Abb. 3.5, AMS +) durch eine stärkere Intensität der unteren Bande im Vergleich zu der Intensität der gleichen Bande in der mittleren Spalte und in Relation zu der oberen Bande in der gleichen Spalte sichtbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einer Überexpression von Mia40 ein höherer Anteil von Sod1-Molekülen mit Disulfidbrücke in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien vorliegt, im Vergleich zu Mitochondrien mit normalem Mia40-Level.

### **3.3 Enzymaktivität von Sod1 in Mitochondrien**

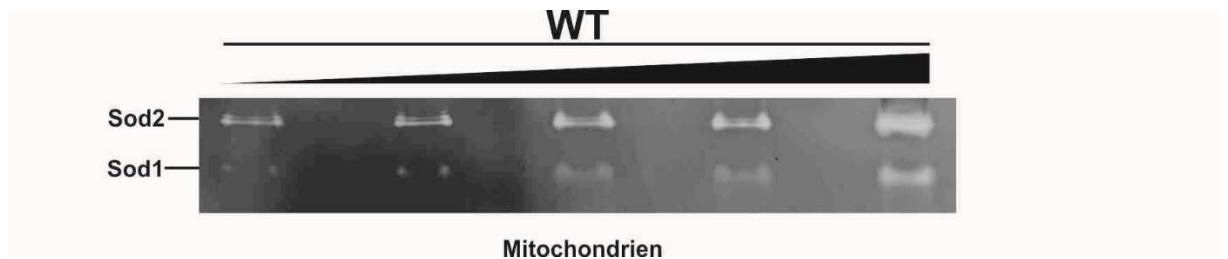
Da Ccs1 offensichtlich eine Rolle für den Transport und den Redoxzustand von Sod1 in Mitochondrien spielt, sollte getestet werden, ob Unterschiede in der enzymatischen Aktivität von Sod1 in Mitochondrien bestehen, die von Wildtyp-Hefezellen, Hefezellen mit Cystein-zu-Serin -Varianten von Ccs1 und  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert wurden. Hierbei beschreibt der Begriff „Sod1-Aktivierung“ die Umwandlung von der inaktiven in die enzymatisch aktive Form.

#### **3.3.1 Die im Aktivitäts-Test gemessene Aktivität von Sod1 ist abhängig von der verwendeten mitochondrialen Proteinmenge**

Nach der Modifizierung eines Sod1-Aktivitäts-Tests in Hefe-Mitochondrien (siehe Abschnitt 2.7.6) stellte sich die Frage, ob mit dem Aktivitäts-Test Unterschiede in den Sod1-Aktivitäten von Proben gemessen werden können. Je höher die eingesetzte mitochondriale Proteinmenge ist, desto mehr Sod1 wird im Test eingesetzt und desto stärker sollte die Intensität durch die Sod1-Aktivität erzeugte Bande in dem nativen PA-Gel sein. Um dies zu testen, wurden wie in Abschnitt 2.8.1.4 Mitochondrien aus YPH499-Wildtyp Hefezellen isoliert und, wie in Abschnitt 2.7.6 beschrieben, ein Sod1-Aktivitäts-Test mit zunehmenden Mengen an Wildtyp-Mitochondrien durchgeführt.

Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, nahm die Intensität der Banden, die für die Aktivität von Sod1 in diesen Mitochondrien stand, mit der Steigerung der mitochondrialen Proteinmengen zu.





**Abb. 3.6: Die im Sod1-Aktivitäts-Test gemessene Aktivität von Sod1 ist abhängig von der verwendeten mitochondrialen Proteinmenge.** Hefe-Mitochondrien wurden aus YPH499 Wildtyp (WT)-Zellen isoliert und zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand wurde mit Laemmli-Puffer ohne SDS gemischt. Die von links nach rechts ansteigenden Proteinmengen (von 12,5 µg bis 200 µg) wurden auf ein 16% natives PA-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit nativer PA-Gel-Färbelösung für 45 min in Dunkelheit gefärbt und für 5 min durch künstliches UV-Licht entwickelt. Die Aktivität von Sod2 (obere Reihe) war in allen Mitochondrien nachzuweisen und diente somit als Kontrolle für die geladene Proteinmenge und für die Funktionalität des Tests.

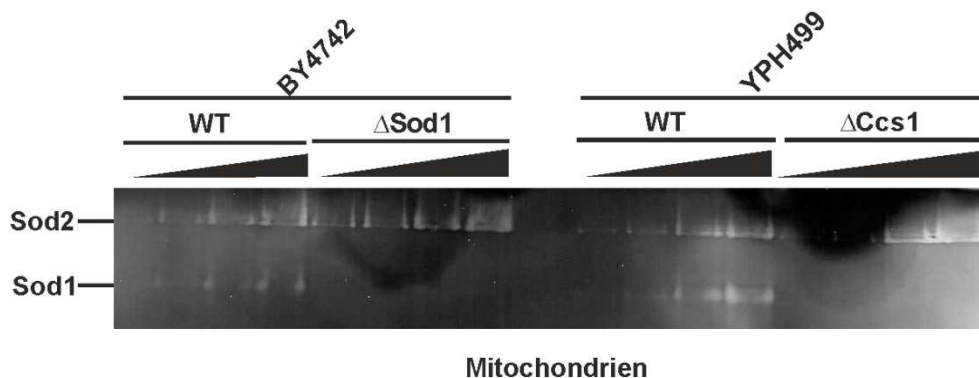
Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Aktivität von Sod1 in Mitochondrien von der verwendeten Proteinmenge abhängig war. Das Ergebnis bestätigt somit, dass mit dem verwendeten Test in dem verwendeten Proteinbereich die Sod1-Aktivität von Proben qualitativ miteinander verglichen werden können. Der Vergleich der Intensität der Banden für verschiedene Proben erlaubt also eine Aussage über die relative Sod1-Aktivität in diesen Proben zueinander.

### 3.3.2 Mitochondrien von $\Delta ccs1$ -Zellen zeigen keine Sod1-Aktivität

Wie bereits 1997 von Culotta et al. gezeigt wurde, ist in Zellen, in denen Ccs1 depletiert wurde, die Aktivität von Sod1 in Zellextrakten nicht nachweisbar. Da sich auch in Abwesenheit von Ccs1 Sod1 im IMR von Mitochondrien befindet, wie im Abschnitt 3.1.1. gezeigt wurde, sollte als nächste Fragestellung untersucht werden, ob Sod1 in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Hefezellen enzymatisch aktiv ist. Da im Vergleich zur zytosolischen Fraktion nur geringe Mengen an Sod1 im mitochondrialen IMR lokalisiert sind, könnte deren Aktivität in Zellextrakten möglicherweise unter der Nachweisgrenze liegen und nicht detektiert werden.

Um diese Frage trotzdem eindeutig zu beantworten, wurden Mitochondrien aus  $\Delta sod1$ -Hefezellen und aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen, sowie die entsprechenden Wildtyp-Zellen (BY4742 und YPH499) isoliert (Abschnitt 2.8.1.4). Dann wurde wie in Abschnitt 2.7.6. der Sod1-Aktivitäts-Test durchgeführt.

Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, wurde in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien keine Sod1-Aktivität gemessen, genauso wie auch in den  $\Delta sod1$ -Mitochondrien, in denen keine Aktivität zu erwarten war und die als Kontrolle eingesetzt wurden. Dagegen war in den zugehörigen Wildtyp-Mitochondrien der BY4742 bzw. YPH499-Stämme Sod1-Aktivität zu beobachten, und zwar umso mehr, je mehr mitochondriales Protein geladen wurde.



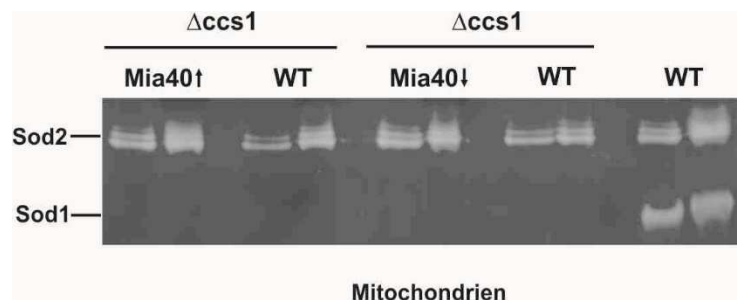
**Abb. 3.7 Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen zeigen keine Sod1-Aktivität.** Mitochondrien wurden jeweils aus BY4742 WT- und  $\Delta sod1$ -Hefezellen sowie aus YPH499 WT- und  $\Delta ccs1$ -Zellen isoliert und zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert und die Proben nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erneut zentrifugiert. Dem Überstand wurde Laemmli-Puffer ohne SDS beigegeben und ansteigende Proteinmengen auf ein 16% natives PA-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Schluss wurde das Gel mit nativer PA-Gel-Färbelösung für 45 min in Dunkelheit gefärbt und für 5 min mit UV-Licht entwickelt.

Demzufolge war eine enzymatische Aktivität von Sod1 sowohl in der zytosolischen Fraktion, als auch in Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 nicht detektierbar.

### 3.3.3 Erhöhte Mengen von Mia40 in Mitochondrien führen nicht zur Aktivierung von Sod1 in Mitochondrien von $\Delta ccs1$ -Zellen

Die mitochondriale Lokalisation endogener Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Zellen ist von Mia40 abhängig (Abschnitt 3.1.2). Demgemäß erhöhte sich die Menge mitochondrialer Sod1 in Abwesenheit von Ccs1, wenn Mia40 überexprimiert wurde (Abb. 3.3 A) und sie verringerte sich entsprechend, wenn Mia40 herunterreguliert wurde (Abb. 3.3 B). Zusätzlich fehlt die Aktivität mitochondrialer Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 (Abschnitt 3.3.2 und Abb. 3.7). Als nächste Fragestellung sollte in dieser Arbeit beantwortet werden, ob die Überexpression von Mia40 in Mitochondrien, in denen Ccs1 fehlt, zur Aktivierung von Sod1 führen könnte.

Zunächst wurden Mitochondrien aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert, die einen galaktose-induzierbarem Promotor vor dem *MIA40*-Gen aufwiesen. Ebenso wurden Mitochondrien aus Wildtyp- und  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert und davon jeweils 200 bzw. 300  $\mu$ g für einen Sod1-Aktivitäts-Test verwendet (Abschnitt 2.7.6).



**Abb. 3.8: Sod1-Aktivität ist nicht detektierbar in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Hefezellen, in denen Mia40 überexprimiert oder reprimiert wurde.** Mitochondrien wurden jeweils aus WT- und  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert, bei denen Mia40 über einen GAL-Promotor entsprechend überexprimiert ( $Mia40^{\uparrow}$ ) oder reprimiert wurde ( $Mia40^{\downarrow}$ ). Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm wurde das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert und nach 30 min auf Eis erneut für 20 min bei 4 °C und 45000 zentrifugiert. Anschließend wurde dem Überstand Laemmli-Puffer ohne SDS hinzugefügt und jeweils 200 bzw. 300  $\mu$ g Proteinmenge auf ein 16% natives PA-Gel aufgetragen, sowie elektrophoretisch aufgetrennt. Schließlich wurde das Gel nach 45 min Inkubation in der nativer PA-Gel-Färbelösung und Dunkelheit für 5 min durch künstliches UV-Licht entwickelt.

Die Aktivität von Sod2 (obere Reihe, Abb. 3.8) war in allen Mitochondrien unabhängig von Ccs1 und Mia40 nachzuweisen und diente somit als Kontrolle für die geladene Proteinmenge und für die Funktionalität des Tests. Dagegen war Sod1 nur in den Wildtyp-Mitochondrien aktiv, bei denen Ccs1 ebenfalls vorhanden war (Spalte außen rechts, Abb. 3.8). In Abwesenheit von Ccs1 konnte keine Aktivität mitochondrialer Sod1 nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob Mia40 hoch- oder herunterreguliert wurde (Mia40<sup>↑</sup> oder Mia40<sup>↓</sup>, Abb. 3.8).

Somit führen auch erhöhte Mengen von Mia40 nicht zu einer Aktivierung von Sod1 in Mitochondrien, in denen Ccs1 nicht vorhanden ist.

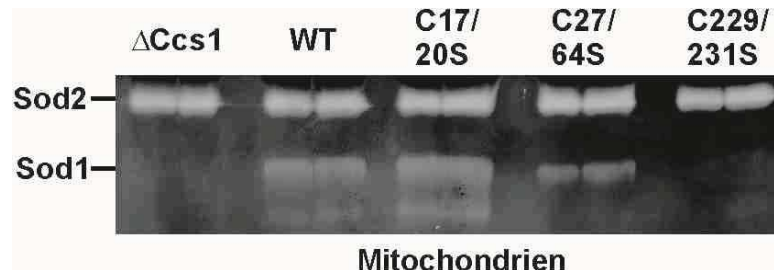
### **3.3.4 Die Bildung von enzymatisch aktiver Sod1 durch Ccs1 ist von bestimmten Cysteinresten in Ccs1 abhängig**

3.3.4.1 Die Sod1-Aktivität in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Variante ist vermindert

Ccs1 wird also auch in Mitochondrien für die Überführung von Sod1 in seine enzymatisch aktive Form benötigt. Die aktivierte Form von Sod1 enthält ein Kupferatom und eine Disulfidbrücke. Es stellte sich die Frage, ob und welche Cystein-Reste von Ccs1 eine Rolle für die Aktivität der Sod1 in Mitochondrien spielen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Cystein-zu-Serin-Varianten in ein Plasmid unter dem endogenen Ccs1-Promotor in einem  $\Delta ccs1$ -Hefestamm exprimiert (Gross et al., 2011) und Mitochondrien aus Hefezellen mit WT-Ccs1 und Cystein-zu-Serin Varianten von Ccs1 und aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen isoliert. Mit diesen Proben wurde dann ein Sod1-Aktivitäts-Test nach Abschnitt 2.7.6 durchgeführt. Die Aktivität von Sod2 wurde wiederum als Positivkontrolle für die Funktionalität angewendet und war, wie zu erwarten, in allen Mitochondrien ähnlich hoch (obere Reihe, Abb. 3.9). Die Sod1-Aktivität fehlte, wie schon in den vorangegangenen Experimenten beobachtet, in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien (Abb. 3.7 und Abb. 3.8), aber auch in der C229/231S-Ccs1 Mutante, was die Bedeutung dieser Cystein-Reste für die Aktivierung von Sod1 bestätigte (Spalte rechts außen, Abb. 3.9). Aus Untersuchungen mit Zellextrakten ist bereits bekannt, dass dieses CxC-Motiv essentiell für die Sod1-Aktivierung im Zytosol ist (Lamb et al., 2001, Schmidt et al., 1999). Des Weiteren war eine verringerte Aktivität von Sod1 in der C27/64S-Ccs1

Mutante im Vergleich zum Ccs1-WT und zur C17/20S-Ccs1 Mutante erkennbar (Abb. 3.9)



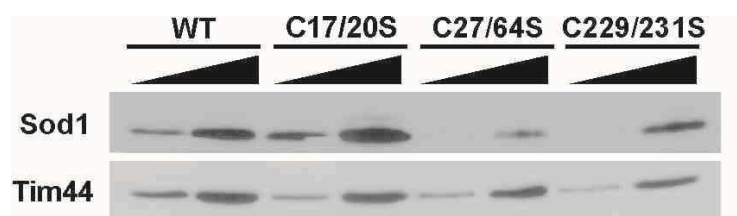
**Abb. 3.9 Die Sod1-Aktivität ist in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Varianten verringert.** Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert, die Wildtyp-Ccs1 oder Doppel-Cystein-zu-Serin Varianten von Ccs1 exprimierten, sowie aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 45000 rpm für 20 min wurden nicht aufgelöste Rückstände abgetrennt und der Überstand wurde mit Laemmli-Puffer ohne SDS gemischt. Die Proben wurden in einem 16 % natives PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für 45 min in Dunkelheit mit der nativen PA-Gel-Färbelösung gefärbt. Schließlich wurde das Gel für 5 min durch künstliches UV-Licht entwickelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mitochondrien von Hefezellen, die unterschiedliche Mutationen von Ccs1 tragen, auch eine unterschiedliche Aktivität von mitochondrialer Sod1 aufweisen. So war in der C17/20S-Ccs1 Mutante eine vergleichbare Sod1-Aktivität wie in Ccs1-WT Mitochondrien zu messen und in der C229/231S-Ccs1 Mutante, ebenso wie in Mitochondrien ohne Ccs1, keine Sod1-Aktivität nachweisbar. Die C27/64S-Ccs1 Mutante nimmt eine Sonderstellung ein. Denn die Aktivität von mitochondrialer Sod1 in dieser Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp zwar deutlich verringert, aber vorhanden.

