

Charakterisierung des Imports von Ccs1 und Pet191 in den Intermembranraum durch das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System

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

vorgelegt von
Dominik Peter Groß
aus München

München 2013

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, 27.05.2013,

(Dominik Groß)

Tag der mündlichen Prüfung: 09. September 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
 2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung
- Sondergutachter: PD Dr. Kai Hell

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Verwendete Abkürzungen

I Einleitung	1
I - 1 Proteinimport in Mitochondrien.....	1
I - 2 Proteinimport in den IMR.....	3
I - 3 Das Disulfid-Relay-System und seine Komponenten.....	4
I - 4 Substrate des Disulfid-Relay-Systems mit Zwillings-CX ₃ C- und CX ₉ C-Motiv.....	6
I - 5 Mechanismus des Disulfid-Relay-Systems.....	8
I - 6 Ein IMR-Protein mit Zwillings-CX ₉ C-Motiv: Pet191.....	11
I - 7 Ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems ohne Zwillings-CX _n C-Motiv: Ccs1.....	13
I - 8 Ziele dieser Arbeit.....	14
II Material und Methoden	16
II - 1 Geräte und Ausrüstung.....	16
II - 2 Computeranwendungen und Webseiten.....	17
II - 3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
II - 4 Enzyme.....	19
II - 5 Antibiotika.....	19
II - 6 Puffer und Lösungen.....	20
II - 7 Medien.....	21
II - 7.1 Bakterienmedien.....	21
II - 7.2 Hefemedien.....	22
II - 8 Biologisches Material.....	22
II - 9 Oligonukleotide.....	23
II - 10 Plasmide.....	24
II - 11 Kultivierungsmethoden.....	27
II - 11.1 Bakterienkultivierung.....	27
II - 11.2 Hefekultivierung.....	27
II - 11.3 Herstellen von Hefezellvorräten in Glycerin.....	27
II - 12 Molekularbiologische Methoden.....	28
II - 12.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNS.....	28
II - 12.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	28
II - 12.3 Ligation von DNS.....	29
II - 12.4 Transformation.....	30
II - 12.4.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	30

II - 12.4.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
II - 12.4.3 Transformation von Hefezellen.....	30
II - 12.5 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i>	31
II - 12.6 Reinigung von DNS aus Agarose und nach einem Restriktions- verdau.....	31
II - 12.7 Messung von DNS Konzentrationen.....	31
II - 12.8 Restriktionsverdau von DNS.....	32
II - 12.9 Sequenzierung.....	32
II - 13 Proteinbiochemische Methoden.....	32
II - 13.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
II - 13.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.....	33
II - 13.3 Autoradiografie.....	33
II - 13.4 Fällung von Proteinen mit TCA.....	34
II - 13.5 Gewinnung von Gesamtzellproteinen.....	34
II - 13.5.1 Gewinnung von Gesamtzellproteinen zur Analyse der Pro- teinmengen.....	34
II - 13.5.2 Gewinnung von Gesamtzellproteinen zur Analyse der Redoxzustände der Proteine.....	35
II - 13.6 Gewinnung von Zytosol zur Analyse der Redoxzustände der Proteine.....	35
II - 13.7 Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i>	36
II - 13.8 Reinigung rekombinanter Proteine.....	36
II - 13.8.1 GSH-Affinitätschromatographie.....	36
II - 13.8.2 Nickel-NTA-Reinigung von <i>HisErv1</i>	37
II - 13.9 <i>In vitro</i> Transkription und Translation radioaktiv markierter Pro- teine.....	37
II - 13.10 Fällung radioaktiv markierter Proteine.....	38
II - 13.11 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradfordtest).....	38
II - 13.12 Modifikation von Proteinen.....	38
II - 13.12.1 Proteinmodifikation mit AMS.....	38
II - 13.12.2 Proteinmodifikation mit IAA.....	39
II - 13.13 Behandlung von Proteinen mit DTT.....	39
II - 13.14 Interaktion von Ccs1 Domäne I (AS 1 - 74; Ccs1 dl) mit rekombi- nantem Mia40C.....	39
II - 13.15 <i>In vitro</i> Oxidation von Pet191 und Tim10 durch das Disulfid- Relay-System.....	40
II - 14 Methoden zur Arbeit in organello.....	41
II - 14.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen.....	41
II - 14.2 Proteinimport in den IMR von isolierten Mitochondrien.....	42
II - 14.3 Herstellung mitochondrialer Lysate.....	42
II - 14.4 Trypsinbehandlung von Mitochondrien.....	43

II - 14.5 Trypsinbehandlung von mitochondrialen Extrakten.....	43
II - 14.6 Erzeugung von Mitoplasten.....	44
II - 14.7 Präzipitation mitochondrialer Proteine mittels Nickel-NTA.....	44
II - 15 Immunologische Methoden.....	44
II - 15.1 Generierung von Antikörpern gegen Pet191.....	44
II - 15.2 Erzeugung von Serum aus Blut.....	45
II - 15.3 Reinigung der Antikörper.....	45
II - 15.4 Immunodekoration von Proteinen auf Nitrozellulosemembran.....	46
II - 15.5 Immunopräzipitation.....	47
III Ergebnisse.....	48
III - 1 Ccs1 – ein unkonventionelles Substrat des Disulfid-Relay-Systems.....	48
III - 1.1 Die mitochondriale Lokalisierung des Ccs1 ist abhängig von Cystein-Resten in Ccs1.....	48
III - 1.1.1 Vergleich der Expressionsmengen der Ccs1-Varianten in Hefezellen.....	48
III - 1.1.2 Vergleich der Proteinmengen an Ccs1-Varianten in Mitochondrien.....	49
III - 1.1.3 Bestätigung der mitochondrialen Lokalisation der Ccs1-Varianten.....	51
III - 1.1.4 Vergleich der Proteinmengen von nur mitochondrial lokalisierten Ccs1-Fusionsproteinen.....	52
III - 1.2 Spezifische Cystein-Reste in Ccs1 vermitteln den Mia40-abhängigen Import von Ccs1.....	53
III - 1.3 Mia40 interagiert mit Ccs1 vor allem über dessen Cysteinrest C64.....	56
III - 1.3.1 In der Importreaktion wird kein Disulfid-Intermediat zwischen der Ccs1-C27/64S-Variante und Mia40 detektiert.....	56
III - 1.3.2 Auch endogenes Ccs1 interagiert vor allem über seinen Cystein-Rest C64 mit Mia40.....	58
III - 1.3.3 Die rekombinante Domäne I von Ccs1 interagiert mit Mia40.....	60
III - 1.4 Der Redoxzustand der Ccs1-Varianten.....	61
III - 1.4.1 Ccs1 weist in Mitochondrien eine stabile Disulfidbrücke auf.....	61
III - 1.4.2 Die stabile Disulfidbrücke ist auch in den Ccs1-Fusionsproteinen vorhanden.....	63
III - 1.4.3 In zytosolischem Ccs1 findet sich keine stabile Disulfidbrücke.....	64
III - 1.5 Der Einfluss der Ccs1 Varianten auf den Redoxzustand von Sod1 in Mitochondrien.....	65

III - 1.6 Die Sensitivität des Ccs1 und der Ccs1-Variante C27/64S gegenüber Trypsin.....	67
III - 1.6.1 Die mitochondriale Ccs1-Variante C27/64S ist empfindlicher gegenüber dem Verdau mit Trypsin als WT-Ccs1.....	67
III - 1.6.2 Die Ccs1-Fusionsprotein-Variante C27/64S ist auch sensitiv gegenüber Trypsinverdau.....	68
III - 1.7 Lokalisierung einer Cystein-freien Ccs1-Variante.....	69
III - 1.7.1 Die Expression der Cystein-freien Ccs1-Variante ist in Zellen erhöht.....	69
III - 1.7.2 Die Menge der Cystein-freien Ccs1-Variante in Mitochondrien ist unabhängig von der Menge an Mia40.....	70
III - 2 Pet191 – ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems.....	72
III - 2.1 Abhängigkeit der Mengen an Pet191 in Mitochondrien von Mia40 und Erv1.....	72
III - 2.1.1 In Mitochondrien mit verringerten Mengen an Mia40 liegt weniger Pet191 vor.....	72
III - 2.1.2 In Mitochondrien mit verringerten Mengen an Erv1 liegt weniger Pet191 vor.....	74
III - 2.2 Der Import von Pet191 in Mitochondrien.....	75
III - 2.2.1 Die Zugabe von ATP und NADH hat keinen Einfluss auf den in vitro Import von Pet191.....	75
III - 2.2.2 Bei steigender DTT-Konzentration nimmt der in vitro Import von Pet191 ab.....	76
III - 2.2.3 Der in vitro Import von Pet191 hängt von den mitochondrialen Mengen an Mia40 ab.....	78
III - 2.2.4 Der in vitro Import von Pet191 benötigt funktionelles Erv1.....	79
III - 2.3 Der Redoxzustand von Pet191 in Mitochondrien.....	80
III - 2.3.1 Pet191 bildet stabile Disulfidbrücken.....	80
III - 2.3.2 Die Stabilität der Disulfidbrücken von Pet191 ändert sich nach einer TCA-Fällung.....	82
III - 2.4 In vitro Rekonstitution der Bildung von Disulfidbrücken in Pet191 durch das Disulfid-Relay-System.....	83
III - 2.5 Interaktion von Pet191 mit Mia40.....	85
III - 2.5.1 Radioaktiv markiertes Pet191 interagiert mit Mia40 nach in vitro Import.....	85
III - 2.5.2 Ein Disulfid-Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 bildet sich in isolierten Mitochondrien.....	87
III - 2.5.3 Mehr Erv1 verringert die Menge des Intermediats in isolierten Mitochondrien nicht.....	89

IV Diskussion	91
IV - 1 Ccs1.....	91
IV - 1.1 Der Importweg von Ccs1 in Mitochondrien.....	91
IV - 1.2 Die Interaktion von Ccs1 mit Mia40.....	92
IV - 1.3 Der Redoxzustand von Ccs1 in Mitochondrien.....	94
IV - 1.4 Die stabile Faltung von Ccs1.....	94
IV - 1.5 Modell der Biogenese von Ccs1.....	95
IV - 2 Pet191.....	97
IV - 2.1 Der Import von Pet191 in Mitochondrien.....	97
IV - 2.2 Der Redoxzustand von Pet191 in Mitochondrien.....	98
IV - 2.3 Die Interaktion von Pet191 mit Mia40.....	99
IV - 2.4 Erkenntnisse zur Biogenese von Pet191.....	100
Referenzen	102
Veröffentlichungen	112
Lebenslauf	113
Danksagung	114

Zusammenfassung

Das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System sorgt für den Import von Proteinen mit Cysteinresten in den Intermembranraum (IMR) von Mitochondrien. Die beschriebenen klassischen Substrate dieses Systems tragen ein Zwillings-CX₉C- oder -CX₃C-Motiv, das für den Import der Substrate in den IMR von Mitochondrien essentiell ist. Zwischen den Cysteinresten baut Mia40 Disulfidbrücken ein und vermittelt über diese oxidative Faltung den Import der Substrate in den IMR.

Kürzlich sind allerdings weitere Substrate des Disulfid-Relay-Systems beschrieben worden. Ein im IMR lokalisiertes Protein mit sieben Cysteinen, aber ohne eines der oben genannten Cysteinmotive ist das Kupferchaperon von Sod1, Ccs1. Dieses Multidomänenprotein ist sowohl im Zytosol als auch im IMR lokalisiert und sein Import hängt vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System ab (Reddehase *et al.*, 2009). Es ist jedoch unbekannt, wie Ccs1 mechanistisch durch das Disulfid-Relay-System importiert wird. Weist das Ccs1 Disulfidbrücken auf und spielen bestimmte Cysteine für seinen Import eine Rolle? Um diese Fragen zu beantworten, wurden in dieser Arbeit Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 untersucht. Zunächst wurde die Lokalisation dieser Varianten charakterisiert. Ccs1 wird ohne das Cystein C64 nicht effektiv in Mitochondrien importiert und die Lokalisation dieser Variante wird auch nicht wesentlich von der Menge an Mia40 beeinflusst. In Interaktionsexperimenten stellte sich heraus, dass Mia40 mit Ccs1 über dieses Cystein interagiert. In mitochondrialem Ccs1 konnte eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 nachgewiesen werden, die in zytosolischem Ccs1 nicht beobachtet wurde. Ohne dieses Cysteinpaar erwies sich mitochondriales Ccs1 empfindlicher gegenüber einem Verdau mit Trypsin. Obwohl Ccs1 kein Zwillings-CX_nC-Motiv trägt, baut Mia40 also eine Disulfidbrücke in das Protein ein, die wichtig für dessen Stabilität ist, und lokalisiert diese Fraktion von Ccs1 im IMR. Die Effizienz des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems beeinflusst somit die Verteilung von Ccs1 zwischen Zytosol und dem mitochondrialen IMR.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Pet191, ein kleines IMR-Protein mit einem Zwillings-CX₉C-Motiv, untersucht. Interessanterweise sind nicht nur vier, sondern sechs seiner sieben Cysteine konserviert. Obwohl Pet191 mit seiner geringe Größe und seinem Cyste-

inmotiv den bisher bekannten Mia40-Substraten stark ähnelt, wurde beschrieben, dass der Import dieses Proteins von funktionellem Erv1 unabhängig sei (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte bestimmt werden, ob der Import von Pet191 in den IMR komplett vom Disulfid-Relay-System unabhängig ist und ob die Biogenese des Proteins, z.B. die Oxidation und Faltung, das Disulfid-Relay-System benötigt. Untersuchungen zu den Proteinmengen von Pet191 in Mitochondrien mit herunterregulierten Mengen an Mia40 und Erv1 zeigten, dass die Menge von Pet191 von den Mengen an Mia40 und Erv1 abhängig ist. Mit diesen Ergebnissen und durch *in vitro* Importe von Pet191 in isolierte Mitochondrien konnten die bisherigen Studien widerlegt werden und nachgewiesen werden, dass der Import dieses Proteins vom Disulfid-Relay-System abhängt und sich Pet191 bezüglich der Parameter des Imports wie ein Substrat dieses Systems verhält. Pet191 interagiert mit Mia40 und trägt mindestens zwei Disulfidbrücken, die von Mia40 in das Protein eingebaut werden. Diese Ergebnisse charakterisieren Pet191 als Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems.