#### 3.3.4.2 Unterschiedliche Mengen von Sod1 in Mitochondrien von Zellen mit Ccs1-Varianten

Im vorherigen Abschnitt (3.3.4.1) wurde eine verminderte Enzym-Aktivität von Sod1 in Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Varianten beschrieben (Abb. 3.9). Der

Import von Sod1 in Mitochondrien wird durch Ccs1 vermittelt und könnte in der C27/64S-Ccs1 Mutante beeinträchtigt sein. Es stellte sich die Frage: Ist die verringerte Sod1-Aktivität in den Mitochondrien dieser Ccs1-Mutante auf eine verringerte Proteinmenge an mitochondrialer Sod1 zurückzuführen? Um dies zu klären, wurden Mitochondrien sowohl aus Hefezellen mit dem Ccs1-WT Protein, als auch aus Zellen mit den verschiedenen Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 isoliert. Die Proteinmengen von Sod1 wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunodekoration untersucht. Tim44 diente als Kontrolle für geladene Proteinmengen und war in allen Mitochondrien in jeweils gleicher Menge nachzuweisen (untere Reihe, Abb. 3.10).



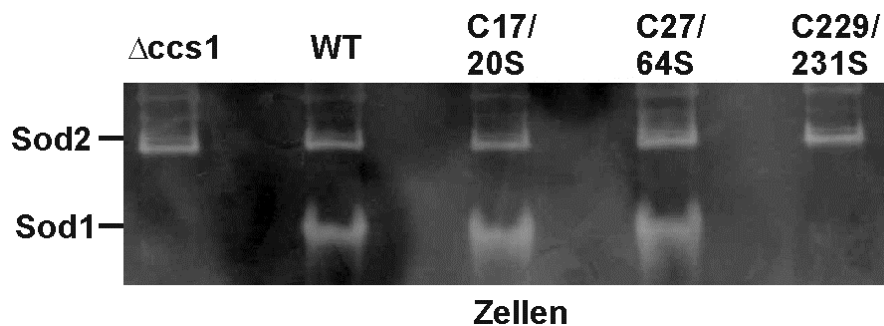
**Abb. 3.10 Mitochondriale Proteinmengen von Sod1 in den Ccs1-Mutanten**

Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert, die Ccs1-WT- und Doppel-Cystein Varianten von Ccs1 exprimierten. Davon wurden jeweils 12,5 und 25 µg auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

Die Mitochondrien der C17/20S-Ccs1 Mutante wiesen eine ähnliche Menge an Sod1 auf wie Wildtyp-Mitochondrien (Abb. 3.10). In den Mitochondrien der C229/231S-Ccs1 Mutanten wurde im Vergleich zu den Mitochondrien des Wildtyps weniger Sod1 detektiert, da diese Ccs1-Variante nicht die Holo-Form des Sod1 katalysieren kann (Field et al., 2003). Im Gegensatz dazu war die Proteinmenge mitochondrialer Sod1 in den C27/64S-Ccs1 Mutanten vermindert (obere Reihe, Abb. 3.10). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die verminderte Aktivität der Sod1 in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Mutante (siehe Abschnitt 3.3.4.1) auf eine geringere Menge an mitochondrialer Sod1 zurückzuführen ist.

3.3.4.3 Die Aktivität von Sod1 in Zellextrakten der Ccs1-Mutanten

Die Verringerung der mitochondrialen Sod1-Aktivität in der C27/64S-Ccs1 Mutante (Abb. 3.9) korreliert mit der verminderten Proteinmenge von mitochondrialer Sod1 in derselben Mutante (Abb. 3.10). Es ist allerdings auch möglich, dass die Cystein-Reste C27 und C64 in Ccs1 eine Rolle bei der Bildung der enzymatisch aktiven Sod1 spielen. Um dies auszuschließen, und um zu bestätigen, dass die verminderte Aktivität auf verringerte Proteinmengen mitochondrialer Sod1 in dieser Mutante zurückzuführen ist, wurden Zellextrakte mit Ccs1-WT und den Ccs1-Varianten angefertigt (nach Abschnitt 2.8.1.3). Anschließend wurde mit diesen Extrakten der Sod1-Aktivitäts-Test nach Abschnitt 2.7.6 durchgeführt.



**Abb. 3.11 Sod1-Aktivität in ganzen Zellen mit Ccs1-WT und verschiedenen Ccs1-Varianten.** Hefezellen wurden kultiviert, die entweder kein, WT-Ccs1 oder verschiedene Cystein-zu-Serin-Doppelvarianten von Ccs1 exprimierten. Dann wurde Gesamtzellprotein gewonnen. Dieses wurde mit Laemmli-Puffer ohne SDS vermischt und auf einem nativen PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Schluss wurde das Gel mit nativer PA-Gel-Färbelösung für 45 min in Dunkelheit gefärbt und durch UV-Licht 5 min lang entwickelt.

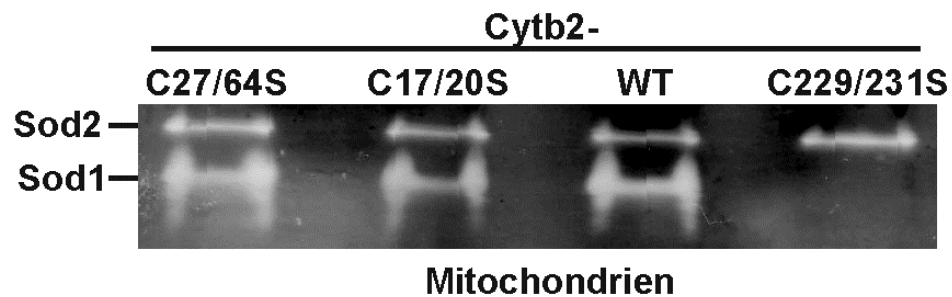
In der Tat wurden vergleichbare Sod1-Aktivitäten sowohl in den Zellen mit WT-Ccs1 und der C17/20S-Ccs1 Variante, als auch mit der C27/64S-Ccs1 Variante gefunden (Abb. 3.11). Hingegen wiesen die Zellextrakte der C229/231S-Ccs1 Mutante und in  $\Delta ccs1$ -Zellen keine Aktivität von Sod1 auf. Die Aktivität von Sod2 diente wiederum als Positivkontrolle für die Funktionalität des Tests und dass gleiche Proteinmengen in allen Spuren geladen wurden und war in allen Zellextrakten in vergleichbarer Intensität nachweisbar.

Demzufolge konnte bestätigt werden, dass die Cysteinreste C229 und C231 von Ccs1 für die Überführung von Sod1 in die enzymatisch aktive Form in der Zelle nötig sind. Dagegen waren die Cysteinreste C27 und C64 von Ccs1 für die Aktivierung von Sod1 in der Zelle nicht notwendig. In Zusammenschau mit den bisherigen Ergebnissen lässt dies vermuten, dass die spezifische Aktivität von Sod1 in Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Mutante gleich der in Wildtyp-Mitochondrien ist. Das heißt, dass die enzymatische Aktivität pro Sod1-Protein gleich groß ist, sich aber weniger Sod1-Proteine im mitochondrialen IMR der C27/64S-Ccs1 Mutanten befindet und deshalb die gemessene Sod1-Aktivität pro mitochondrialer Proteinmenge kleiner ist.

#### 3.3.4.4 Die Sod1-Aktivität in Mitochondrien aus Zellen, die mitochondrial lokalisierte Ccs1-Varianten-Fusionsproteine exprimieren

Die verminderte Menge an Sod1-Protein in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Mutante erklärte die geringere Aktivität von Sod1 in diesen Mitochondrien (siehe Abschnitt 3.3.4.2). Wie die erzielten Ergebnisse zeigten, war die C27/64S-Ccs1 Variante in der Lage, Sod1 in der Zelle in die enzymatisch aktive Form zu überführen (Abb. 3.11). Die bisherigen Ergebnisse schlossen aber nicht vollständig aus, dass die Aktivierung von Sod1 spezifisch in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Mutanten beeinträchtigt war. Um dies zweifelsfrei auszuschließen, wurden Konstrukte verwendet, die Cystein-zu-Serin-Ccs1 Varianten mit einer Cytochrom *b*<sub>2</sub>-Präsequenz (AS 1-88) kodieren. Diese Präsequenz am N-Terminus leitet das Protein gezielt in den IMR von Mitochondrien und wird anschließend proteolytisch entfernt (Glick et al., 1992) (Abschnitt 1.2.4). Somit wird erreicht, dass sich gleiche Mengen der Ccs1-Varianten in den Mitochondrien befinden (Dissertation Dominik Groß ,2013). Aus Hefezellen, die diese Ccs1-Konstrukte exprimierten, wurden zunächst Mitochondrien isoliert und anschließend der Sod1-Aktivitäts-Test durchgeführt.





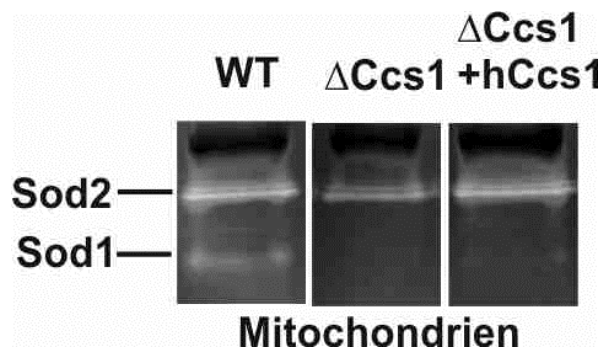
**Abb. 3.12 Die Sod1-Aktivität in Mitochondrien aus Zellen mit mitochondrial lokalisierten Ccs1-Fusionsproteinen.** Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert, die Ccs1-Varianten mit einer Cytochrom *b*<sub>2</sub>-Präsequenz (Cytb2) exprimierten. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C wurde das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert und erneut bei 4 °C und 45000 rpm für 20 min zentrifugiert. Dem Überstand der Proben wurde Laemmli-Puffer ohne SDS hinzugefügt. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung mit einem 16 % nativem PA-Gel bei 4 °C. Anschließend wurde das Gel mit nativem PA-Gel-Färbelösung für 45 min und Dunkelheit eingefärbt und schließlich durch UV-Licht für 5 min entwickelt.

Es ergab sich eine vergleichbare Sod1-Aktivität in den Mitochondrien von Zellen, in denen die Cytochrom *b*<sub>2</sub>-Fusionsproteine von WT-Ccs1 und der C17/20S- und der C27/64S-Ccs1 Variante exprimiert wurden (Abb. 3.12). Dagegen zeigte sich in Mitochondrien von Zellen, welche die Cytochrom *b*<sub>2</sub>-C229/231S-Ccs1 Variante exprimierten, keine nachweisbare Sod1-Aktivität. Die Aktivität von Sod2 diente als Positivkontrolle für die Funktionalität des Aktivitäts-Tests und war in allen Mitochondrien erkennbar.

Es lässt sich folglich schließen, dass die Cysteinreste C229 und C231 von Ccs1 auch in Mitochondrien für die Überführung von Sod1 in die enzymatisch aktive Form benötigt wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Mitochondrien die Cysteinreste C27 und C64 von Ccs1 nicht für die Aktivierung von Sod1 notwendig waren. Die Sod1-Gesamtaktivität in den Mitochondrien der Cytochrom *b*<sub>2</sub>-C27/64S-Ccs1 Mutanten war vergleichbar groß mit der Sod1-Aktivität in den Mitochondrien der Cytochrom *b*<sub>2</sub>-WT, und der -C17/20S-Ccs1 Mutanten, da sich gleiche Proteinmengen an Sod1 in dem IMR der Mitochondrien befanden. Zusammenfassend mit den vorherigen Ergebnissen kann gesagt werden, dass die spezifische Aktivität von Sod1 in den Mitochondrien dieser Ccs1-Mutanten gleich ist und die im Abschnitt 3.3.4.1 beschriebene verminderte Sod1-Aktivität in der C27/64S-Ccs1 Mutante im Vergleich zu den Mitochondrien des Wildtyps durch die verringerte mitochondriale Proteinmenge von Sod1 bedingt war.

### 3.3.5 Rescue der Sod1-Aktivität in Mitochondrien aus $\Delta ccs1$ -Hefezellen durch humanes CCS1

Es ist bereits bekannt, dass Sod1 in *S.cerevisiae* von Ccs1 in die aktive Form überführt wird und somit die Sod1-Aktivität in Zellen ohne Ccs1 ( $\Delta ccs1$ ) nicht nachweisbar ist (Culotta et al., 1997). Dies gilt ebenso in Hefe-Mitochondrien, in denen endogenes Hefe-Ccs1 fehlt (Abb. 3.7, Abschnitt 3.3.2). Weiterhin ist beschrieben, dass Ccs1 in *H.sapiens* (hCCS1 oder CCS) ebenfalls ein Substrat des Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-Systems ist und ein Teil der humanen SOD1 über hCCS1 aktiviert wird (Kawamata and Manfredi, 2008). Kann hCCS1, das in Hefe-Zellen exprimiert wird, ebenso Hefe-Sod1 in Mitochondrien aktivieren und somit die Aufgabe von Hefe-Ccs1 übernehmen? Um dies zu überprüfen, wurden Mitochondrien aus Hefe-Zellen isoliert, die WT-Ccs1, kein Ccs1 oder nur humanes CCS1 (hCCS1) exprimierten. Als nächster Schritt wurden die Proben mit SH-KCl-Puffer gewaschen. Dann erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min und 14000 rpm bei 4 °C. Schließlich wurde der Sod1-Aktivitäts-Test durchgeführt.



**Abb. 3.13 Die Sod1-Aktivität in  $\Delta Ccs1$ -Mitochondrien mit humanem CCS1 (hCCS1)**

Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert, die WT-Ccs1, kein Ccs1 oder humanes CCS1 exprimierten. Dann wurden die Proben mit SH-KCl-Puffer gewaschen und für 10 min und 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, sowie anschließend das Pellet in Digitonin-Puffer resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (20 min, 45000 rpm, 4 °C) wurde der daraus entstandene Überstand mit Laemmli-Puffer ohne SDS gemischt und die Proben durch ein 16 % natives PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit nativer PA-Gel-Färbelösung für 45 min in Dunkelheit gefärbt und für 5 min durch UV-Licht entwickelt.

Wie bereits aus vorangegangenen Experimenten bekannt (Abb. 3.7 bis 3.9 und Abb. 3.11), war die Aktivität von Sod1 in Mitochondrien mit Ccs1 sichtbar, in Mitochondrien ohne Ccs1 jedoch nicht nachweisbar (Abb. 3.13, links und mittig). Überraschenderweise, konnte auch eine Sod1-Aktivität in den Mitochondrien ohne endogenes Ccs1 aber mit hCCS1 detektiert werden, wenn auch in einer abgeschwächten Form im Vergleich zu der mit WT-Ccs1 (Abb. 3.13, rechts). Die Sod2-Aktivität diente als Positivkontrolle für die Funktionalität des Aktivitätstests und war, wie zu erwarten, in allen Mitochondrien nachweisbar.

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass hCCS1 mitochondriale Hefe-Sod1 in Abwesenheit von endogener Ccs1 aktivieren kann, wenn auch in einem geringeren Maße im Vergleich zu WT-Ccs1.

### **3.4 Lokalisation humaner SOD1 in Mitochondrien von Hefe-Zellen**

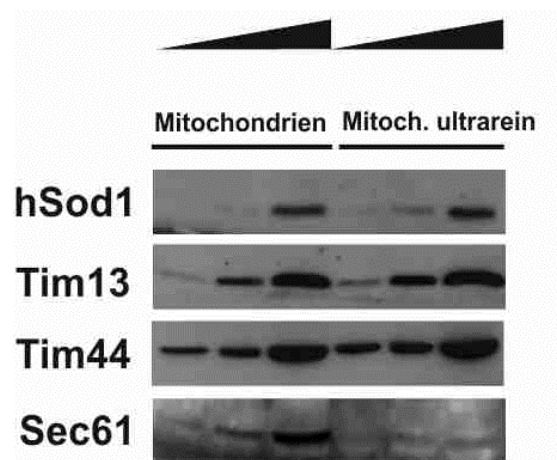
#### **3.4.1 Humane SOD1 ist in ultra-reinen Hefe-Mitochondrien lokalisiert**

Der Modellorganismus *S.cerevisiae* soll genutzt werden, um die mitochondriale Biogenese von humanem SOD1 zu charakterisieren. Dies setzt voraus, dass sich humanes SOD1 nach Expression in Hefe teilweise auch in Mitochondrien befindet. Um dies zu klären, wurden Mitochondrien aus YPH 499 WT Hefe-Zellen isoliert, die hSOD1 exprimierten. Dann wurde ein Teil davon mit Laemmli-Puffer gemischt und auf ein SDS-PA-Gel geladen. Die andere Fraktion wurde mittels Saccharose-Gradienten weiter aufgereinigt (Abschnitt 2.8.1.5). Somit wurden Verunreinigungen der mitochondrialen Fraktion, wie Teile des Zytoskeletts und andere Zellorganellen, entfernt. Diese ultra-reinen Mitochondrien wurden dann ebenso mit Laemmli-Puffer versetzt und es erfolgte eine weitere Analyse durch SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen die genannten Proteine.