Verwendete Abkürzungen

Abb	Abbildung
AMS	4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2-disulfonsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder (Bovine) Serum Albumin
C-term	Carboxyterminal, Carboxyterminus
ca	circa
Ccs1-dI	Domäne I von Ccs1 (AS 1 bis 74)
ddH ₂ O	bidestiliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
IAA	Iodoacetamid
IgG	Immunglobulin G
IMR	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
ITS	Intermembranspace (IMR) Targeting Sequence
kb	Kilobase, 1000 DNS-Basen
kDa	Tausend Dalton
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithium-Acetat
Mia40C	C-terminales Fragment von Mia40 (AS 284 bis 403)
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
N-term	Aminoterminal, Aminotermisus
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure (acetic acid)
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (Sodium) Dodecylsulfat
SH	Sorbitol, Hepes
SOC	Super Optimal broth plus Glukose
SS-DNS	<i>salmon sperm</i> -DNS
STI	Sojabohnen Trypsin Inhibitor
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Abkürzungen

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte (buffered) Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure (acetic acid)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> / Einheit
usw	Und so weiter
v/v	Volumen pro Volumen
vgl	vergleiche
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YPD	Hefe Extrakt, Pepton und Glukose
YPGal	Hefe Extrakt, Pepton und Galaktose
β-ME	2-Mercaptoethanol

I Einleitung

I - 1 Proteinimport in Mitochondrien

Mitochondrien in Hefe enthalten ca. 850 verschiedene Proteine (Reinders *et al.*, 2006). Nur eine Hand voll dieser Proteine werden von den Organellen selbst kodiert und synthetisiert. Die meisten Proteine werden im Zellkern kodiert, im Zytosol translatiert und müssen in die Mitochondrien importiert werden (Neupert und Herrmann, 2007). Mitochondrien bestehen aus vier Subkompartimenten: der Matrix, der äußeren Membran, der inneren Membran und dem Intermembranraum (IMR). Es haben sich verschiedene Systeme entwickelt, um die Proteine spezifisch zu ihrem Zielkompartiment zu transportieren.

Alle im Zytosol translatierten Proteine passieren die äußere Membran ungefaltet durch den TOM (translocase of the outer membran)-Komplex. Diese Translokase besteht aus dem porenformenden Protein Tom40 und verschiedenen Rezeptorproteinen (van der Laan *et al.*, 2006; Neupert und Herrmann, 2007). Nach der Passage durch die äußere Membran teilen sich die Importwege der importierten Proteine und diese werden durch weitere spezialisierte Systeme in ihr jeweiliges Zielkompartiment geleitet.

Hydrophobe Proteine mit β -Fass Struktur, die in die äußere Membran integriert werden sollen, werden durch Chaperonkomplexe der kleinen Tims durch den hydrophilen IMR zum TOB (topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins)/SAM (sorting and assembly machinery)-Komplex gebracht, der sie in die Membran inseriert (Wiedemann *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2006). Andere Proteine der äußeren Membran mit einzelnen oder multiplen α -Helices als Transmembrandomänen werden durch den MIM-Komplex (mitochondrial import), bestehend aus Mim1 und Mim2, in die Membran inseriert (Dimmer *et al.*, 2012).

Proteine, die in die Matrix importiert werden sollen, tragen ein abspaltbares, N-term. Matrix-Sortierungs-Signal (Präsequenz). Dieses amphipathische Signal besteht aus einer Helix, die auf einer Seite positivgeladene, auf der anderen Seite hydrophobe AS trägt. In den meisten Fällen wird dieses Importsignal in der Matrix proteolytisch abgespalten. Die Translokation in die Matrix geschieht durch die TIM23 (translocase of the inner

membrane)-Translokase. Dazu wird ein Membranpotential über die Innenmembran und ATP benötigt (Neupert und Brunner, 2002; Neupert und Herrmann, 2007). TOM-Komplex und TIM23-Translokase sind in der äußeren bzw. inneren Membran der Mitochondrien übereinander positioniert und arbeiten so besonders effektiv zusammen (Schwaiger *et al.*, 1987).

Für Proteine, die in die innere Membran inserieren, gibt es drei verschiedene Wege. Einerseits gibt es ein Stopp-Transfer-System, das ebenfalls die TIM23-Translokase benutzt. Substrate dieses Weges tragen eine N-term. Präsequenz ähnlich der, die oben für den Matriximport beschrieben wurde. C-term. von diesem Signal folgt zusätzlich ein hydrophobes Segment. Anders als die Matrixproteine arretieren diese Substrate in der TIM23-Translokase und werden seitlich in die innere Membran freigesetzt. Dieser Importweg benötigt das Membranpotential über die innere Membran (van Loon *et al.*, 1986; Glaser *et al.*, 1990). Ein Beispielsubstrat für diesen Importweg ist Mia40 (Naoé *et al.*, 2004). Ein zweiter Importweg stellt die membranpotentialabhängige Insertion über eine andere Translokase in der inneren Membran dar, über den TIM22-Komplex (Káldi *et al.*, 1998). Der TIM22-Komplex ist darauf spezialisiert, Proteine in die innere Membran einzubauen. Seine Substrate tragen multiple Transmembransegmente und sind häufig Transporter oder Translokasekomponenten. Beispiele sind Tim23, Tim17, Tim22 oder AAC (ADP/ATP carrier). Diese hydrophoben Proteine tragen interne Signalsequenzen und werden mittels Chaperonkomplexe der kleinen Tims durch den hydrophilen IMR zum TIM22-Komplex geleitet (Sirrenberg *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 1999b; Leuenberger *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 2002). Der dritte Weg der Insertion in die innere Membran erfolgt nach dem Import der Präproteine in die Matrix. Oxa1 (oxidase assembly) baut die Substrate dieses Weges von der Matrixseite in die Membran ein. Dieser Weg spiegelt Proteinsortierungswege in den bakteriellen Vorläufern der Mitochondrien wieder und wird deshalb als konservative Sortierung bezeichnet. Ein Substrat dieses Importweges ist beispielsweise Oxa1 selbst. Über dieses System werden auch die mitochondrial-codierten Proteine in die innere Membran eingebaut, die in der Matrix synthetisiert werden. Beispiele hierfür sind Komponenten der Atmungskette, wie Cox1, Cox2 und Cox3 (cytochrome *c* oxidase) (Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001). Aber es gibt Hinweise, dass die Importsysteme nicht nur streng getrennt arbeiten. Mdl1 (multidrug

resistance-like), ein Protein der inneren Membran mit sechs Transmembrandomänen und komplexer Topologie, benötigt sowohl das Stopp-Transfer-System der TIM23-Translokase als auch die konservative Sortierung des Oxa1-Komplexes für seine Biogenese (Bohnert *et al.*, 2010).