Die Signalintensität der humanen SOD1 (hSOD1) und damit die Menge an hSOD1, die sich in den WT Hefe-Mitochondrien befand, blieb sowohl vor dem Gradienten (Mitochondrien), als auch nach der Aufreinigung (Mitochondrien ultrarein) annähernd konstant (Abb. 3.14). Ähnlich wie hSOD1 verhielten sich die mitochondrialen Proteine Tim13, welches sich im IMR, und Tim44, welches sich in

der mitochondrialen Matrix befand, und als Kontrolle dienten. Sec61 ist ein Protein-Translokator in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und fungierte als Markerprotein für das ER. Vor der Aufreinigung war dieses Protein in einem stärkeren Maße vorhanden als danach, was für eine erfolgreiche Beseitigung von unerwünschten Zellorganellen sprach.

Zusammenfassend kann daraus abgeleitet werden, dass sich eine Fraktion von hSOD1 nach Expression in Hefezellen in deren Mitochondrien befindet.



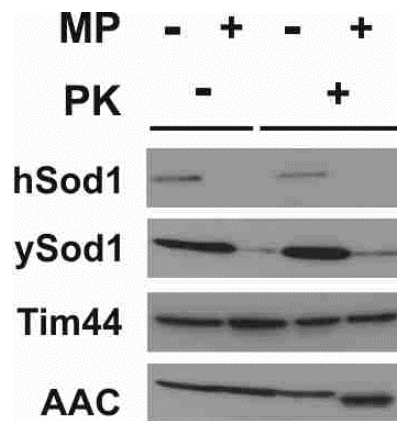
**Abb. 3.14: Humane SOD1 (hSOD1) befindet sich in ultrareinen Hefe-Mitochondrien.** Mitochondrien aus WT Hefe-Zellen, die hSOD1 exprimierten, wurden isoliert, mit Laemmli-Puffer gemischt und in aufsteigender Proteinmenge von links nach rechts auf ein SDS-PAGE geladen (Mitochondrien). Ein weiterer Teil der Mitochondrien wurde mittels Saccharose-Gradienten weiter aufgereinigt, sodass ultrareine Mitochondrien entstanden, die wiederum mit Laemmli-Puffer gemischt wurden und mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert wurden (Mitoch. ultrarein).

### 3.4.2 Eine Fraktion humaner SOD1 ist im mitochondrialen IMR von WT-Hefe-Zellen lokalisiert

In dem vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass ein Teil der hSOD1 in Hefe-Mitochondrien lokalisiert ist (Abb. 3.14). Jedoch ist nicht klar, in welchem mitochondrialen Kompartiment sich die hSOD1 befindet. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde zunächst hSOD1 von einem Plasmid in WT Hefe-Zellen

exprimiert und aus diesen Zellen Mitochondrien isoliert. Ein Teil dieser Mitochondrien wurden in Mitoplasten (MP) verwandelt, das heißt, dass die äußere mitochondriale Membran durch Schwellen im hypotonen Medium zum Zerbersten gebracht wurde. Mitochondrien und Mitoplasten wurden mit oder ohne Proteinase K (PK) inkubiert. Bei der Inkubation mit PK wurden alle zugänglichen Proteine außerhalb der Mitochondrien und auch der Mitoplasten verdaut. Schließlich wurde die weitere Analyse mittels SDS-PAGE und Immundekoration durchgeführt.

Abbildung 3.15 zeigt, dass sich humane SOD1 trotz Abwesenheit von hCCS1 im IMR von Hefe-Mitochondrien befand. Denn hSOD1 verhielt sich ähnlich wie das endogene  $\gamma$ Sod1, von dem die Lokalisation im mitochondrialen IMR bereits bekannt ist. So wurde das Signal beider Proteine abgeschwächt, wenn die AM zerstört wurde, unabhängig davon, ob die Probe mit PK behandelt wurde oder nicht. Die PK-Behandlung der Mitochondrien änderte nichts an der Anwesenheit von hSOD1. Das unterstützte eine mitochondriale Lokalisation von hSOD1. Die Intaktheit der IM der Mitoplasten wurde durch das Markerprotein für die Matrix, Tim44, bestätigt. Das Signal für Tim44 war in den Spuren gleich stark, in denen Mitochondrien und Mitoplasten aufgetragen wurden (Tim44, zweite Spalte von links und Spalte rechts außen, Abb. 3.15). Der ATP/ADP-Translokator (AAC) befindet sich in der inneren Membran und wurde in Mitoplasten durch die PK zu einem Fragment abgebaut (Abb. 3.15).



**Abb.3.15: Humane SOD1 (hSOD1) befindet sich im IMR von WT-Hefe-Mitochondrien.** Mitochondrien aus Hefe-Zellen, die hSOD1 exprimierten, wurden isoliert und anschließend eine Fraktion durch 20 mM Hepes zu Mitoplasten (MP) weiter verarbeitet. Mitochondrien und MP wurden mit oder ohne PK inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit 2 mM PMSF gestoppt. Die Proben wurden mit SH-KCl-Puffer gewaschen. Die weitere Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die gezeigten Proteine.

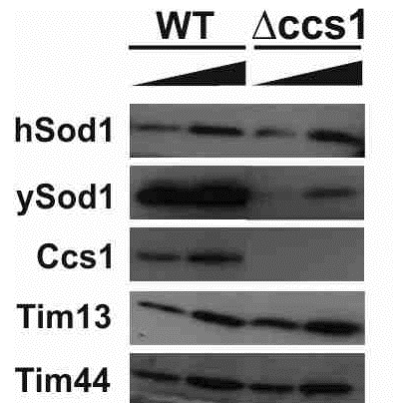
Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass humane SOD1 in den IMR von Hefe-Mitochondrien importiert wird. Humane SOD1 benötigt also für ihren Import in Hefe-Mitochondrien nicht die Anwesenheit von humanem Ccs1 in diesen Mitochondrien.

### 3.4.3 Eine Fraktion humaner SOD1 ist auch in Hefe-Zellen, in denen Ccs1 fehlt, in Mitochondrien lokalisiert

Es konnte bereits gezeigt werden, dass humane SOD1 (hSOD1) in den IMR von Hefe-Mitochondrien importiert werden konnte (siehe Abb. 3.15). Nun sollte weiter analysiert werden, ob sich hSOD1 auch in Hefe-Mitochondrien befindet, in denen endogenes Ccs1 fehlt und, ob der mitochondriale Import der hSOD1 somit von Hefe-Ccs1 unabhängig ist.

Hierzu erfolgte zunächst eine Isolierung von Mitochondrien aus WT und  $\Delta ccs1$ -Hefe-Zellen, die humane SOD1 exprimierten. Diese wurden dann mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert. In Abbildung 3.16 ist zu sehen, dass sich hSOD1 nicht nur in Mitochondrien von WT Hefe-Zellen, sondern auch in denen von

$\Delta ccs1$  -Hefe-Zellen befand. Wie bereits gezeigt wurde, befand sich das Hefe-Homolog von Sod1 (ySod1) ebenfalls in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien, wenn auch nur in verminderter Menge (siehe auch Abschnitt 3.1.1). Außerdem wurde kontrolliert, dass kein endogenes Ccs1 in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien vorhanden war. Die mitochondrialen Proteine Tim13 und Tim44 fungierten wiederum als Kontrolle und waren in den Mitochondrien beider Zelltypen gleichermaßen vorhanden.



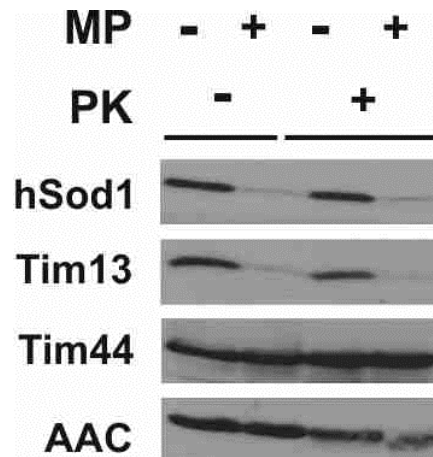
**Abb. 3.16: Vergleich von humaner SOD1 (hSOD1) in Hefe-Mitochondrien vom WT und  $\Delta ccs1$ .** Mitochondrien sowohl aus WT Hefe-Zellen, als auch aus  $\Delta ccs1$ -Hefezellen, die humane SOD1 (hSOD1) exprimierten, wurden isoliert und mit Laemmli-Puffer gemischt. Dann wurden die Proben (25 und 50  $\mu$ g) auf ein SDS-PA-Gel geladen und anschließend mittels Immundekoration gegen die gezeigten Proteine analysiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass humane SOD1 auch in Mitochondrien von Hefe-Zellen importiert wird, in denen das endogene Ccs1 fehlt. Somit ist der Import von hSOD1 in Hefe-Mitochondrien von Hefe-Ccs1 unabhängig.

#### 3.4.4 Die Fraktion mitochondrialer hSOD1 befindet sich im IMR von $\Delta ccs1$ - Hefe-Mitochondrien

Ein Teil der hSOD1 befand sich in Hefe-Mitochondrien, in denen endogenes Ccs1 depletiert worden war (Abschnitt 3.4.3). Um die Sublokalisierung von hSOD1 in diesen Mitochondrien zu bestimmen, wurden  $\Delta ccs1$ -Hefe-Mitochondrien aus Hefe-Zellen isoliert, die humane SOD1 exprimierten. Davon wurde eine Fraktion mit SH-Puffer behandelt und aus einer weiteren durch Hepes Mitoplasten (MP) hergestellt. Mitochondrien und MP wurden mit oder ohne PK inkubiert. Die Proben wurden

durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die genannten Proteine analysiert.



**Abb.3.17: Humane SOD1 (hSOD1) ist im IMR von  $\Delta ccs1$ -Hefe-Mitochondrien lokalisiert.** Mitochondrien wurden aus Hefe-Zellen mit Depletion von Ccs1 isoliert, die humane SOD1 (hSOD1) exprimierten. Ein Teil davon wurde mit SH-Puffer versetzt, sowie ein anderer Teil durch 20 mM Hepes zu Mitoplasten (MP) prozessiert. Mitochondrien und Mitoplasten wurden mit oder ohne PK inkubiert. Der Verdau wurde durch 2 mM PMSF gestoppt und die Proben mit SH-KCl-Puffer gewaschen. Schließlich erfolgte die weitere Analyse mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die gezeigten Proteine.

Hierbei stellte sich heraus, dass sich die humane SOD1 (hSOD1) ähnlich wie das IMR-Protein Tim13 verhielt (Abb. 3.17). Wenn die äußere mitochondriale Membran zerstört wurde (+MP), wurden diese Proteine des IMR freigesetzt. Tim44 und der ATP/ADP-Translokator (AAC) fungierten als Kontrolle, dass die Innenmembran bei den Mitoplasten intakt war. (Abb. 3.17, +MP und +PK).

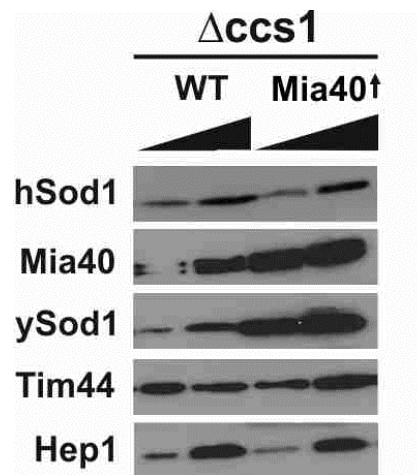
Es kann somit geschlossen werden, dass hSOD1 unabhängig von endogenem Hefe-Ccs1 im IMR von Hefe-Mitochondrien lokalisiert ist.



### 3.4.5 Unabhängigkeit der mitochondrialen Lokalisation humaner SOD1 von Mia40 in Abwesenheit von Hefe-Ccs1

Das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System spielt eine bedeutende Rolle in der mitochondrialen Biogenese sowohl von Hefe-, als auch von humaner SOD1 (Kawamata and Manfredi, 2008, Reddehase et al., 2009). In Abschnitt 3.1.2 wurde bereits erläutert, dass die mitochondriale Lokalisation endogener Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Hefe-Zellen von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System abhängig war (Abb. 3.3). Deshalb ergab sich die Frage, ob auch eine Abhängigkeit von diesem System für den Import humaner SOD1 in  $\Delta ccs1$ -Hefe-Mitochondrien vorlag. Um dies zu untersuchen, wurde hSOD1 in  $\Delta ccs1$ -Hefe-Zellen exprimiert, die einen galaktose-induzierbaren Promotor vor dem *MIA40*-Gen aufwiesen. So wurde es durch die Wahl von Galaktose als Kohlenstoff-Quelle in dem Kultivierungsmedium ermöglicht, endogenes Mia40 in seiner Expression zu erhöhen. Parallel dazu wurde ein  $\Delta ccs1$ -Stamm ohne galaktose-induzierbaren Promotor kultiviert. Die Proteinmengen von hSOD1 in den Mitochondrien dieser beiden Stämme wurden miteinander verglichen.

Entgegen endogener Sod1 ( $\gamma$ Sod1) stiegen die Mengen humaner SOD1 (hSOD1) in Hefe-Mitochondrien nicht, wenn mehr Mia40 für den Import zur Verfügung stand (Abb. 3.18). Als Ladekontrollen dienten Tim44 und Hep1, deren mitochondriale Proteinmengen nicht durch eine Überexpression von Mia40 beeinflusst werden.



**Abb. 3.18: Die mitochondriale Lokalisation humaner SOD1 (hSOD1) ist in Abwesenheit von Hefe-Ccs1 nicht von Hefe-Mia40 abhängig.** Es wurden Hefe-Zellen mit fehlendem endogenem Ccs1 und einem Mia40-Gen verwendet, das durch einen GAL-Promotor in seiner Expression regulierbar ist. Um die Expression von Mia40 zu erhöhen, wurden die Zellen in 0,1 % galaktose-haltigem Medium kultiviert. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen der dazugehörige WT herangezogen. Aus beiden Zelllinien wurden schließlich Mitochondrien isoliert und eine Menge von 25 bzw. 50  $\mu\text{g}$  auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und immunodekoriert.

Da kein Unterschied zwischen der Menge von hSOD1 in Mitochondrien von  $\Delta\text{ccs1}$ -Hefezellen und von  $\Delta\text{ccs1}$ -Zellen mit einer Überexpression von Mia40 bestand, lässt sich schlussfolgern, dass der Import von hSOD1 in den IMR von Mitochondrien in Abwesenheit von Hefe-Ccs1 von Mia40 und damit von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System unabhängig ist.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Biogenese von mitochondrialer Hefe-Sod1**

Die Superoxid-Dismutase1 (Sod1) liegt in ihrer aktiven Form als Dimer vor. Dabei trägt jedes Monomer ein Kupfer- und ein Zink-Ion, sowie eine intramolekulare Disulfidbrücke (Forman and Fridovich, 1973, Leitch et al., 2009b, Roe et al., 1988, Strange et al., 2006). Überwiegend ist die Sod1 im Zytosol der Zelle lokalisiert, ein kleiner Teil befindet sich jedoch im Intermembranraum (IMR) der Mitochondrien (Sturtz et al., 2001). Die mitochondriale Sod1 wird in ihrer ungefalteten und reduzierten apo-Form über die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex) in den IMR transportiert, wo das Kupferchaperon von Sod1 (Ccs1) den Einbau des Kupfer-Ions und der Disulfidbrücke vermittelt, was zu einer Faltung und Retention im IMR führt (Field et al., 2003). Ccs1 spielt somit eine wichtige Rolle für den Import von Sod1 in Hefe-Mitochondrien. In *S.cerevisiae* wird Ccs1 abhängig von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System und somit auch indirekt Sod1 in den IMR von Mitochondrien importiert (Reddehase et al., 2009). Es scheint aber auch einen Ccs1-unabhängigen Importweg in *S.cerevisiae* zu geben, der in dieser Arbeit genauer untersucht wurde.

#### **4.1.1 Die Lokalisation von Sod1 in Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich eine Fraktion von endogener Sod1 trotz Abwesenheit von Ccs1 in Mitochondrien befindet. Dies wurde kürzlich durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Varabyova et al., 2013). Allerdings untersuchte die Studie von Varabyova nicht, in welchem mitochondrialen Subkompartiment sich die Sod1 befindet. In der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich gezeigt, dass sich Sod1 nicht nur in den Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen, sondern im Intermembranraum der Mitochondrien befindet. Zusammenfassend sprechen diese Resultate dafür, dass für Sod1 ein zusätzlicher Ccs1 unabhängiger mitochondrialer Importweg existiert.

#### 4.1.2 Der Redoxzustand von mitochondrialer Sod1 in $\Delta ccs1$ -Zellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben, dass eine Fraktion der Sod1 in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen in oxidiertem Form vorliegt, das heißt mit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten. Eine andere Fraktion der Sod1 in diesen Mitochondrien weist schon unter nicht reduzierenden Bedingungen keine Disulfidbrücke auf, das bedeutet, Sod1 ist reduziert. In Mitochondrien von *S. cerevisiae* benötigt Sod1 normalerweise das Kupferchaperon Ccs1, um die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 57 und 146 zu gewährleisten (Field et al., 2003). Hierbei sind die Cysteinreste 229 und 231 von Ccs1 an der Oxidation der Disulfidbrücke in Sod1 beteiligt. Varabyova et al. zeigten entgegen der Ergebnisse der vorgelegten Arbeit, dass Sod in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien nur in reduzierter Form vorhanden ist (Varabyova et al., 2013). Auf der anderen Seite bestätigten Sea et al. diesen Ccs1-unabhängigen Weg der Disulfidbrückenbildung von Sod1 für *S. cerevisiae* Zellen, allerdings bei Überexpression von Sod1 und ohne Trennung zwischen Zytosol und Mitochondrien (Sea et al., 2013).

Doch welche Gründe könnte es für die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Studien geben? Zum einen könnte es an der Überexpression von Sod1 liegen. Nach dieser Theorie ist der Anteil der oxidierten Sod1 zu gering, um ihn ohne Überexpression von Sod1 detektieren zu können, wie zum Beispiel in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien von der Arbeitsgruppe Varabyova et al., die nur reduzierte Sod1 nachweisen konnten (Varabyova et al., 2013). Wird Sod1 überexprimiert, liegt auch eine größere Menge des oxidierten Anteils von Sod1 in den Mitochondrien vor und der oxidierte Sod1-Anteil kann detektiert werden. Zum anderen kann bei Verwendung des Zellextraktes nicht unterschieden werden, ob die oxidierte Form im Zytosol oder in den Mitochondrien vorkommt. In der vorgelegten Studie konnte die oxidierte Form von Sod1 in den Mitochondrien nachgewiesen werden, ohne dass Sod1 überexprimiert wird. Möglicherweise liegt in Mitochondrien im Verhältnis mehr oxidierte Sod1 vor im Vergleich zum Zytosol. Es bleibt zu klären, wie die Disulfidbrücke in Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 eingebaut wird.

Es besteht die Möglichkeit, dass Mia40 eine Rolle als Elektronenrezeptor bei der Oxidation von Sod1 spielt. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Menge an oxidiertem Sod1 in Mitochondrien ohne Ccs1 mit Überexpression von Mia40 nachgewiesen werden (siehe auch Abschnitt 4.1.3). Es ist bekannt, dass in Anwesenheit von Ccs1 die Elektronen, die bei der Disulfidbrückenbildung

freigesetzt werden, über das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System auf die Cytochrom *c* Oxidase der Atmungskette übertragen werden (Allen et al., 2005). Demnach ist es plausibel, dass Mia40 auch in Abwesenheit von Ccs1 die Rolle eines Elektronenakzeptors bei der Oxidation von mitochondrialer Sod1 übernimmt.

Als einen weiteren Einfluss auf die Disulfidbrücken-Bildung in mitochondrialer Sod1 ohne Ccs1 ist das Redoxpotential im IMR zu nennen. Nach Kojer et al. bestimmt zytosolisches Glutathion das lokale Glutathion Redoxpotential im IMR (Kojer et al., 2012). Darüber hinaus trägt dieses lokale Glutathion Redoxpotential im IMR zu dem teilweise reduzierten Redoxstatus von Mia40 *in vivo* bei. So liegt je nach Größe des Redoxpotentials ein größerer oder kleinerer Anteil von Mia40 im reduzierten Zustand vor und begünstigt bzw. verhindert die Oxidation seiner Substratproteine, wie zum Beispiel das mögliche Substratprotein Sod1, wenn mitochondriales Ccs1 nicht zur Verfügung steht. Auch könnte das lokale Glutathion Redoxpotential im IMR direkt Einfluss auf den Redoxzustand von mitochondrialer Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 haben. Trotz der erhöhten Menge an oxidiertem Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien bei Überexpression von Mia40 konnte kein Disulfidbrücken-Intermediat von Sod1 und Mia40 gefunden werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass Mia40 einen Einfluss auf noch unbekannte Elektronen-Akzeptoren ausübt, die dann die Disulfidbrücke in Sod1 einbauen.

#### **4.1.3 Die Rolle des Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystems für die Lokalisation von mitochondrialer Sod1 in $\Delta ccs1$ -Zellen**

Sod1 wird auch in Abwesenheit von Ccs1 in den IMR von Hefe-Mitochondrien importiert (Abschnitt 4.1.1). Deshalb stellte sich weiter die Frage, ob dieser Importweg vom Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System abhängig ist. Denn es wurde bereits beschrieben, dass dieses System für den Import von mitochondrialem Ccs1 und somit auch indirekt für Sod1 in Hefe-Mitochondrien benötigt wird (Reddehase et al., 2009). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Menge von mitochondrialer Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Zellen von der Menge an Mia40 in den Mitochondrien bestimmt wird. Mia40 bzw. das Disulfid-Transfer-System spielen

offensichtlich auch in Abwesenheit von Ccs1 eine bedeutende Rolle für den mitochondrialen Import von Sod1.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Mia40 direkt mit Sod1 interagiert und den mitochondrialen Import von Sod1 vermittelt, wie zum Beispiel bei dem Import der kleinen Tim-Proteine (Chacinska et al., 2004). Hierbei interagiert Mia40 direkt mit den ungefalteten Vorläuferproteinen und bewirkt die Translokation in den IMR. Nach diesem Modell könnte Mia40 in  $\Delta ccs1$ -Zellen mit Sod1 direkt interagieren, den Import in den IMR vermitteln und sich danach wieder ablösen. Zum anderen könnte Mia40 andere Proteine oder Prozesse beeinflussen, was zu einem erhöhten Import von Sod1 in die Mitochondrien führen könnte.

Es ergibt sich also die Frage, ob Mia40 direkt mit Hefe-Sod1 interagieren kann, wenn Ccs1 für den mitochondrialen Import nicht zur Verfügung steht. In einer früheren Studie konnte eine *in vitro* Interaktion von Mia40 mit Sod1 nicht dargestellt werden (Milenkovic et al., 2007). Falls eine Interaktion während des Importprozesses gegeben ist, wird diese transient sein. Möglicherweise interagiert deshalb nur eine geringe Proteinmenge von Sod1 mit Mia40 und diese kann nicht oder nur schwer detektiert werden. In einer neueren Studie gelang in der Tat der Nachweis einer Interaktion von Mia40 mit Sod1 in WT-Hefe-Mitochondrien mittels eines Nickel-NTA-Pulldowns (Varabyova et al., 2013), nachdem Sod1 mit isolierten Mitochondrien inkubiert worden war. Die Sod1 interagiert vermutlich während des Imports mit Mia40 und unterstützt somit die Theorie, dass der Import von Sod1 von Mia40 vermittelt wird.

Die beschriebene Interaktion wurde nach Lyse unter nativen Bedingungen von Wildtyp-Mitochondrien, die endogenes Ccs1 enthielten, beobachtet. Es bleibt zu klären, ob diese Interaktion auch in Abwesenheit von Ccs1 beobachtet werden kann. Es könnte sich somit bei der Interaktion von Sod1 mit Mia40 um eine indirekte Wechselwirkung über ein weiteres Protein, wie Ccs1, handeln.

Sod1 könnte Substrat von Mia40 sein, auch wenn sie kein „*twinn* Cx<sub>3</sub>C“- oder Cx<sub>9</sub>C-Motiv besitzt.

Kürzlich wurden weitere nicht klassische Mia40-Substrate wie Ccs1 (Gross et al., 2011) und Atp23 (Weckbecker et al., 2012) gefunden. Die mitochondriale Protease Atp23 wird Mia40-abhängig in den IMR von Mitochondrien importiert. Selbst, wenn alle 10 Cysteinreste von Atp23 durch Serinreste ersetzt werden, ist der mitochondriale Import immer noch von Mia40 abhängig und Atp23 bildet dennoch

über hydrophobe Wechselwirkungen ein Intermediat mit Mia40. Außerdem dient Mia40 für Atp23 als eine Faltungsplattform.

Somit ist es möglich, dass Sod1 trotz des fehlenden typischen Cystein-Motives für Mia40-Substrate in Abwesenheit von Ccs1 ein Substrat von Mia40 sein könnte.

#### 4.1.4 Aktivierung von Sod1

##### 4.1.4.1 Die Abhängigkeit der Sod1-Aktivität von Ccs1 und Mia40

Culotta et al. konnten 1997 erstmals ein Chaperon (Ccs1) in Hefe und Mensch identifizieren, das ein Kupfer-Ion und eine Disulfidbrücke exklusiv in Sod1 einbaut und diese somit aktiviert (Culotta et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hefe-Sod1 in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen keine Aktivität zeigt, was mit der Studie von Field et al. (2003) übereinstimmt.

Hierfür existieren zwei mögliche Erklärungsansätze: Zum einen kann Sod1 in *S. cerevisiae* nur Ccs1-abhängig aktiviert werden und Sod1 ist folglich ohne Ccs1 nicht aktiv. Oder die Methodik des Tests ist zum anderen nicht ausreichend dafür konzipiert, kleinste Sod1-Aktivitäten sichtbar darzustellen. Für die erstere Möglichkeit sprechen zahlreiche bestätigte Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen (Culotta et al., 1997, Furukawa et al., 2004). Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass Sod1 auch in Hefe-Zellen unabhängig von Ccs1 aktiviert werden kann und diese Aktivität bei Sod1-Überexpression durch den Aktivitäts-Test detektierbar ist (Sea et al., 2013). In  $\Delta ccs1$ -Zellen mit normaler Menge an Sod1 wurde jedoch keine Sod1-Aktivität nachgewiesen, was mit den hier präsentierten Ergebnissen übereinstimmt. Demnach lässt sich vermuten, dass die Menge an Sod1 in Mitochondrien ohne Ccs1 nicht für die Sensitivität des Sod1-Aktivitäts-Test ausreicht. Hierfür spricht auch die in den Experimenten dieser Dissertation gezeigte verminderte Sod1-Menge in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien und die Abhängigkeit der Sod1-Menge zu ihrer Aktivität.

Ccs1 und damit indirekt Sod1 wird abhängig vom Mia40/Erv1 Disulfid-Transfer-System in den IMR von Mitochondrien importiert (Kawamata and Manfredi, 2008, Reddehase et al., 2009). Als Ergebnis der vorliegenden Dissertation konnte ebenfalls demonstriert werden, dass sich die mitochondriale Proteinmenge von Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien bei Überexpression von Mia40 erhöht (siehe Abschnitt 3.1.2). Dies konnte kürzlich von Varabyova bestätigt werden (Varabyova et al., 2013). Als

Konsequenz davon wurde die Sod1-Aktivität in dieser Arbeit in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien mit Über- oder Unterexpression von Mia40 getestet. In beiden Fällen war auch hier keine Aktivität von Sod1 trotz vermehrter Disulfidbrücken-Bildung in Sod1 bei Überexpression von Mia40 detektierbar.

Dies lässt wiederum zwei mögliche Erklärungsansätze zu: Sod1 befindet sich in diesen Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 trotz Überexpression von Mia40 in der Tat im inaktiven Zustand, da der für die Aktivität benötigte Einbau des Kupfer-Ions von Mia40 nicht gewährleistet werden kann. Oder die mitochondriale Sod1-Menge ist trotz Mia40-Überexpression in Abwesenheit von Ccs1 zu gering, um die Aktivität von Sod1 mittels des Aktivitäts-Test darstellen zu können. Für den letzteren Ansatz spricht die Nachweisbarkeit der Sod1-Aktivität in  $\Delta ccs1$ -Hefe-Zellen bei Sod1-Überexpression (Sea et al., 2013).

Dennoch bleibt weiterhin die Frage zu klären, ob Mia40 in Abwesenheit von Ccs1 die Funktion des Kupfer-Donors für Sod1 und damit die Aufgabe von Domäne III von Ccs1 übernimmt (Lamb et al., 2001, Rae et al., 2001, Schmidt et al., 1999).

#### 4.1.4.2 Die Abhängigkeit der Sod1-Aktivität in Mitochondrien von bestimmten Cystein-Resten in Ccs1

In den hier präsentierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich die Sod1-Aktivität in Mitochondrien von Hefe-Zellen mit verschiedenen Cystein-zu-Serin-Ccs1 Varianten unterscheidet. Es bestand keine Sod1-Aktivität in den Mitochondrien der C229/231S-Ccs1 Mutanten. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen der Studie von Field et al. (2003). Ebenso zeigte sich in den Zellextrakten mit der C229/231S-Ccs1 Varianten keine Sod1-Aktivität. Somit sind die Cystein-Reste in diesem CxC-Motiv der Domäne III von Ccs1 wichtig für den Einbau des Kupfer-Ions und der Disulfidbrücke und damit wichtig für die Aktivierung von Sod1 im Zytosol und in den Mitochondrien (Kirby et al., 2008, Lamb et al., 2001, Rae et al., 2001, Schmidt et al., 1999).

Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Cysteinreste 17 und 20 in der amino-terminalen Domäne I von Ccs1 offensichtlich keine Rolle für die Aktivierung von Sod1 im Zytosol oder in den Mitochondrien spielen.

Weiter fiel eine verringerte Sod1-Aktivität in den Mitochondrien mit der C27/64S-Ccs1 Variante auf. Als mögliche Erklärung hierfür erwies sich eine verminderte mitochondriale Proteinmenge von Sod1 bei der C27/64S-Ccs1 Mutante. Da die



mitochondriale Lokalisation von Sod1 von der mitochondrialen Lokalisation von Ccs1 in *S. cerevisiae* abhängig ist (Field et al., 2003, Reddehase et al., 2009) und der Import von Ccs1 durch Mia40 wiederum von den Cysteinresten C27 und C64 ist (Gross et al., 2011, Kloppel et al., 2011), dient dies als Begründung für eine verminderte mitochondriale Proteinmenge von Sod1 in der C27/64S-Ccs1 Variante. Denn Ccs1 trägt zwischen den Cysteinresten 27 und 64 eine Disulfidbrücke, die von Mia40 in das Protein eingebaut wird. Durch Ausbildung dieser Disulfidbrücke erhöht sich die Menge an Ccs1 und damit auch Sod1 im mitochondrialen IMR.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die verringerte Sod1-Aktivität in der C27/64S-Ccs1 Variante durch einen verminderten Import von Sod1 in den IMR bedingt ist, wurde diese in ganzen Zellen mit verschiedenen Ccs1-Varianten geprüft. Es zeigte sich eine vergleichbare Sod1-Aktivität in Zellen mit Ccs1-WT und der C27/64S-Ccs1 Variante. Dieses Resultat konnte auch für Mitochondrien aus Zellen, die ein mitochondrial lokalisiertes Fusionsprotein der C27/64S-Ccs1 Variante exprimierten, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Cysteinreste C27 und C64 in Ccs1 sowohl im Zytosol, als auch in den Mitochondrien nicht für die Aktivierung von Sod1 benötigt wurden. Die gesehene verminderte Aktivität von Sod1 in den Mitochondrien mit der C27/64S-Ccs1 Variante beruht somit nicht auf einer verringerten spezifischen Aktivität pro Sod1-Molekül, sondern auf einer verringerten Sod1-Konzentration in den Mitochondrien aufgrund des reduzierten Imports.