I - 2 Proteinimport in den IMR

Die meisten Proteine des IMR haben ein niedriges Molekulargewicht. Sie haben wichtige Funktionen in verschiedenen Prozessen wie metabolischen Reaktionen, Metabolit- und Proteintransport zwischen äußerer und innerer Membran oder der Kontrolle des regulierten Zelltods (Neupert und Herrmann, 2007). Der Proteinimport in den IMR erfolgt auf verschiedenen Wegen und wird ebenfalls durch Translokasen sichergestellt (Herrmann und Hell, 2005).

Einer dieser Wege bedient sich der TIM23-Translokase. Nicht alle Proteine mit amphipathischer Präsequenz und darauf folgendem hydrophobem Segment, die das oben beschriebene Stopp-Transfer-System nutzen, enden als integrierte Membranproteine in der inneren Membran, sondern einige davon auch im IMR. Nach Einbau dieser Proteine in die innere Membran entfernt die Protease MPP (mitochondrial-processing peptidase) die oben beschriebene amphipathische Präsequenz am N-term. des Proteins. Der IMP (inner membrane peptidase)-Proteasekomplex prozessiert meist die Präproteine im IMR weiter und schneidet auf der IMR-Seite nach ihrer Transmembrandomäne. Dadurch landet das reife Protein löslich im IMR. Dieser Importweg ist abhängig vom Membranpotential über der Innenmembran, aber nicht in allen Fällen von Matrix-ATP. Ein Beispielsubstrat für diesen Weg ist Cytochrom b_2 (Glick *et al.*, 1992; Hahne *et al.*, 1994; Bömer *et al.*, 1997b; Neupert und Herrmann, 2007).

Andere Importwege in den IMR sind nicht abhängig von einer Präsequenz. Interne Signale in diesen Substraten sind teilweise bekannt (Herrmann und Hell, 2005). Bei einem dieser präsequenz-unabhängigen Importwege werden Proteine durch Assoziation mit der Außen- oder Innenmembran, vermutlich über Membranproteine, im IMR gehalten. Dieser Weg benötigt den TOM-Komplex als einzige Translokase und ist unabhängig von

Membranpotential und ATP. Beispiele sind Hämlyasen wie CCHL (cytochrome *c* heme lyase) (Steiner *et al.*, 1995; Diekert *et al.*, 1999).

Ein weiterer Importweg bedient sich des sogenannten *folding trap*-Mechanismus. Dabei werden Kofaktoren wie Metallionen in Proteine eingebaut und sie dadurch stabil gefaltet. Die gefalteten Proteine können den IMR nicht mehr verlassen und sind dort lokalisiert. Cytochrom *c* wird beispielsweise durch den Einbau eines Kofaktors durch CCHL zur Faltung angeregt und so im IMR lokalisiert (Dumont *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1991; Lutz *et al.*, 2003)

Auch ein anderer Mechanismus bedient sich der *folding trap*. Jedoch wird in diesem Fall kein Kofaktor in das Protein eingebaut. 2005 wurde ein Mechanismus beschrieben, der Proteine im IMR oxidativ faltet, indem er Disulfidbrücken in seine Substrate einbaut, und dadurch in diesem Subkompartiment hält: das Disulfid-Relay-System (Mesecke *et al.*, 2005). Dieses System, seine Komponenten, sein Wirkmechanismus und seine Substrate sollen im Weiteren detailliert beschrieben werden.

I - 3 Das Disulfid-Relay-System und seine Komponenten

Die IMR Proteine Mia40 (mitochondrial IMS import and assembly) und Erv1 (essential for respiratory growth and viability) repräsentieren die zentralen Komponenten des Disulfid-Relay-Systems. Beide Proteine sind in Eukaryonten weit verbreitet und stark konserviert. Sie sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefe (Lee *et al.*, 2000; Chacinska *et al.*, 2004; Naoé *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Wenn das Disulfid-Relay-System in seiner Funktion beeinträchtigt ist, indem die Mengen von Mia40 oder Erv1 herunterreguliert sind, sind die Proteinmengen der Substrate dieses Systems in Mitochondrien stark verringert (Mesecke *et al.*, 2005; Terziyska *et al.*, 2007; Reddehase *et al.*, 2009).

Mia40 hat ein Molekulargewicht von 44,5 kDa und verfügt über eine ca. 8 kDa große konservierte Domäne, die ein redoxaktives CPC-Motiv mit einer katalytisch aktiven Disulfidbrücke und ein strukturelles, oxidiertes Zwillings-CX₉C-Motiv enthält (Naoé *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2009; Banci *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2009). Diese Domäne befindet sich im IMR (Naoé *et al.*, 2004). Die Struktur dieser Domäne von Mia40 in Hefe

bildet eine hydrophobe Grube, in der sich eine α -Helix eines Substrats anlagern kann. Das redoxaktive Cysteinpaar von Mia40 ist dabei so positioniert, dass es auf das Substrat zugreifen kann (Kawano *et al.*, 2009). In Pilzen ist Mia40 über ein N-term. Transmembransegment in der inneren Membran verankert. Dieses Ankersegment sorgt für den Import von Mia40 über das Stopp-Transfer-System. Es ist nicht essentiell für die Funktion des Proteins und findet sich nicht in Tieren oder Pflanzen (Naoé *et al.*, 2004; Chacinska *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2005; Grumbt *et al.*, 2007).