#### 4.1.4.3 Aktivierung von mitochondrialer Hefe-Sod1 durch hCCS1

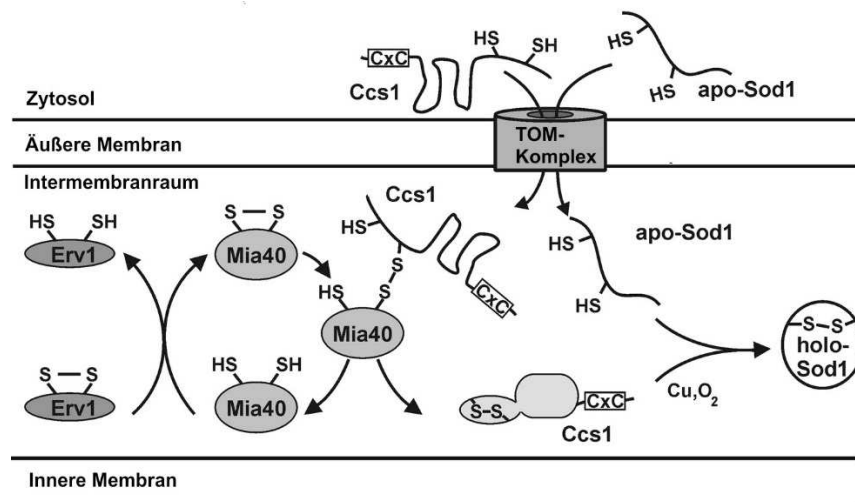
In dieser Arbeit wurden isolierte Hefe-Mitochondrien aus Zellen untersucht, in denen endogenes Ccs1 depletiert und durch humanes CCS1 ersetzt worden war. Hierbei zeigte sich, dass das humane Homolog die Funktion des Hefe-Ccs1 teilweise übernahm und Hefe-Sod1 aktivieren konnte. Als Schlussfolgerung konnte daraus geschlossen werden, dass das hCCS1 ebenfalls in Hefe-Mitochondrien importiert wurde, obwohl sich die Struktur des Hefe-Ccs1 (yCcs1) von der des humanen Ccs1 (hCCS1) unterscheidet. Beide weisen drei Domänen auf, die ähnliche Aufgaben übernehmen (Banci et al., 2012, Schmidt et al., 1999). Jedoch ist die erste Domäne bei der humanen Form im Gegensatz zu Hefe-Ccs1 essentiell für die Bindung von Kupfer in vivo (Caruano-Yzermans et al., 2006). Um hSOD1 zu

aktivieren, überträgt hCCS1 ebenso wie sein Hefe-Homolog eine Disulfidbrücke auf hSOD1. Dabei sind die Cysteinreste 244 und 246 der Domäne III essentiell für die Aktivierung, vergleichbar mit den Cysteinresten 229 und 231 der Domäne III von Hefe-Ccs1 (Banci et al., 2012). hCCS1 weist keine Cysteinreste an der Position 27 und 64 auf, die in Hefe-Zellen eine große Rolle bei dem mitochondrialen Import durch das Disulfid-Transfer-System spielen (Gross et al., 2011). Die Tatsache, dass mitochondriale Sod1 trotz Fehlen der Cysteinreste C27 und C64 aktiviert wurde, zeigt eine Übereinstimmung mit den gezeigten Ergebnissen, dass die Cysteinreste C27 und C64 in Hefe nicht essentiell für die Sod1-Aktivierung sind (siehe Abschnitt 4.1.4.2). Es ist beschrieben, dass das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System eine Rolle für den Import von hCCS1 in den Intermembranraum von Mitochondrien spielt und die Menge von hSOD1 in humanen Mitochondrien direkt proportional zu der Proteinmenge von mitochondrialem hCCS1 ist (Kawamata and Manfredi, 2008). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass hCCS1 als sein eigener Import-Rezeptor fungiert und seine Disulfidbrücke eigenständig einbauen kann und somit selbst seine mitochondrial importierte Menge kontrolliert (Suzuki et al., 2013). Trotz dieser dargestellten Unterschiede in der Struktur und Funktion zwischen dem humanem und dem Hefe-Homolog, ist hCCS1 in der Lage, Hefe-Sod1 in Abwesenheit von Hefe-Ccs1 in Mitochondrien zu aktivieren.

#### **4.1.5 Mechanismus der Biogenese von mitochondrialer Hefe-Sod1**

##### 4.1.5.1 Mitochondrialer Import von Sod1 in Anwesenheit von Ccs1

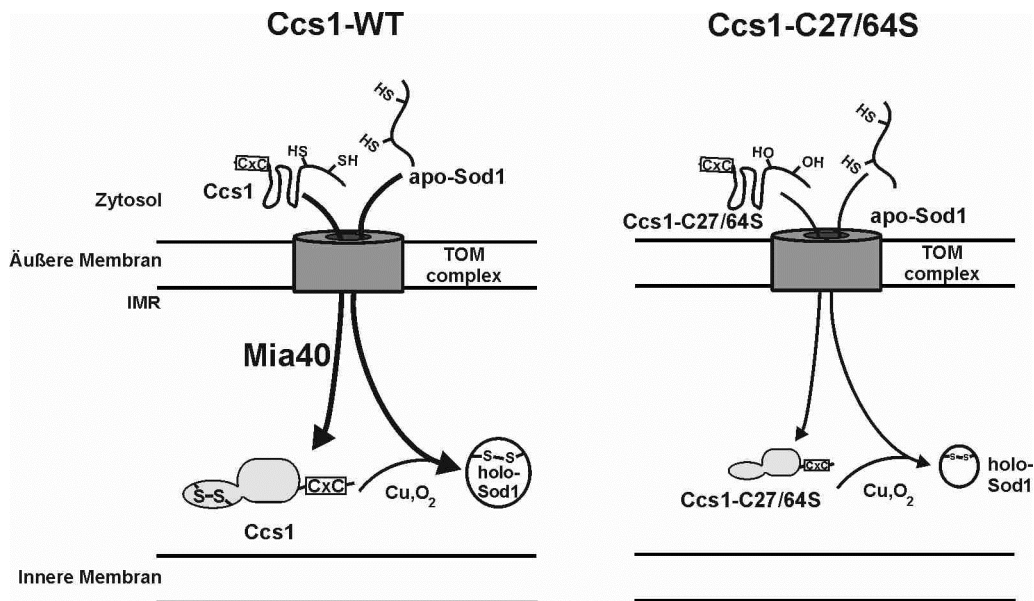
Durch neue Erkenntnisse dieser Arbeit kombiniert mit bereits erfassten Daten (Gross et al., 2011) kann folgendes hypothetisches Modell für den Import von Sod1 in den mitochondrialen IMR bei Anwesenheit von Ccs1 kreiert werden (Abb. 4.1):



**Abb. 4.1: Modell des Imports von Ccs1 und Sod1 in den IMR von Mitochondrien und der Bildung von aktiver holo-Sod1.** Erläuterungen siehe Text [verändert nach (Gross et al., 2011)]

Reduziertes und damit ungefaltetes Ccs1 gelangt durch den TOM-Komplex durch die äußere mitochondriale Membran in den IMR. Dort interagiert der Cysteinrest 64 von Ccs1 mit Mia40, das den Einbau einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 27 und 64 bewirkt. Hierdurch wird Ccs1 gefaltet und somit am erneuten Verlassen des IMR gehindert. In dieser Form vermittelt Ccs1 den mitochondrialen Import von Sod1, die ebenfalls in der reduzierten und ungefalteten apo-Form durch den TOM-Komplex den IMR erreicht. Ccs1 führt das Einsetzen eines Kupfer-Ions und die Ausbildung einer Disulfidbrücke in der Sod1 herbei und bewirkt somit ebenfalls, dass Sod1 den IMR nicht mehr verlassen kann. Zu der Aktivierung von Sod1 werden die Cysteine des CxC-Motivs der Domäne III von Ccs1 benötigt (Schmidt et al., 1999). Auf welche Weise die Disulfidbrücke durch das CxC-Motiv von Ccs1 in Sod1 gebildet wird und ob dabei Mia40 eine Rolle spielt, muss weiter geklärt werden. Bereits bekannt ist lediglich, dass sich *in vitro* eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 229 von Ccs1 und 57 der Sod1 ausbildet (Lamb et al., 2001).

Dagegen sind die Cysteinreste C27 und C64 von Ccs1 nicht an der Sod1-Aktivierung beteiligt, wie in dem folgenden Modell illustriert werden soll (Abb. 4.2):



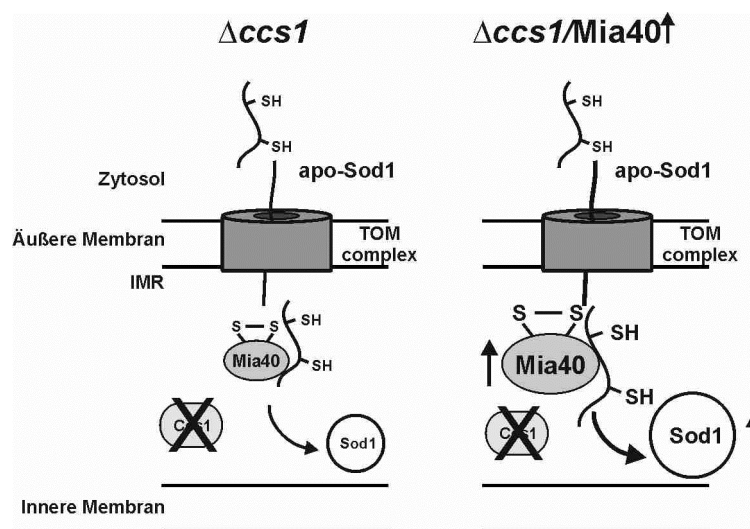
**Abb. 4.2: Modell des Imports von Ccs1-WT (links) und C27/64S-Ccs1 (rechts) einschließlich Sod1 in den IMR von Mitochondrien im Vergleich.** Ungefaltetes Wildtyp-Ccs1 wird Mia40-abhängig in den IMR von Mitochondrien importiert und eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C27 und C64 gebildet. Ccs1 vermittelt den mitochondrialen Import von Sod1 (siehe auch Abbildung 4.1) und vermittelt die Sod1-Aktivierung durch Einbau eines Kupfer-Ions und einer Disulfidbrücke. Dagegen wird C27/64S-Ccs1 in verringerter Menge in den IMR importiert (kleine Darstellung von C27/64S-Ccs1 rechts), da es kein Disulfid-Intermediat mit Mia40 eingehen kann. Daher wird auch eine geringere Menge Sod1 in den mitochondrialen IMR importiert (kleine Darstellung von Sod1 rechts). Dennoch ist die spezifische Aktivität der importierten Sod1 nicht gemindert, denn die für die Sod1-Aktivierung essentiellen Cysteinreste C229 und C231 von Ccs1 sind vorhanden.

Wenn die Cysteinreste C27 und C64 in Ccs1 durch Serinreste ersetzt werden, wird das ungefaltete Ccs1 zwar in den IMR der Mitochondrien importiert, kann aber aufgrund der fehlenden Cysteinreste kein Disulfid-Intermediat mit Mia40 eingehen. Deshalb findet kein effizienter Import der C27/64S-Ccs1 Varianten in die Mitochondrien statt. Die Menge dieser C27/64S-Ccs1 Variante in den Mitochondrien ist im Vergleich zu dem Wildtyp-Ccs1 verringert (Gross et al., 2011). Da der mitochondriale Import der Sod1 von Ccs1 abhängig ist, wird aufgrund der verringerten mitochondrialen Menge der C27/64S-Ccs1 Variante auch weniger Sod1 in den mitochondrialen IMR importiert und die Menge an Sod1 ist somit in den Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Variante verringert. Die spezifische Aktivität pro

Molekül der Sod1 ist in dieser Ccs1-Variante jedoch nicht verringert, da die Cysteinreste C229 und C231 in der Domäne III von Ccs1, die für die Sod1-Aktivierung zuständig sind, vorhanden sind. Die gesehene verminderte Sod1-Aktivität in den Mitochondrien der C27/64S Varianten beruht demnach auf dem reduzierten mitochondrialen Import von Ccs1 und von Sod1.

#### 4.1.5.2 Mitochondrialer Import von Sod1 in Abwesenheit von Ccs1

Trotz fehlendem endogenem Ccs1 befindet sich ein Teil der Sod1 im IMR von Mitochondrien, jedoch in einer geringeren Menge als bei Mitochondrien mit Ccs1. Bei diesem Importvorgang scheint das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System eine Rolle zu spielen, denn die Menge an Sod1 war in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien mit Überexpression von Mia40 erhöht (Abb. 4.3 rechts) im Vergleich zu  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien ohne Mia40-Überexpression (Abb. 4.3 links).



**Abb. 4.3: Modell des Imports von Sod1 in den IMR von  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien mit einem Vergleich von normaler Proteinmenge von Mia40 (links) und Überexpression von Mia40 (Mia 40  $\uparrow$ ) (rechts).** Bei einer Überexpression von Mia40 (Mia40 groß dargestellt, rechts) wird in Mitochondrien ohne Ccs1 eine höhere Menge von Sod1 in den IMR von Mitochondrien importiert (Sod1 groß dargestellt, rechts) im Vergleich zu  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien mit normaler Mia40 Menge (Sod1 klein dargestellt, links). Dabei scheint Sod1 eine Wechselwirkung mit Mia40 einzugehen. Dennoch ist die importierte Sod1 in diesen Mitochondrien nicht aktiv.

Die Überexpression von Mia40 scheint in Abwesenheit von Ccs1 einen Einfluss auf die Disulfidbrücken-Bildung von Sod1 im IMR zu haben. Denn in den  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien mit erhöhter Menge von Mia40 war ein erhöhter Anteil der oxidierten Form der Sod1, das heißt mit Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke, zu finden im Vergleich zu den Mitochondrien mit normaler Mia40-Menge. Dennoch zeigt sich keine Aktivität der mitochondrialen Sod1 in Abwesenheit von Ccs1, unabhängig davon ob Mia40 überexprimiert ist oder nicht. Zusammenfassend ist zu sagen, dass Mia40 einen Einfluss auf die Disulfidbrücken-Bildung und somit auf die importierte Menge von Sod1 in  $\Delta ccs1$ -Mitochondrien hat, jedoch Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 nicht aktivieren kann. Der Mechanismus bleibt unklar, ob und wie Mia40 die mitochondriale Sod1 oxidieren kann und ob es durch eine Wechselwirkung zwischen Mia40 und Sod1 geschieht.

## 4.2 Die Biogenese von hSOD1 im Hefe-Modell

Das humane Homolog der SOD1 (hSOD1) unterscheidet sich strukturell zur Hefe-Sod1. Die humane SOD1 trägt im Gegensatz zur Hefe-Form vier Cysteinreste und ihr fehlt das Prolin an der Position 144, das den Aktivierungsweg der Hefe-Sod1 abhängig von Hefe-Ccs1 macht (Leitch et al., 2009a). Dahingegen kann die humane oder Säugetier-Form der SOD1 entweder Ccs1-abhängig oder auch Ccs1-unabhängig aktiviert werden (Carroll et al., 2004, Wong et al., 2000). Humane SOD1 ist wie ihr Hefe-Homolog vorwiegend im Zytosol lokalisiert, jedoch befindet sich auch ein geringer Teil im Intermembranraum von Säugetier-Mitochondrien (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001).

Um den mitochondrialen Importweg von hSOD1 weiter zu charakterisieren, ist humane SOD1 im Hefe-System exprimiert worden. Es hat sich gezeigt, dass sich hSOD1 trotz Unterschiede in der Struktur im IMR von Hefe-Mitochondrien befindet. Die Untersuchungen der Hefe-Mitochondrien mit Depletion von Hefe-Ccs1 und zusätzlicher Expression von humaner SOD1 haben gezeigt, dass hSOD1 in Abwesenheit von Hefe-Ccs1 im mitochondrialen IMR von Hefe-Zellen lokalisiert ist. Auch das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System scheint an dem mitochondrialen Import von hSOD1 nicht beteiligt zu sein. Denn die importierte hSOD1 Menge verändert sich nicht bei Überexpression von Mia40, unabhängig davon, ob

endogenes Hefe-Ccs1 anwesend ist oder depletiert wird. So unterscheidet sich das Importverhalten der Hefe-Sod1 zu der hSOD1. Denn das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfersystem scheint in Hefe-Mitochondrien in Abwesenheit von Ccs1 einen Einfluss auf die importierte Menge an Sod1 zu haben, da sich bei Überexpression die Menge an importierter Sod1 erhöht. Auch Varabyova et al. konnten dieses Ergebnis bestätigen (Varabyova et al., 2013).

In menschlichen Zellen wird hSOD1 großteils mit Hilfe von hCCS1 in Mitochondrien importiert (Kawamata and Manfredi, 2008). In Hefezellen vermittelt Hefe-Ccs1 den Import von hSOD1 nicht, wie in dieser Arbeit gezeigt wird. Hefe-Ccs1 kann die Funktion von hCCS1 im Prozess des mitochondrialen Imports von hSOD1 wohl nicht übernehmen. Nichtsdestotrotz konnte hSOD1 nach Expression in Hefe in Mitochondrien detektiert werden. Es muss also einen von Hefe-Proteinen vermittelten Ccs1-unabhängigen Import von hSOD1 geben. Es könnte sein, dass ein entsprechender Importweg in humanen Zellen neben dem CCS1-abhängigen Importweg existiert. Die Natur dieses Importweges ist unklar und muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

### **4.3 Möglicher Zusammenhang mit der familiären Form der ALS**

Mutationen in dem Gen für die Sod1 verursachen 20% der Fälle der erblich bedingten Amyotrophen Lateralsklerose (fALS) (Robberecht and Philips, 2013, Vehvilainen et al., 2014). In diesen Fällen kommt es vielfach zu erhöhten Mengen an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) in neuronalen Zellen, was entscheidend zur Entwicklung des pathologischen Zustandes von ALS beizutragen scheint. MutSod1, die mit ALS in Verbindung gebracht wird, ist unter anderem im IMR von Mitochondrien lokalisiert (Kawamata and Manfredi, 2008). Durch die inkorrekte Biogenese der mutierten Sod1 kommt es zu einer Missfaltung und zur Ausbildung von Aggregaten, die mitochondrialen Schaden verursachen (Ferri et al., 2006). Für diese Aggregate wurden intermolekulare Disulfidbrücken beschrieben (Deng et al., 2006). Darüber hinaus zeigten Mitochondrien, die aus dem Rückenmark von transgenen Mäusen mit mutSod1 isoliert wurden, erhöhte Sod1-Aktivität und verstärkte Produktion von ROS verglichen mit Sod1-Wildtyp-Mitochondrien (Goldsteins et al., 2008). Diese Resultate führen zu zwei Prozessen, die wichtig sind, um den Mechanismus der von mutSod1 verursachten mitochondrialen Toxizität zu

verstehen: Die Translokation von Sod1 und die Kontrolle der Sod1-Aktivität im mitochondrialen IMR.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Faktoren, die den Import von Sod1 in den IMR von Hefe-Mitochondrien kontrollieren, gefunden: Hefe-Sod1 befindet sich trotz Abwesenheit von Hefe-Ccs1 im IMR von Mitochondrien. Dabei ist eine Fraktion der Sod1-Moleküle reduziert, eine andere Fraktion der Sod1-Moleküle weist eine Disulfidbrücke auf. Dieser von Ccs1 unabhängige Import-Mechanismus wird von dem Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System beeinflusst. Dies konnte auch von der Arbeitsgruppe Chacinska bestätigt werden (Varabyova et al., 2013). Des Weiteren konnte von dieser Gruppe gezeigt werden, dass mit fALS-assoziierte Sod1-Mutationen ebenfalls in reduziertem Zustand unabhängig von Ccs1, aber in Kooperation von Mia40 und MINOS (*mitochondrial inner membrane organizing system*) in den mitochondrialen IMR importiert wurden. Demzufolge beeinflussen Mia40 und MINOS sowohl die Fähigkeit der Wildtyp-Sod1, als auch die der mutierten Sod1 Formen zur Akkumulation im mitochondrialen IMR und könnten deswegen eine entscheidende Rolle im pathologischen Prozess von fALS spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Import-Weg für die humane SOD1 (hSOD1) in Hefe-Mitochondrien identifiziert, der unabhängig von Hefe-Ccs1 und vom Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System ist. Kawamata und Manfredi zeigten zudem, dass auch mit fALS-assoziierte hSOD1-Mutationen unabhängig von hCCS1 importiert wurden (Kawamata and Manfredi, 2008). Wie dieser Mechanismus im Einzelnen funktioniert, der zur Erklärung der Pathogenese von fALS beitragen könnte, muss weiter abgeklärt werden.

Wie schon vorhin erwähnt, scheint die Toxizität in Mitochondrien bei ALS durch das Maß der Sod1-Aktivität kontrolliert zu werden. Bisher bekannt ist, dass die Wildtyp-Form von hSOD1 über hCCS1 aktiviert und gesteuert wird (Kawamata and Manfredi, 2008). Jedoch bewirkt die Überexpression von Ccs1 im Mausmodell mit einer G93A-Sod1-Mutation einen beschleunigten Krankheitsverlauf der ALS (Son et al., 2007). Im gleichen Maße verursacht eine erhöhte Aktivität der Wildtyp-Sod1 eine erhöhte Produktion von radikalen Sauerstoff-Spezies, die schädlich für Mitochondrien sind (Goldsteins et al., 2008). Aus diesem Grunde ist es von großer Bedeutung herauszufinden, von welchen Faktoren die Sod1-Aktivität abhängig ist. Im Rahmen dieser Dissertation konnten bestimmte Cysteinreste in Ccs1 identifiziert werden, die über den Import von Sod1 das Maß der Sod1-Aktivität in Mitochondrien kontrollieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass selbst



humanes CCS1 mitochondriale Sod1 in Hefe-Zellen aktivieren kann, wenn Hefe-Ccs1 depletiert worden war. Weiterhin konnte Mia40 als beeinflussender Sod1-Aktivitätsfaktor in Hefezellen ohne Ccs1 ausgeschlossen werden. Dennoch existiert selbst in diesen Zellen von *S.cerevisiae*, von denen man bisher annahm, dass Sod1 ausschließlich über Ccs1 aktiviert werden kann, ein Ccs1 unabhängiger Aktivierungsweg (Sea et al., 2013).

Zusammenfassend können danach aus logischer Schlussfolgerung folgende Therapieansätze für diese Form der fALS gezogen werden: Durch verminderten mitochondrialen Import der mutierten Sod1 oder durch verringerte Aktivität könnte der Krankheitsverlauf verlangsamt werden. Dies konnte bereits in Form eines Kupfer-Chelators im Mausmodell umgesetzt werden (Hottinger et al., 1997, Tokuda et al., 2008). Jedoch kann die Depletion von Ccs1 als Kupfer-Chaperon von Sod1 die Klinik von ALS im Mausmodell nicht verhindern (Subramaniam et al., 2002). Deswegen ist es umso wichtiger, den von Ccs1 unabhängigen mitochondrialen Biogeneseweg der Sod1 und ihrer Mutationen weiter zu beleuchten.

## 5 Zusammenfassung

Das Enzym Superoxid-Dismutase1 (Sod1) katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Anionen und schützt die Zelle vor oxidativem Stress. Das Enzym wird durch sein Kupfer-Chaperon (Ccs1) aktiviert, welches für den Einbau des Kupfer-Ions und einer Disulfidbrücke sorgt. In vielen Organismen gibt es neben dem Ccs1-abhängigen Aktivierungsweg auch noch einen Ccs1-unabhängigen Aktivierungsweg. Sod1 liegt in der Zelle überwiegend im Zytosol vor, aber zu einem geringen Anteil auch in Mitochondrien.

Bei 20% der Fälle der erblich bedingten Amyotrophen Lateralsklerose (fALS) sind Mutationen des SOD1-Gens beteiligt (Boillee et al., 2006). Da Dysfunktionen der Mitochondrien in diesen Fällen beobachtet worden sind (Deng et al., 2006, Ferri et al., 2006), könnte es bedeuten, dass die mitochondriale Form der Sod1 und ihre Biogenese möglicherweise eine Rolle für den Pathomechanismus der fALS spielen. Deshalb ist es wichtig, den Mechanismus der Biogenese von mitochondrialer Sod1 (mtSod1) zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden die Ccs1-unabhängige und die Ccs1-abhängige Biogenese von mtSod1 im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 ( $\Delta ccs1$ -Zellen) im Intermembranraum (IMR) von Mitochondrien lokalisiert ist, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als in Wildtyp-Mitochondrien. Für den Import von Sod1 in Abwesenheit von Ccs1 spielt das Mia40/Erv1-Disulfid-Transfer-System eine wichtige Rolle. Die Depletion von Mia40 führt zur Reduktion der Menge an mtSod1 und die Überexpression von Mia40 zu erhöhten Mengen an mtSod1. Der Redoxzustand von mtSod1 ist auch von Ccs1 abhängig. In Abwesenheit von Ccs1 liegt mtSod1 in reduzierter und oxidiert Form vor, während es in Anwesenheit von Ccs1 vollständig oxidiert ist.

Mittels Aktivitätstest konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Sod1 in Mitochondrien von Hefe- $\Delta ccs1$ -Zellen nicht aktiv ist. Erhöhte Mengen an Mia40 führen nicht zur Aktivierung von Sod1 in Mitochondrien von  $\Delta ccs1$ -Zellen. Ccs1 wird in Hefe also zur Aktivierung von mtSod1 benötigt. Es stellte sich die Frage, welche der Cystein-Reste in Ccs1 dafür notwendig sind. Dazu wurden Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 exprimiert. In der C229/231S-Ccs1 Mutante wurde keine Sod1-Aktivität in Mitochondrien detektiert, was die mit Zellextrakten erhaltenen Ergebnisse von Lamb et al., 2001 stützt. Die C17/20S-Ccs1 Mutante hat eine dem

Wildtyp vergleichbare Sod1-Aktivität in Mitochondrien. Demgegenüber besitzt die C27/64S-Ccs1 Mutante eine deutlich reduzierte mitochondriale Sod1-Aktivität. Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass dies auf einer verringerten Proteinmenge an Sod1 in Mitochondrien der C27/64S-Ccs1 Mutante beruht. Der Import von Ccs1 in Mitochondrien ist von den Cystein-Resten C27 und C64 abhängig. Sod1 wird großteils mit Hilfe von Ccs1 in Mitochondrien importiert, so dass reduzierte mitochondriale Mengen an Ccs1 wiederum zu verringerten Sod1-Mengen in Mitochondrien führen. Die spezifische Aktivität pro Molekül Sod1 ist in der C27/64S-Ccs1 Mutante nicht betroffen. In Zellextrakten, in denen in der C27/64S-Ccs1 Mutante gleiche Mengen an Sod1 wie in Wildtyp-Zellen vorliegen, sind die Aktivitäten vergleichbar hoch. Entsprechendes gilt für die Sod1-Aktivitäten, wenn die C27/64S-Ccs1 Variante und WT-Ccs1 mittels der Präsequenz des Cytochrom *b*<sub>2</sub> in den IMR importiert wurden und somit in gleich hohen Mengen im IMR vorlagen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Cystein-Reste C27 und C64 des Ccs1 für die Aktivierung von mtSod1 nicht nötig sind.

Um den mitochondrialen Biogeneseweg von humaner Sod1 (hSOD1) zu charakterisieren, wurde hSOD1 in *S. cerevisiae* exprimiert. hSOD1 wurde sowohl in Wildtyp-, als auch in  $\Delta ccs1$ -Zellen im IMR von Mitochondrien detektiert. Es zeigte sich, dass der Transport in Mitochondrien unabhängig von Mia40 erfolgt und damit von dem der Hefe-Sod1 verschieden ist.

In dieser Arbeit wurden wertvolle Erkenntnisse zur Ccs1-abhängigen und Ccs1-unabhängigen Biogenese von mtSod1 erhalten. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um die mitochondriale Biogenese von in fALS vorkommenden Sod1-Mutanten zu untersuchen und den Pathomechanismus der Sod1-abhängigen fALS besser zu verstehen.

## 6 Literatur

- AHTING, U., THIEFFRY, M., ENGELHARDT, H., HEGERL, R., NEUPERT, W. & NUSSBERGER, S. 2001. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 153, 1151-60.
- AHTING, U., THUN, C., HEGERL, R., TYPKE, D., NARGANG, F. E., NEUPERT, W. & NUSSBERGER, S. 1999. The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 147, 959-68.
- ALLEN, S., BALABANIDOU, V., SIDERIS, D. P., LISOWSKY, T. & TOKATLIDIS, K. 2005. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol*, 353, 937-44.
- ANDERSEN, P. M. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 6, 37-46.
- ANDERSSON, S. G., ZOMORODIPOUR, A., ANDERSSON, J. O., SICHERITZ-PONTEN, T., ALSMARK, U. C., PODOWSKI, R. M., NASLUND, A. K., ERIKSSON, A. S., WINKLER, H. H. & KURLAND, C. G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396, 133-40.
- BANCI, L., BERTINI, I., CANTINI, F., KOZYREVA, T., MASSAGNI, C., PALUMAA, P., RUBINO, J. T. & ZOVO, K. 2012. Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13555-60.
- BANCI, L., BERTINI, I., CEFARO, C., CIOFI-BAFFONI, S., GALLO, A., MARTINELLI, M., SIDERIS, D. P., KATRAKILI, N. & TOKATLIDIS, K. 2009. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 198-206.
- BECHER, D., KRICKE, J., STEIN, G. & LISOWSKY, T. 1999. A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast*, 15, 1171-81.
- BENSIMON, G., LACOMBLEZ, L. & MEININGER, V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*, 330, 585-91.
- BIEN, M., LONGEN, S., WAGENER, N., CHWALLA, I., HERRMANN, J. M. & RIEMER, J. 2010. Mitochondrial disulfide bond formation is driven by

- intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol Cell*, 37, 516-28.
- BIHLMAIER, K., MESECKE, N., TERZIYSKA, N., BIEN, M., HELL, K. & HERRMANN, J. M. 2007. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol*, 179, 389-95.
- BOILLEE, S., VANDE VELDE, C. & CLEVELAND, D. W. 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39-59.
- BORCHELT, D. R., GUARNIERI, M., WONG, P. C., LEE, M. K., SLUNT, H. S., XU, Z. S., SISODIA, S. S., PRICE, D. L. & CLEVELAND, D. W. 1995. Superoxide dismutase 1 subunits with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis do not affect wild-type subunit function. *J Biol Chem*, 270, 3234-8.
- BOTTINGER, L., GORNICKA, A., CZERWIK, T., BRAGOSZEWSKI, P., LONIEWSKA-LWOWSKA, A., SCHULZE-SPECKING, A., TRUSCOTT, K. N., GUIARD, B., MILENKOVIC, D. & CHACINSKA, A. 2012. In vivo evidence for cooperation of Mia40 and Erv1 in the oxidation of mitochondrial proteins. *Mol Biol Cell*, 23, 3957-69.
- BRACHMANN, C. B., DAVIES, A., COST, G. J., CAPUTO, E., LI, J., HIETER, P. & BOEKE, J. D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14, 115-32.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CARRI, M. T. & COZZOLINO, M. 2011. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J Bioenerg Biomembr*, 43, 593-9.
- CARROLL, M. C., GIROUARD, J. B., ULLOA, J. L., SUBRAMANIAM, J. R., WONG, P. C., VALENTINE, J. S. & CULOTTA, V. C. 2004. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5964-9.
- CARUANO-YZERMANS, A. L., BARTNIKAS, T. B. & GITLIN, J. D. 2006. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 281, 13581-7.
- CHACINSKA, A., GUIARD, B., MULLER, J. M., SCHULZE-SPECKING, A., GABRIEL, K., KUTIK, S. & PFANNER, N. 2008. Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem*, 283, 29723-9.
- CHACINSKA, A., PFANNSCHMIDT, S., WIEDEMANN, N., KOZJAK, V., SANJUAN SZKLARZ, L. K., SCHULZE-SPECKING, A., TRUSCOTT, K. N., GUIARD, B., MEISINGER, C. & PFANNER, N. 2004. Essential role of Mia40 in

- import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J*, 23, 3735-46.
- CHEN, X. J. & BUTOW, R. A. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*, 6, 815-25.
- CHIRICO, W. J., WATERS, M. G. & BLOBEL, G. 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332, 805-10.
- CLARKE, S. L., BOWRON, A., GONZALEZ, I. L., GROVES, S. J., NEWBURY-ECOB, R., CLAYTON, N., MARTIN, R. P., TSAI-GOODMAN, B., GARRATT, V., ASHWORTH, M., BOWEN, V. M., MCCURDY, K. R., DAMIN, M. K., SPENCER, C. T., TOTH, M. J., KELLEY, R. I. & STEWARD, C. G. 2013. Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 8, 23.
- COPPOCK, D. L. & THORPE, C. 2006. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal*, 8, 300-11.
- CRAPO, J. D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J. W. & CHANG, L. Y. 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10405-9.
- CULOTTA, V. C., KLOMP, L. W., STRAIN, J., CASARENO, R. L., KREMS, B. & GITLIN, J. D. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 272, 23469-72.
- DA CRUZ, S. & CLEVELAND, D. W. 2011. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, 21, 904-19.
- DABIR, D. V., LEVERICH, E. P., KIM, S. K., TSAI, F. D., HIRASAWA, M., KNAFF, D. B. & KOEHLER, C. M. 2007. A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J*, 26, 4801-11.
- DAMIANO, M., STARKOV, A. A., PETRI, S., KIPANI, K., KIAEI, M., MATTIAZZI, M., FLINT BEAL, M. & MANFREDI, G. 2006. Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*, 96, 1349-61.
- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-19.
- DEJESUS-HERNANDEZ, M., MACKENZIE, I. R., BOEVE, B. F., BOXER, A. L., BAKER, M., RUTHERFORD, N. J., NICHOLSON, A. M., FINCH, N. A., FLYNN, H., ADAMSON, J., KOURI, N., WOJTAS, A., SENGDY, P., HSIUNG, G. Y., KARYDAS, A., SEELEY, W. W., JOSEPHS, K. A., COPPOLA, G., GESCHWIND, D. H., WSZOLEK, Z. K., FELDMAN, H., KNOPMAN, D. S., PETERSEN, R. C., MILLER, B. L., DICKSON, D. W., BOYLAN, K. B., GRAFF-RADFORD, N. R. & RADEMAKERS, R. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72, 245-56.