Über die essentielle Rolle von Erv1 für die Lebensfähigkeit der Hefe wurde schon 1992 berichtet. Eine Tetradenanalyse zeigte, dass Sporen mit zerstörtem *ERV1*-Gen einen starken Wachstumsdefekt aufwiesen und ihr Wachstum nach 3 – 4 Tagen einstellten (Lisowsky *et al.*, 1992). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die temperatursensitive Mutante *pet-ts492*, die während des Wachstums unter restriktiver Temperatur Probleme in der Synthese mitochondrial-kodierter Proteine aufwies, einer Mutation im *ERV1*-Gen entsprach (Lisowsky *et al.*, 1992). Die Flavin-bindende Sulphydryloxidase Erv1 ist im IMR lokalisiert und dient als Reaktivator von Mia40, indem sie das funktionelle Cysteinpaar im CPC-Motiv oxidiert, das im Laufe der Funktion von Mia40 reduziert wird (siehe I - 5) (Lee *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001; Grumbt *et al.*, 2007; Terziyska *et al.*, 2009). Erv1 ist 22 kDa groß und besteht aus zwei Domänen: einer flexiblen, wenig strukturierten N-term. Region (Shuttle Domäne) und einer C-term. Region, an die der Kofaktor FAD gebunden ist (FAD Domäne) (Lee *et al.*, 2000; Coppock und Thorpe, 2006; Fass, 2008; Guo *et al.*, 2012). In der konservierten FAD Domäne bilden zwei Cysteine, C159 und C176, eine strukturelle Disulfidbrücke, die von Mia40 während des Imports von Erv1 in den IMR eingebaut wird (Kallergi *et al.*, 2012). Mittels seiner FAD Domänen bildet Erv1 nicht-kovalente Homodimere. Elektronen fließen von Mia40 auf ein CXXC-Motiv in der Shuttle Domäne (C30 und C33) und von dort auf das CXXC-Motiv in der FAD Domäne des Partnerproteins (C130 und C133). Anschließend werden die Elektronen auf das FAD übertragen (Bien *et al.*, 2010; Lionaki *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012). In Pilzen und in anderen untersuchten Eukaryonten wird das FAD durch Cytochrome *c* oxidiert. Dadurch gehen die Elektronen in den Elektronenfluss der Atmungskette ein. Weiterhin kann Erv1 Elektronen auf O₂ unter Bildung von Wasser-

stoffperoxid übertragen, das von der Cytochrom *c* Peroxidase zu H₂O reduziert wird (Farrell *et al.*, 2005; Bihlmaier *et al.*, 2007; Dabir *et al.*, 2007; Eckers *et al.*, 2013).

Eine weitere Komponente des Disulfid-Relay-Systems ist Hot13 (helper of tim). Das IMR-Protein ist 13,5 kDa groß, trägt 11 Cysteine und ist nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefe. Es bindet Zink und ist innerhalb der Eukaryonten konserviert. Hot13 wurde zuerst als Faktor identifiziert, der für die Bildung der Komplexe der kleinen Tims im IMR nötig ist (Curran *et al.*, 2004). Spätere Studien zeigten, dass es mit Mia40 interagiert und dieses Zink-frei hält, damit Mia40 effektiv von Erv1 oxidiert werden kann (Mesecke *et al.*, 2008).

I - 4 Substrate des Disulfid-Relay-Systems mit Zwillings-CX₃C- und CX₉C-Motiv

Die meisten bekannten Substrate des Disulfid-Relay-Systems sind klein und haben eine Helix-Bogen-Helix Konformation, wobei die beiden Helices mit zwei Disulfidbrücken verbunden sind (Abajian *et al.*, 2004; Arnesano *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2009). Die Cysteine, die diese Brücken ausbilden, sind entweder durch drei oder durch neun AS getrennt. Diese Sequenzmotive werden Zwillings-CX₃C- bzw. Zwillings-CX₉C-Motive genannt. In Hefemitochondrien existieren 15 Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv und fünf Proteine mit Zwillings-CX₃C-Motiv. Die meisten davon sind bis zum Menschen konserviert (Gabriel *et al.*, 2007; Longen *et al.*, 2009). Mia40 selbst trägt auch ein Zwillings-CX₉C-Motiv. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass die Cysteine des Zwillings-CX₉C-Motivs von Hefe Mia40 oxidiert werden können (Grumbt *et al.*, 2007). Dieses Motiv und vermutlich auch seine Oxidation sind wichtig für eine stabile Faltung von Hefe Mia40 (Terziyska *et al.*, 2009). Wie oben beschrieben (s. I - 3) verfügt Mia40 in Tieren und Pflanzen nur über seine C-term. aktive Domäne und besitzt keine N-term. Domäne und keine Präsequenz (Hofmann *et al.*, 2005). Mia40 wird in Tieren und Pflanzen also nicht über das Stopp-Transfer-System wie in Hefe importiert. Der Import geschieht wie bei einem typischen Substrat des Disulfid-Relay-Systems mit Zwillings-CX_nC-Motiv über Mia40 im IMR (Chacinska *et al.*, 2008). Zusätzlich spielt ALR (aug-

menter of liver regeneration, menschliches Homolog von Erv1) eine Rolle bei der richtigen Lokalisation und Biogenese von humanem Mia40 (Sztolsztener *et al.*, 2013).

Alle bekannten Proteine mit Zwillings-CX₃C-Motiv gehören zu den kleinen Tims, die Chaperon-Aufgaben im IMR übernehmen, indem sie – wie oben beschrieben (s. I - 1) – hydrophobe Präproteine durch den hydrophilen IMR geleiten (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998; Hoppins und Nargang, 2004). Die kleinen Tims formen heterohexamere Komplexe (Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1999a; Curran *et al.*, 2002). Vor der Bildung dieser aktiven Chaperonkomplexe müssen die intramolekularen Disulfidbrücken geknüpft werden (Lu *et al.*, 2004).

Die Rolle der Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv ist vielfältiger. Viele sind am Aufbau des Komplexes IV der Atmungskette beteiligt (Longen *et al.*, 2009). Das Protein Cox17 beispielsweise liefert Kupfer an Cox1 und Cox2, Untereinheiten von Komplex IV. *In vitro* ist die Bindung von Kupfer an Cox17 redoxreguliert (Glerum *et al.*, 1996; Carr und Winge, 2003; Abajian *et al.*, 2004). Auch für Cox19 und Cox 23 – deren Struktur Cox17 ähnelt – wird eine Beteiligung am Kupfertransport vermutet, auch wenn sie Kupfer vielleicht nicht direkt binden (Nobrega *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2004; Rigby *et al.*, 2007). Es gibt allerdings auch Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv, die nicht in den Aufbau des Komplexes IV involviert sind. Da ist zum einen Mdm35, das für den stabilen Import von Ups1, Ups2 und Ups3 sorgt. Diese drei Faktoren sind wichtig für die Lipid-Homöostasis in Mitochondrien (Tamura *et al.*, 2009; Potting *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel ist Som1, die dritte Untereinheit des IMP-Komplexes, der Peptide im IMR prozessiert (Jan *et al.*, 2000; Longen *et al.*, 2009).

Interessanterweise gibt es erste Untersuchungen, nach denen es weitere Substrate des Disulfid-Relay-Systems gibt, die kein Zwillings-CX_nC-Motiv aufweisen. Bisher beschrieben wurden zum einen Erv1, das selbst eine Komponente dieses Systems ist, und zum anderen Ccs1, das unten ausführlich beschrieben wird (s. I - 7) (Terziyska *et al.*, 2007; Reddehase *et al.*, 2009).

I - 5 Mechanismus des Disulfid-Relay-Systems

Der Mechanismus des Imports der Substrate in den IMR von Mitochondrien durch das Disulfid-Relay-System ist für Substrate mit Zwillings-CX_nC-Motiv gut verstanden. Die Substrate können den TOM-Komplex nur entfaltet und reduziert passieren und in den IMR gelangen (Lutz *et al.*, 2003; Morgan und Lu, 2008). Im Zytosol werden die Substrate durch Zinkbindung und durch das Thioredoxinsystem reduziert und damit importkompetent gehalten (Morgan *et al.*, 2009; Durigon *et al.*, 2012). Nachdem das Substrat in den IMR gelangt ist, interagiert es mit Mia40 (s. Abb. 1). Durch diese Interaktion wird die Faltung der ersten α -Helix des Substrates durch eine Chaperonfunktion von Mia40 ausgelöst. Diese Faltung führt wiederum zur Mia40-unabhängigen Faltung der zweiten α -Helix (Banci *et al.*, 2010). Mia40 oxidiert dann die Cysteine des Substrates und führt intramolekulare Disulfidbrücken in das Protein ein, die die beiden α -Helices des Substrates verbinden (Mesecke *et al.*, 2005; Arnesano *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2009; Terziyska *et al.*, 2009). Durch die dadurch induzierte stabile Faltung des Substrates kann das Protein den IMR durch den TOM-Komplex nicht mehr verlassen und ist im IMR lokalisiert. Erv1 oxidiert schließlich das redoxaktive CPC-Motiv von Mia40, damit Mia40 ein weiteres Substrat oxidieren kann (Mesecke *et al.*, 2005).

Die Substrate des Disulfid-Relay-Systems bleiben nach ihrer Oxidation durch Mia40 trotz der reduzierenden Bedingungen des IMR oxidiert. Dies konnte beispielhaft an Tim10 gezeigt werden, das unter dem IMR-ähnlichen reduzierenden Redoxbedingungen (10 mM GSH) oxidiert blieb (Lu und Woodburn, 2005).

Die Substrate des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems verfügen über ein internes Sortierungssignal. Dieses ITS (IMS-targeting signal) beruht auf einer bestimmten Komposition von hydrophoben Aminosäuren zusammen mit einem Cystein ([Ar]XX[Hy][Hy]XXC, Sideris *et al.*, 2009; auch genannt MISS, mitochondrial IMS-sorting signal; Milenkovic *et al.*, 2009), wodurch eine α -Helix mit einer hydrophoben Seite gebildet wird. Die Präproteine binden an Mia40 über dieses ITS (Sideris *et al.*, 2009). Dies erklärt die Beobachtung, dass nicht alle Cysteine des Zwillings-CX_nC-Motivs im Substrat gleich wichtig für dessen Interaktion mit Mia40 und dessen Import in Mitochondrien sind (Milenkovic *et al.*, 2007; Sideris *et al.*, 2007). Bei der Interaktion von Mia40 mit dem Substrat beruht

die erste Wechselwirkung vermutlich auf Anziehungskräfte zwischen der hydrophoben Seite der α -Helix des Substrates mit der hydrophoben Grube von Mia40 (Sideris *et al.*, 2009). Durch diesen Kontakt kann das redoxaktive, oxidierte CPC-Motiv von Mia40 mit dem jeweiligen Cystein des ITS des Substrates reagieren (Banci *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2009). Dabei bildet das zweite Cystein des CPC-Motivs mit dem jeweiligen Cystein des ITS des Substrates eine intermolekulare Disulfidbrücke, die im weiteren Verlauf der Reaktion zu einer intramolekularen Disulfidbrücke im Substrat führt (Mesecke *et al.*, 2005; Terziyska *et al.*, 2009).

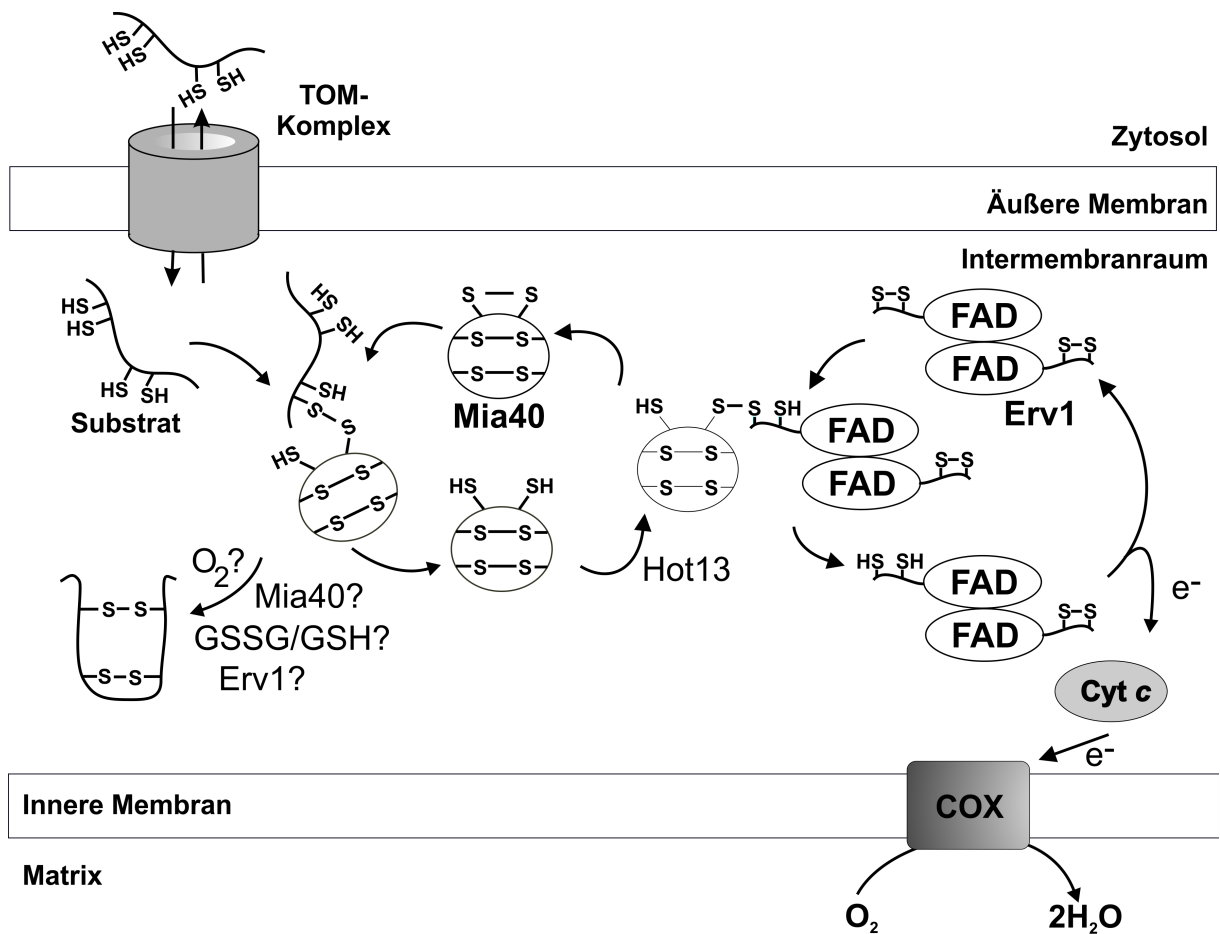


Abb. 1: Der Mechanismus des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems.