- DENG, H. X., HENTATI, A., TAINER, J. A., IQBAL, Z., CAYABYAB, A., HUNG, W. Y., GETZOFF, E. D., HU, P., HERZFELDT, B., ROOS, R. P. & ET AL. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*, 261, 1047-51.
- DENG, H. X., SHI, Y., FURUKAWA, Y., ZHAI, H., FU, R., LIU, E., GORRIE, G. H., KHAN, M. S., HUNG, W. Y., BIGIO, E. H., LUKAS, T., DAL CANTO, M. C., O'HALLORAN, T. V. & SIDDIQUE, T. 2006. Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7142-7.
- DEPONTE, M. & HELL, K. 2009. Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J Biochem*, 146, 599-608.
- DIEKERT, K., DE KROON, A. I., AHTING, U., NIGGEMEYER, B., NEUPERT, W., DE KRUIJFF, B. & LILL, R. 2001. Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J*, 20, 5626-35.
- DIEKERT, K., KISPAL, G., GUIARD, B. & LILL, R. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11752-7.
- DUMONT, M. E., ERNST, J. F. & SHERMAN, F. 1988. Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem*, 263, 15928-37.
- ESSER, K., TURSUN, B., INGENHOVEN, M., MICHAELIS, G. & PRATJE, E. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J Mol Biol*, 323, 835-43.
- FARRELL, S. R. & THORPE, C. 2005. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry*, 44, 1532-41.
- FASS, D. 2008. The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 557-66.
- FERNANDEZ-VIZARRA, E., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 200-11.
- FERRI, A., COZZOLINO, M., CROSIO, C., NENCINI, M., CASCIATI, A., GRALLA, E. B., ROTILIO, G., VALENTINE, J. S. & CARRI, M. T. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13860-5.

- FIELD, L. S., FURUKAWA, Y., O'HALLORAN, T. V. & CULOTTA, V. C. 2003. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem*, 278, 28052-9.
- FLOHE, L. & OTTING, F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 105, 93-104.
- FORMAN, H. J. & FRIDOVICH, I. 1973. On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *J Biol Chem*, 248, 2645-9.
- FOURY, F., ROGANTI, T., LECRENIER, N. & PURNELLE, B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 440, 325-31.
- FURUKAWA, Y., TORRES, A. S. & O'HALLORAN, T. V. 2004. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J*, 23, 2872-81.
- GABRIEL, K., MILENKOVIC, D., CHACINSKA, A., MULLER, J., GUIARD, B., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2007. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol*, 365, 612-20.
- GANDHI, C. R. 2012. Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5, 10.
- GASSER, S. M., OHASHI, A., DAUM, G., BOHNI, P. C., GIBSON, J., REID, G. A., YONETANI, T. & SCHATZ, G. 1982. Imported mitochondrial proteins cytochrome b2 and cytochrome c1 are processed in two steps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 267-71.
- GERBER, J., MUHLENHOFF, U., HOFHAUS, G., LILL, R. & LISOWSKY, T. 2001. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem*, 276, 23486-91.
- GLICK, B. S., BRANDT, A., CUNNINGHAM, K., MULLER, S., HALLBERG, R. L. & SCHATZ, G. 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, 69, 809-22.
- GOLDSTEINS, G., KEKSA-GOLDSTEINE, V., AHTONIEMI, T., JARONEN, M., ARENS, E., AKERMAN, K., CHAN, P. H. & KOISTINAHO, J. 2008. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, 283, 8446-52.
- GOTO, Y., NONAKA, I. & HORAI, S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348, 651-3.
- GRAY, M. W., BURGER, G. & LANG, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476-81.



- GROSS, D. P., BURGARD, C. A., REDDEHASE, S., LEITCH, J. M., CULOTTA, V. C. & HELL, K. 2011. Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system. *Mol Biol Cell*, 22, 3758-67.
- GROSS, E., SEVIER, C. S., VALA, A., KAISER, C. A. & FASS, D. 2002. A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol*, 9, 61-7.
- GRUMBT, B., STROOBANT, V., TERZIYSKA, N., ISRAEL, L. & HELL, K. 2007. Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, 282, 37461-70.
- GUEGAN, C., VILA, M., ROSOKLIJA, G., HAYS, A. P. & PRZEDBORSKI, S. 2001. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 21, 6569-76.
- GURNEY, M. E., PU, H., CHIU, A. Y., DAL CANTO, M. C., POLCHOW, C. Y., ALEXANDER, D. D., CALIENDO, J., HENTATI, A., KWON, Y. W., DENG, H. X. & ET AL. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-5.
- HAN, D., WILLIAMS, E. & CADENAS, E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J*, 353, 411-6.
- HANSSON PETERSEN, C. A., ALIKHANI, N., BEHBAHANI, H., WIEHAGER, B., PAVLOV, P. F., ALAFUZOFF, I., LEINONEN, V., ITO, A., WINBLAD, B., GLASER, E. & ANKARCORONA, M. 2008. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13145-50.
- HARTL, F. U., OSTERMANN, J., GUIARD, B. & NEUPERT, W. 1987. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell*, 51, 1027-37.
- HELL, K. 2008. The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 601-9.
- HELL, K., HERRMANN, J., PRATJE, E., NEUPERT, W. & STUART, R. A. 1997. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, 418, 367-70.
- HELL, K., HERRMANN, J. M., PRATJE, E., NEUPERT, W. & STUART, R. A. 1998. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2250-5.

- HELL, K., NEUPERT, W. & STUART, R. A. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J*, 20, 1281-8.
- HERLAN, M., BORNHOVD, C., HELL, K., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*, 165, 167-73.
- HERRMANN, J. M. & HELL, K. 2005. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 30, 205-11.
- HERRMANN, J. M. & RIEMER, J. 2012. Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *J Biol Chem*, 287, 4426-33.
- HOFHAUS, G., STEIN, G., POLIMENO, L., FRANCAVILLA, A. & LISOWSKY, T. 1999. Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. *Eur J Cell Biol*, 78, 349-56.
- HOFMANN, S., ROTHBAUER, U., MUHLENBEIN, N., BAIKER, K., HELL, K. & BAUER, M. F. 2005. Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol*, 353, 517-28.
- HOTTINGER, A. F., FINE, E. G., GURNEY, M. E., ZURN, A. D. & AEBISCHER, P. 1997. The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci*, 9, 1548-51.
- IEVA, R., SCHREMPP, S. G., OPALINSKI, L., WOLLWEBER, F., HOSS, P., HEISSWOLF, A. K., GEBERT, M., ZHANG, Y., GUIARD, B., ROSPERT, S., BECKER, T., CHACINSKA, A., PFANNER, N. & VAN DER LAAN, M. 2014. Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell*, 56, 641-52.
- IOMMARINI, L., PERALTA, S., TORRACO, A. & DIAZ, F. 2015. Part II: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in regulatory factors and other components required for mitochondrial function. *Mitochondrion*.
- JAISSWAL, M. K., ZECH, W. D., GOOS, M., LEUTBECHER, C., FERRI, A., ZIPPELIUS, A., CARRI, M. T., NAU, R. & KELLER, B. U. 2009. Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci*, 10, 64.
- JENSEN, L. T. & CULOTTA, V. C. 2005. Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem*, 280, 41373-9.

- KAWAMATA, H. & MANFREDI, G. 2008. Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Hum Mol Genet*, 17, 3303-17.
- KAWANO, S., YAMANO, K., NAOE, M., MOMOSE, T., TERAO, K., NISHIKAWA, S., WATANABE, N. & ENDO, T. 2009. Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14403-7.
- KHALIMONCHUK, O., RIGBY, K., BESTWICK, M., PIERREL, F., COBINE, P. A. & WINGE, D. R. 2008. Pet191 is a cytochrome c oxidase assembly factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 7, 1427-31.
- KIKUCHI, H., ALMER, G., YAMASHITA, S., GUEGAN, C., NAGAI, M., XU, Z., SOSUNOV, A. A., MCKHANN, G. M., 2ND & PRZEDBORSKI, S. 2006. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6025-30.
- KIRBY, K., JENSEN, L. T., BINNINGTON, J., HILLIKER, A. J., ULLOA, J., CULOTTA, V. C. & PHILLIPS, J. P. 2008. Instability of superoxide dismutase 1 of *Drosophila* in mutants deficient for its cognate copper chaperone. *J Biol Chem*, 283, 35393-401.
- KLOPPEL, C., SUZUKI, Y., KOJER, K., PETRUNGARO, C., LONGEN, S., FIEDLER, S., KELLER, S. & RIEMER, J. 2011. Mia40-dependent oxidation of cysteines in domain I of Ccs1 controls its distribution between mitochondria and the cytosol. *Mol Biol Cell*, 22, 3749-57.
- KOJER, K., BIEN, M., GANGEL, H., MORGAN, B., DICK, T. P. & RIEMER, J. 2012. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *EMBO J*, 31, 3169-82.
- KOZANY, C., MOKRANJAC, D., SICHTING, M., NEUPERT, W. & HELL, K. 2004. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 234-41.
- KRAYL, M., LIM, J. H., MARTIN, F., GUIARD, B. & VOOS, W. 2007. A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol Cell Biol*, 27, 411-25.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KUNKELE, K. P., HEINS, S., DEMBOWSKI, M., NARGANG, F. E., BENZ, R., THIEFFRY, M., WALZ, J., LILL, R., NUSSBERGER, S. & NEUPERT, W. 1998. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, 93, 1009-19.

- KURLAND, C. G. & ANDERSSON, S. G. 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 786-820.
- KYHSE-ANDERSEN, J. 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMB, A. L., TORRES, A. S., O'HALLORAN, T. V. & ROSENZWEIG, A. C. 2001. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol*, 8, 751-5.
- LAMB, A. L., WERNIMONT, A. K., PUFAHL, R. A., CULOTTA, V. C., O'HALLORAN, T. V. & ROSENZWEIG, A. C. 1999. Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol*, 6, 724-9.
- LAMB, A. L., WERNIMONT, A. K., PUFAHL, R. A., O'HALLORAN, T. V. & ROSENZWEIG, A. C. 2000. Crystal structure of the second domain of the human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry*, 39, 1589-95.
- LANG, B. F., GRAY, M. W. & BURGER, G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 33, 351-97.
- LANGE, H., LISOWSKY, T., GERBER, J., MUHLENHOFF, U., KISPAL, G. & LILL, R. 2001. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*, 2, 715-20.
- LEITCH, J. M., JENSEN, L. T., BOULDIN, S. D., OUTTEN, C. E., HART, P. J. & CULOTTA, V. C. 2009a. Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J Biol Chem*, 284, 21863-71.
- LEITCH, J. M., YICK, P. J. & CULOTTA, V. C. 2009b. The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 284, 24679-83.
- LEVITAN, A., DANON, A. & LISOWSKY, T. 2004. Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem*, 279, 20002-8.
- LI, Q., VANDE VELDE, C., ISRAELSON, A., XIE, J., BAILEY, A. O., DONG, M. Q., CHUN, S. J., ROY, T., WINER, L., YATES, J. R., CAPALDI, R. A., CLEVELAND, D. W. & MILLER, T. M. 2010. ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 21146-51.
- LIN, M. T. & BEAL, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-95.
- LISOWSKY, T. 1992. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet*, 232, 58-64.

- LISOWSKY, T. 1994. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 26, 15-20.
- LIU, X., KIM, C. N., YANG, J., JEMMERSON, R. & WANG, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-57.
- LIU, X. F., ELASHVILI, I., GRALLA, E. B., VALENTINE, J. S., LAPINSKAS, P. & CULOTTA, V. C. 1992. Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem*, 267, 18298-302.
- MAGRANE, J. & MANFREDI, G. 2009. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1615-26.
- MANNELLA, C. A., PFEIFFER, D. R., BRADSHAW, P. C., MORARU, II, SLEPCHENKO, B., LOEW, L. M., HSIEH, C. E., BUTTLE, K. & MARKO, M. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, 52, 93-100.
- MARGULIS, L. 1971. Symbiosis and evolution. *Sci Am*, 225, 48-57.
- MARTELLI, A., WATTENHOFER-DONZE, M., SCHMUCKER, S., BOUVET, S., REUTENAUER, L. & PUCCIO, H. 2007. Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet*, 16, 2651-8.
- MATZUK, M. M., DIONNE, L., GUO, Q., KUMAR, T. R. & LEOVITZ, R. M. 1998. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*, 139, 4008-11.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- MEISINGER, C., PFANNER, N. & TRUSCOTT, K. N. 2006. Isolation of yeast mitochondria. *Methods Mol Biol*, 313, 33-9.
- MESECKE, N., BIHLMAIER, K., GRUMBT, B., LONGEN, S., TERZIYSKA, N., HELL, K. & HERRMANN, J. M. 2008. The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. *EMBO Rep*, 9, 1107-13.
- MESECKE, N., TERZIYSKA, N., KOZANY, C., BAUMANN, F., NEUPERT, W., HELL, K. & HERRMANN, J. M. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 121, 1059-69.
- MESELSON, M. & YUAN, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217, 1110-4.
- MILENKOVIC, D., GABRIEL, K., GUIARD, B., SCHULZE-SPECKING, A., PFANNER, N. & CHACINSKA, A. 2007. Biogenesis of the essential Tim9-

- Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem*, 282, 22472-80.
- MOKRANJAC, D. & NEUPERT, W. 2005. Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans*, 33, 1019-23.
- MOKRANJAC, D. & NEUPERT, W. 2009. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 33-41.
- MOKRANJAC, D., PASCHEN, S. A., KOZANY, C., PROKISCH, H., HOPPINS, S. C., NARGANG, F. E., NEUPERT, W. & HELL, K. 2003a. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J*, 22, 816-25.
- MOKRANJAC, D., SICHTING, M., NEUPERT, W. & HELL, K. 2003b. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J*, 22, 4945-56.
- MORO, F., SIRRENBERG, C., SCHNEIDER, H. C., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. 1999. The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J*, 18, 3667-75.
- MULLER, J. M., MILENKOVIC, D., GUIARD, B., PFANNER, N. & CHACINSKA, A. 2008. Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell*, 19, 226-36.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- NAOE, M., OHWA, Y., ISHIKAWA, D., OHSHIMA, C., NISHIKAWA, S., YAMAMOTO, H. & ENDO, T. 2004. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, 279, 47815-21.
- NARGANG, F. E., DRYGAS, M. E., KWONG, P. L., NICHOLSON, D. W. & NEUPERT, W. 1988. A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem*, 263, 9388-94.
- NEUPERT, W. & BRUNNER, M. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 555-65.
- NEUPERT, W. & HERRMANN, J. M. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 723-49.
- NEWMAN, N. J. 1993. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch Neurol*, 50, 540-8.

- OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*, 276, 38388-93.
- PASCHEN, S. A., ROTHBAUER, U., KALDI, K., BAUER, M. F., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. 2000. The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J*, 19, 6392-400.
- PASCHEN, S. A., WAIZENEGGER, T., STAN, T., PREUSS, M., CYRKLAF, M., HELL, K., RAPAPORT, D. & NEUPERT, W. 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, 426, 862-6.
- PASINELLI, P. & BROWN, R. H. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*, 7, 710-23.
- PASINELLI, P., HOUSEWEART, M. K., BROWN, R. H., JR. & CLEVELAND, D. W. 2000. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13901-6.
- PAWLOWSKI, R. & JURA, J. 2006. ALR and liver regeneration. *Mol Cell Biochem*, 288, 159-69.
- PINTO, M. & MORAES, C. T. 2015. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med*, 85, 250-8.
- POTTING, C., WILMES, C., ENGMANN, T., OSMAN, C. & LANGER, T. 2010. Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J*, 29, 2888-98.
- PRATT, A. J., GETZOFF, E. D. & PERRY, J. J. 2012. Amyotrophic lateral sclerosis: update and new developments. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 2012, 1-14.
- PUFAHL, R. A., SINGER, C. P., PEARISO, K. L., LIN, S. J., SCHMIDT, P. J., FAHRNI, C. J., CULOTTA, V. C., PENNER-HAHN, J. E. & O'HALLORAN, T. V. 1997. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science*, 278, 853-6.
- RAE, T. D., TORRES, A. S., PUFAHL, R. A. & O'HALLORAN, T. V. 2001. Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem*, 276, 5166-76.
- RAPAPORT, D., KUNKELE, K. P., DEMBOWSKI, M., AHTING, U., NARGANG, F. E., NEUPERT, W. & LILL, R. 1998. Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol*, 18, 5256-62.
- REDDEHASE, S., GRUMBT, B., NEUPERT, W. & HELL, K. 2009. The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol*, 385, 331-8.