Die N-term. Ankerdomäne, die Mia40 in der inneren Membran fixiert, ist nicht gezeigt. GSSG: oxidierte Form von Glutathion, GSH: reduzierte Form von Glutathion (verändert nach Deponte *et al.*, 2009)

Glutathion konnte den Import von Cox19 und Tim9 in Mitochondrien stimulieren und langlebige Intermediate zwischen Cox19 und Mia40 auflösen. Vermutlich sorgt Glutat-

hion in Mitochondrien dafür, dass unproduktive Oxidationsintermediate aufgelöst werden, und könnte damit im IMR ähnlich einer Disulfidisomerase wirken (Bien *et al.*, 2010).

Substrate von Mia40 mit Zwillings-CX_nC-Motiv enthalten zwei Disulfidbrücken (Arnesano *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2009). Mia40 verfügt aber nur über ein redoxaktives CPC-Motiv (Terziyska *et al.*, 2009). Die Frage ist nun, auf welchem Weg die beiden Disulfidbrücken in das Motiv des Substrates eingebaut werden. Möglich wäre, dass zwei Mia40-Proteine das Substrat oxidieren oder ein Mia40 Protein hintereinander zwei Disulfidbrücken bildet. Ebenfalls könnten O₂ oder Erv1 bei der Oxidation der zweiten Brücke eine Rolle spielen. Zumindest *in vitro* ist Mia40 auch nach Reduktion des Substrates Cox19 ohne Beteiligung von O₂ und in Abwesenheit von Erv1 fähig, beide Disulfidbrücken nacheinander in dieses Substrat einzubauen (Bien *et al.*, 2010). In Anwesenheit von O₂ werden halb-oxidierte Substrate *in vitro* ohne weiteren Faktor vollständig oxidiert. Doch ob das Reaktionen widerspiegelt, die auch in Mitochondrien ablaufen, ist unklar (Banci *et al.*, 2009; Banci *et al.*, 2010).

Andererseits gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Erv1 zusammen mit Mia40 und dem Substrat in Mitochondrien einen Ternärkomplex bildet. Nachdem radioaktiv markiertes Tim9 mit Mitochondrien und Mitoplasten inkubiert und mittels nativer Elektrophorese analysiert wurde, konnte ein höhermolekularer Komplex beobachtet werden, der aus dem Substrat, Mia40 und Erv1 bestand. Funktionelles Erv1 unterstützt die Auflösung des ternären Komplexes (Stojanovski *et al.*, 2008). Die Existenz dieses ternären Komplexes konnte nach Import von rekombinanten kleinen Tim-Proteinen mit Dekahistidyl-Anhang in Mitochondrien mittels Kopräzipitation mit Mia40 und Erv1 bestätigt werden. Auch im Falle von Substraten mit Zwillings-CX₉C-Motiv wie Cox17 konnten Mia40 und Erv1 mit dem Substrat koisoliert werden (Böttinger *et al.*, 2012). Erv1 alleine bildet mit dem Substrat keinen Komplex. (Stojanovski *et al.*, 2008; Böttinger *et al.*, 2012). Für das Substrat Cmc1 (CX₉C mitochondrial protein required for full expression of COX), das eine ungerade Anzahl an Cysteinen und ein Zwillings-CX₉C-Motiv trägt, wurde gezeigt, dass es Mia40 und funktionelles Erv1 benötigt, um effizient oxidiert und aus dem Intermediat mit Mia40 entlassen zu werden. Ebenso wurde ein ternärer Komplex aus Mia40, Erv1 und dem Substrat Cmc1 gefunden (Bourens *et al.*, 2012). Es ist

aber nicht klar, ob Erv1 infolge der Interaktion mit Mia40 und dem Substrat direkt Disulfidbrücken in das Substrat einbaut. Wahrscheinlicher ist, dass Erv1 indirekt wirkt. Durch den ternären Komplex soll möglicherweise sichergestellt werden, dass Mia40 an Ort und Stelle von Erv1 reoxidiert wird und so auf alle Fälle zwei Disulfidbrücken auf das Substrat übertragen werden (Stojanovski *et al.*, 2008; Böttinger *et al.*, 2012).

I - 6 Ein IMR-Protein mit Zwillings-CX₉C-Motiv: Pet191

Pet191 (petite colonies) ist ein kleines Protein mit 108 AS und einer Molekularmasse von 12,4 kDa, das vermutlich eine Helix-Bogen-Helix Konformation aufweist. Pet191 gehört zu der Klasse der IMR-Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv (McEwen *et al.*, 1993; Longen *et al.*, 2009). Ein Vergleich der Homologe von Pet191 zeigt, dass tierisches Pet191 einen kurzen, zusätzlichen N-terminalen Schwanz hat (s. Abb. 2). Das Pet191 der Pilze (*S. cerevisiae*, *S. pombe* (in Abb. 2 nicht gezeigt) und *N. crassa*) verfügt über eine ausgedehnte, C-term. Verlängerung. Dort trägt *S. cerevisiae* Pet191 ein zusätzliches, nicht-konserviertes Cystein (C86) (Khalimonchuk *et al.*, 2008 und eigene Analyse).

Pet191 ist nötig für den Zusammenbau und die Reifung des Komplexes IV der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran (McEwen *et al.*, 1993; Khalimonchuk *et al.*, 2008). In Hefezellen ohne Pet191 (Δ *pet191*) ist der Komplex IV abwesend. Proteinmengen von Cox1, Cox2 und Cox3 sind nicht zu detektieren (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Der O₂-Verbrauch ist stark erniedrigt und die Aktivität des Komplexes III vermindert. Eine Änderung der Morphologie der Mitochondrien und ihrer Anordnung in der Zelle konnte jedoch nicht beobachtet werden (Longen *et al.*, 2009).

2011 wurde über eine Mutation in menschlichem *PET191* (*C2ORF64*) berichtet, die zu einer Störung am Aufbau des Komplexes IV und dadurch zu einer schweren neonatalen Cardiomyopathie führte. Pet191 scheint in einem frühen Schritt im Aufbau des Komplexes IV beteiligt (Huigsloot *et al.*, 2011). Dennoch sind in menschlichen Patienten mit Störungen des Komplexes IV Defekte in *PET191* anscheinend sehr selten (Tay *et al.*, 2004). Pet191 aus *S. cerevisiae* besitzt sieben Cysteine. Sechs davon sind in Pilzen, Pflanzen und Tieren konserviert (s. Abb. 2; Khalimonchuk *et al.*, 2008, und eigene Analyse). Vier dieser Cysteine liegen in einem Zwillings-CX₉C-Motiv vor (in *S. cerevisiae*: C5, C15 und C46,

C56). Neben dem konservierten Zwillings-CX₉C-Motiv existieren noch zwei weitere konservierte Cysteine, die zwischen den inneren Cysteinen dieses Motivs liegen. Interessanterweise ist auch der Abstand dieser Cysteine C21 und C32 stark konserviert (s. Abb. 2). Diese Konservierung könnte darauf hinweisen, dass diese Cysteine für die Faltung und bzw. oder für die Funktion von Pet191 eine Rolle spielen.