- REHLING, P., MODEL, K., BRANDNER, K., KOVERMANN, P., SICKMANN, A., MEYER, H. E., KUHLEBRANDT, W., WAGNER, R., TRUSCOTT, K. N. & PFANNER, N. 2003. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, 299, 1747-51.
- REINER, A., MEDINA, L., FIGUEREDO-CARDENAS, G. & ANFINSON, S. 1995. Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol*, 131, 239-50.
- RENTON, A. E., MAJOUNIE, E., WAITE, A., SIMON-SANCHEZ, J., ROLLINSON, S., GIBBS, J. R., SCHYMICK, J. C., LAAKSOVIRTA, H., VAN SWIETEN, J. C., MYLLYKANGAS, L., KALIMO, H., PAETAU, A., ABRAMZON, Y., REMES, A. M., KAGANOVICH, A., SCHOLZ, S. W., DUCKWORTH, J., DING, J., HARMER, D. W., HERNANDEZ, D. G., JOHNSON, J. O., MOK, K., RYTEN, M., TRABZUNI, D., GUERREIRO, R. J., ORRELL, R. W., NEAL, J., MURRAY, A., PEARSON, J., JANSEN, I. E., SONDERVAN, D., SEELAAR, H., BLAKE, D., YOUNG, K., HALLIWELL, N., CALLISTER, J. B., TOULSON, G., RICHARDSON, A., GERHARD, A., SNOWDEN, J., MANN, D., NEARY, D., NALLS, M. A., PEURALINNA, T., JANSSON, L., ISOVIITA, V. M., KAIVORINNE, A. L., HOLTITA-VUORI, M., IKONEN, E., SULKAVA, R., BENATAR, M., WUU, J., CHIO, A., RESTAGNO, G., BORGHERO, G., SABATELLI, M., HECKERMAN, D., ROGAEVA, E., ZINMAN, L., ROTHSTEIN, J. D., SENDTNER, M., DREPPER, C., EICHLER, E. E., ALKAN, C., ABDULLAEV, Z., PACK, S. D., DUTRA, A., PAK, E., HARDY, J., SINGLETON, A., WILLIAMS, N. M., HEUTINK, P., PICKERING-BROWN, S., MORRIS, H. R., TIENARI, P. J. & TRAYNOR, B. J. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72, 257-68.
- RICHARDSON, C., SMITH, T., SCHAEFER, A., TURNBULL, D. & GRIFFITHS, P. 2005. Ocular motility findings in chronic progressive external ophthalmoplegia. *Eye (Lond)*, 19, 258-63.
- RISSLER, M., WIEDEMANN, N., PFANNSCHMIDT, S., GABRIEL, K., GUIARD, B., PFANNER, N. & CHACINSKA, A. 2005. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol*, 353, 485-92.
- ROBBERECHT, W. & PHILIPS, T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 14, 248-64.
- ROE, J. A., BUTLER, A., SCHOLLER, D. M., VALENTINE, J. S., MARKY, L. & BRESLAUER, K. J. 1988. Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-



- superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives. *Biochemistry*, 27, 950-8.
- ROSEN, D. R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D. A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J. P., DENG, H. X. & ET AL. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- SATHASIVAM, S. 2010. Motor neurone disease: clinical features, diagnosis, diagnostic pitfalls and prognostic markers. *Singapore Med J*, 51, 367-72; quiz 373.
- SCHMIDT, P. J., RAE, T. D., PUFAHL, R. A., HAMMA, T., STRAIN, J., O'HALLORAN, T. V. & CULOTTA, V. C. 1999. Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 274, 23719-25.
- SEA, K. W., SHENG, Y., LELIE, H. L., KANE BARNESE, L., DURAZO, A., VALENTINE, J. S. & GRALLA, E. B. 2013. Yeast copper-zinc superoxide dismutase can be activated in the absence of its copper chaperone. *J Biol Inorg Chem*, 18, 985-92.
- SENKEVICH, T. G., WHITE, C. L., KOONIN, E. V. & MOSS, B. 2000. A viral member of the ERV1/ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12068-73.
- SEVIER, C. S., CUOZZO, J. W., VALA, A., ASLUND, F. & KAISER, C. A. 2001. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol*, 3, 874-82.
- SHI, P., GAL, J., KWINTER, D. M., LIU, X. & ZHU, H. 2010. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 45-51.
- SIDERIS, D. P. & TOKATLIDIS, K. 2007. Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol Microbiol*, 65, 1360-73.
- SIKORSKI, R. S. & HIETER, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 19-27.
- SIRRENBURG, C., BAUER, M. F., GUIARD, B., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. 1996. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384, 582-5.
- SON, M., PUTTAPARTHI, K., KAWAMATA, H., RAJENDRAN, B., BOYER, P. J., MANFREDI, G. & ELLIOTT, J. L. 2007. Overexpression of CCS in G93A-SOD1 mice leads to accelerated neurological deficits with severe mitochondrial pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6072-7.

- STAN, T., AHTING, U., DEMBOWSKI, M., KUNKELE, K. P., NUSSBERGER, S., NEUPERT, W. & RAPAPORT, D. 2000. Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J*, 19, 4895-902.
- STEINER, H., ZOLLNER, A., HAID, A., NEUPERT, W. & LILL, R. 1995. Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem*, 270, 22842-9.
- STOJANOVSKI, D., MULLER, J. M., MILENKOVIC, D., GUIARD, B., PFANNER, N. & CHACINSKA, A. 2008. The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 610-7.
- STRANGE, R. W., ANTONYUK, S. V., HOUGH, M. A., DOUCETTE, P. A., VALENTINE, J. S. & HASNAIN, S. S. 2006. Variable metallation of human superoxide dismutase: atomic resolution crystal structures of Cu-Zn, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes. *J Mol Biol*, 356, 1152-62.
- STURTZ, L. A., DIEKERT, K., JENSEN, L. T., LILL, R. & CULOTTA, V. C. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, 276, 38084-9.
- SUBRAMANIAM, J. R., LYONS, W. E., LIU, J., BARTNIKAS, T. B., ROTHSTEIN, J., PRICE, D. L., CLEVELAND, D. W., GITLIN, J. D. & WONG, P. C. 2002. Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci*, 5, 301-7.
- SUZUKI, Y., ALI, M., FISCHER, M. & RIEMER, J. 2013. Human copper chaperone for superoxide dismutase 1 mediates its own oxidation-dependent import into mitochondria. *Nat Commun*, 4, 2430.
- TAMURA, Y., IJIMA, M. & SESAKI, H. 2010. Mdm35p imports Ups proteins into the mitochondrial intermembrane space by functional complex formation. *EMBO J*, 29, 2875-87.
- TERZIYSKA, N., GRUMBT, B., BIEN, M., NEUPERT, W., HERRMANN, J. M. & HELL, K. 2007. The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett*, 581, 1098-102.
- TERZIYSKA, N., GRUMBT, B., KOZANY, C. & HELL, K. 2009. Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem*, 284, 1353-63.
- TERZIYSKA, N., LUTZ, T., KOZANY, C., MOKRANJAC, D., MESECKE, N., NEUPERT, W., HERRMANN, J. M. & HELL, K. 2005. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett*, 579, 179-84.

- TOKUDA, E., ONO, S., ISHIGE, K., WATANABE, S., OKAWA, E., ITO, Y. & SUZUKI, T. 2008. Ammonium tetrathiomolybdate delays onset, prolongs survival, and slows progression of disease in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 213, 122-8.
- TORRACO, A., PERALTA, S., IOMMARINI, L. & DIAZ, F. 2015. Mitochondrial Diseases Part I: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*, 21C, 76-91.
- URBAN, S., LEE, J. R. & FREEMAN, M. 2001. Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*, 107, 173-82.
- VAN DER LAAN, M., CHACINSKA, A., LIND, M., PERSCHIL, I., SICKMANN, A., MEYER, H. E., GUIARD, B., MEISINGER, C., PFANNER, N. & REHLING, P. 2005. Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol Cell Biol*, 25, 7449-58.
- VAN ES, M. A., DAHLBERG, C., BIRVE, A., VELDINK, J. H., VAN DEN BERG, L. H. & ANDERSEN, P. M. 2010. Large-scale SOD1 mutation screening provides evidence for genetic heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 562-6.
- VAN GOETHEM, G., LOFGREN, A., DERMAUT, B., CEUTERICK, C., MARTIN, J. J. & VAN BROECKHOVEN, C. 2003. Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle. *Hum Mutat*, 22, 175-6.
- VARABYOVA, A., TOPF, U., KWIATKOWSKA, P., WROBEL, L., KAUSDROBEK, M. & CHACINSKA, A. 2013. Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *FEBS J*, 280, 4943-59.
- VEHVILAINEN, P., KOISTINAHO, J. & GUNDARS, G. 2014. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*, 8, 126.
- VIAL, S., LU, H., ALLEN, S., SAVORY, P., THORNTON, D., SHEEHAN, J. & TOKATLIDIS, K. 2002. Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J Biol Chem*, 277, 36100-8.
- VOGTLE, F. N., BURKHART, J. M., RAO, S., GERBETH, C., HINRICHS, J., MARTINOU, J. C., CHACINSKA, A., SICKMANN, A., ZAHEDI, R. P. & MEISINGER, C. 2012. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol Cell Proteomics*, 11, 1840-52.
- VUKOSAVIC, S., DUBOIS-DAUPHIN, M., ROMERO, N. & PRZEDBORSKI, S. 1999. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 73, 2460-8.

- WECKBECKER, D., LONGEN, S., RIEMER, J. & HERRMANN, J. M. 2012. Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *EMBO J*, 31, 4348-58.
- WEISIGER, R. A. & FRIDOVICH, I. 1973. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 248, 4793-6.
- WIEDEMANN, N., KOZJAK, V., CHACINSKA, A., SCHONFISCH, B., ROSPERT, S., RYAN, M. T., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 424, 565-71.
- WILLIAMSON, D. 2002. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet*, 3, 475-81.
- WINZELER, E. A., SHOEMAKER, D. D., ASTROMOFF, A., LIANG, H., ANDERSON, K., ANDRE, B., BANGHAM, R., BENITO, R., BOEKE, J. D., BUSSEY, H., CHU, A. M., CONNELLY, C., DAVIS, K., DIETRICH, F., DOW, S. W., EL BAKKOURY, M., FOURY, F., FRIEND, S. H., GENTALIN, E., GIAEVER, G., HEGEMANN, J. H., JONES, T., LAUB, M., LIAO, H., LIEBUNDGUTH, N., LOCKHART, D. J., LUCAU-DANILA, A., LUSSIER, M., M'RABET, N., MENARD, P., MITTMANN, M., PAI, C., REBISCHUNG, C., REVUELTA, J. L., RILES, L., ROBERTS, C. J., ROSS-MACDONALD, P., SCHERENS, B., SNYDER, M., SOOKHAI-MAHADEO, S., STORMS, R. K., VERONNEAU, S., VOET, M., VOLCKAERT, G., WARD, T. R., WYSOCKI, R., YEN, G. S., YU, K., ZIMMERMANN, K., PHILIPPSEN, P., JOHNSTON, M. & DAVIS, R. W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285, 901-6.
- WONG, P. C., WAGGONER, D., SUBRAMANIAM, J. R., TESSAROLLO, L., BARTNIKAS, T. B., CULOTTA, V. C., PRICE, D. L., ROTHSTEIN, J. & GITLIN, J. D. 2000. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2886-91.
- WOODS, R. A. & GIETZ, R. D. 2001. High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast. *Methods Mol Biol*, 177, 85-97.
- WROBEL, L., TROJANOWSKA, A., SZTOLSZTENER, M. E. & CHACINSKA, A. 2013. Mitochondrial protein import: Mia40 facilitates Tim22 translocation into the inner membrane of mitochondria. *Mol Biol Cell*, 24, 543-54.
- WU, C. K., DAILEY, T. A., DAILEY, H. A., WANG, B. C. & ROSE, J. P. 2003. The crystal structure of augmenter of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *Protein Sci*, 12, 1109-18.
- YOST, F. J., JR. & FRIDOVICH, I. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 248, 4905-8.

ZADRAG, R., BARTOSZ, G. & BILINSKI, T. 2008. Is the yeast a relevant model for aging of multicellular organisms? An insight from the total lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Aging Sci*, 1, 159-65.

## 7 Publikation

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit entstand folgende Publikation:

Gross, D.P., **Burgard, C.A.**, Reddehase, S., Leitch, J.M., Culotta, V.C., Hell, K. (2011).

“Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system.”

Molecular Biology of the Cell 22(20):3758-67.

## 8 Abkürzungen

A	Ampère
AAC	ATP/ADP-Translokase
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Außenmembran der Mitochondrien
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMS	4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2-disulfonsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder (Bovine) Serum Albumin
ca.	circa
Ccs	Kupfer (Copper) Chaperon für Sod
C-terminal	Carboxyterminus
Cu	Kupfer
CxC	Cysteinrest-unbestimmter Aminosäurenrest-Cysteinrest
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, (-acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
Erv	essential for respiration and vegetative growth
et al.	et altera
FALS	familiäre Form der ALS
Fe	Eisen
h	Stunde
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
IM	Innere mitochondriale Membran
IMR	Intermembranraum

kb	Kilobasen, 1000 DNA-Basen
kDa	Tausend Dalton
LB	Luria-Bertani
Mia40	mitochondrial import and assembly 40
min	Minute
mM	milli-molar
Mn	Mangan
MP	Mitoplasten
mt	mitochondrial
n	Nano, 10 <sup>-9</sup>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure (acetic acid)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PCR	Polymerase-Ketten (chain)-Reaktion
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (Sodium) Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium (Sodium) Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunden
SOC	Super Optimal broth plus Glukose
Sod	Superoxid-Dismutase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte (buffered) Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure (acetic acid)
TIM	Translokase der inneren mitochondrialen Membran
TOM	Translokase der äußeren (outer) mitochondrialen Membran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit / Einheit
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
xg	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
YPD	Hefe Extrakt, Pepton und Glukose



## ABKÜRZUNGEN

---

YPGal	Hefe Extrakt, Pepton und Galaktose
Zn	Zink
$\beta$ -ME	2-Mercaptoethanol
$\Delta x$	Depletion von $x$
$\mu\text{g}$	Mikrogramm, $10^{-6}\text{g}$
$\mu\text{l}$	Mikroliter, $10^{-6}\text{l}$
$\mu\text{m}$	Mikrometer, $10^{-6}\text{m}$

## 9 Danksagung

Mein Dank geht zuerst an Herrn PD Dr. rer. nat. Kai Hell für die Übernahme und Betreuung der vorliegenden Arbeit, sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Besprechungen, die zum Abschluss und Erfolg meiner Promotion beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert und Herrn Prof. Dr. Andreas Ladurner möchte ich ebenfalls meinen Dank für die positive Arbeitsatmosphäre in ihrem Institut zukommen lassen.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Organisation und Betreuung des Promotionsstudiengangs „Molekulare und Systembiologische Medizin“ (FöFoLe), in dessen Rahmen und mit dieser Unterstützung die vorliegende Arbeit entstand.

Weiterhin möchte ich im Speziellen den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Hell“ danken, die immer für ein exzellentes Arbeitsklima und gegenseitige Unterstützung gesorgt haben und denen ich somit einen großen Teil meines erfolgreichen Abschlusses zu verdanken habe. Ein spezieller Dank geht insbesondere an Dr. rer. nat. Dominik Groß, der sich viel Zeit und Mühe für meine Betreuung genommen und mir als Mediziner großes Verständnis aus der Sichtweise eines „echten“ Naturwissenschaftlers entgegen gebracht hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Marta Blamowska und Frau Dr. rer. nat. Christina Schusdziarra für die ebenfalls große Unterstützung und auch für die netten Mittagspausen bedanken, die ich mit ihnen fast täglich genießen durfte.

Zuletzt bedanke ich mich bei den Personen, die es mir durch langjährige Geduld, Unterstützung und ihr Verständnis erst möglich gemacht haben, diese Arbeit zu beginnen, durchzuführen und abzuschließen: meinen Eltern, meinem Bruder Matthias und Tobias Trompeter.