Abb. 2: Pet191 trägt sechs konservierte Cysteine. Vergleich von Pet191 Primärsequenzen aus verschiedenen Organismen. Grauer Rahmen: konservierte Cysteine (in *S. cerevisiae* : C5, C15, C21, C32, C46, C56); darüber: konservierter Abstand zwischen den Cysteinen; schwarzer Rahmen: siebtes, nicht-konserviertes Cystein C86 von *S. cerevisiae* Pet191; Zahlen rechts: Anzahl an AS.

Die Bedeutung der Cysteine des Zwillings-CX₉C-Motivs für die Biogenese von Pet191 wird dadurch klar, dass Cystein-zu-Alanin-Mutanten (C5A, C15A, C46A und C56A) von Pet191 den Wachstumsdefekt des $\Delta pet191$ Stammes nicht mehr oder nur noch wenig komplementierten. Das nicht-konservierte Cysteine C86 hatte hingegen kaum Effekt auf die Komplementation. Dasselbe galt für das Cystein C21. Dagegen war Cystein C32 nötig für aerobes Wachstum auf Glycerin (Khalimonchuk *et al.*, 2008).

Da Pet191 ein konserviertes und funktionell wichtiges Zwillings-CX₉C-Motiv trägt, liegt die Vermutung nahe, dass es ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems ist und sein Import von Mia40 und Erv1 abhängt. Überraschenderweise wurde gezeigt, dass in einer temperatursensitiven Mutante von Erv1 die Mengen an Pet191 in Mitochondrien ohne funktionelles Erv1 unverändert waren, auch wenn die Mengen anderer Substrate wie Ccs1 oder Cox23 in diesen Mitochondrien vermindert waren (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Ein *in vitro* Import mit radioaktiv markiertem Pet191 zeigte ebenfalls keine Abhängigkeit von funktionellem Erv1 (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Durch das konservierte Zwillings-CX₉C-Motiv dieses besonderen Proteins kann trotz des von funktionellem Erv1 unabhängigen Imports nicht ausgeschlossen werden, dass das Disulfid-Relay-System in der späteren Biogenese von Pet191 eine Rolle spielt.

I - 7 Ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems ohne Zwillings-CX_nC-Motiv: Ccs1

Das Ccs1 (copper chaperone of Sod1) aktiviert Sod1 (superoxide dismutase 1), indem es ein Kupferion und eine intramolekulare Disulfidbrücke in das Protein einführt (Culotta *et al.*, 1997; Field *et al.*, 2003). Ccs1 kommt, wie sein Substrat Sod1, sowohl im Zytosol als auch in weit geringeren Mengen im IMR von Mitochondrien vor (Sturtz *et al.*, 2001). Interessanterweise bedingt die Menge an Ccs1 die Menge an Sod1 im IMR (Field *et al.*, 2003; Reddehase *et al.*, 2009).

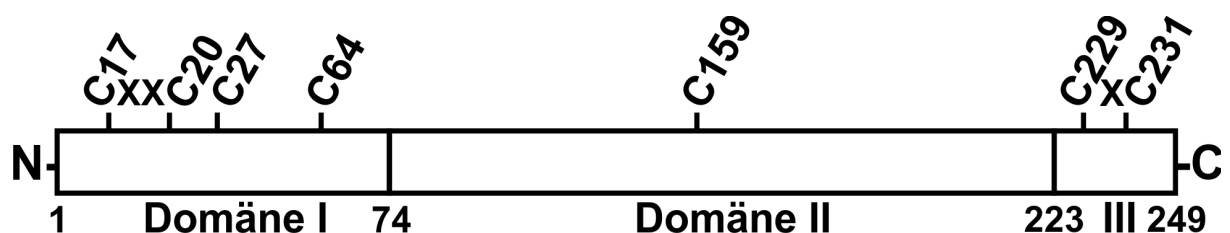


Abb. 3: Ccs1 besteht aus drei Domänen und besitzt sieben Cysteine. Schematischer Überblick über die Domänen von *S. cerevisiae* Ccs1 und die Position der Cysteine. III: Domäne III; X: unspezifische AS.

Ccs1 ist ein Multidomänenprotein, das aus drei Domänen mit konservierten Cysteinen besteht (Lamb *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Rae *et al.*, 2001; s. Abb. 3). Die N-term.

Domäne I von Ccs1 aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 74 AS, trägt ein CXXC-Motiv und hat strukturelle Ähnlichkeit zu Atx1, einem Kupfer bindenden Protein (Pufahl *et al.*, 1997). Zusätzlich weist diese Domäne zwei Cysteine an Position 27 und 64 auf. Domäne II reicht von AS 79 bis 223 und hat eine Homologie zu Sod1, wodurch Heterodimerisation zwischen diesen beiden Proteinen möglich ist (Lamb *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2000). Die letzten 26 C-term. AS bilden die Domäne III. Diese flexible Domäne beinhaltet ein CXC-Motiv und ist verantwortlich für die Aktivierung von Sod1 (Schmidt *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2001).

Obwohl Ccs1 kein Zwillings-CX_nC-Motiv trägt, hängt sein Import in Mitochondrien von Mia40 ab (Kawamata und Manfredi, 2008). In Mitochondrien ohne funktionelles Erv1 oder nach Herunterregulation der Menge an Mia40 oder Erv1 verringerte sich auch die Menge von Ccs1, wie es für ein Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems typisch ist (Khalimonchuk *et al.*, 2008; Reddehase *et al.*, 2009). Neben der Komponente des Disulfid-Relay-Systems Erv1 ist Ccs1 das erste identifizierte Substrat dieses Systems ohne Zwillings-CX_nC-Motiv. Es ist unbekannt, wie ein solches Substrat, wie Ccs1, importiert wird und wie es mit Mia40 interagiert.

I - 8 Ziele dieser Arbeit

Die bisher beschriebenen Substrate des Disulfid-Relay-Systems sind größtenteils klein, einfach strukturiert und weisen ein Zwillings-CX_nC-Motiv auf. Allerdings zeigt das Beispiel des Ccs1, dass auch komplexe Multidomänenproteine ohne ein solches Zwillings-CX_nC-Motiv über das Disulfid-Relay-System in Mitochondrien importiert werden können (Reddehase *et al.*, 2009). Es ist bisher jedoch nicht verstanden, wie das Ccs1 ohne dieses Motiv durch das Disulfid-Relay-System importiert wird.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus des Imports von Ccs1 durch das Disulfid-Relay-System aufzuklären. Da dieses System seine klassischen Substrate durch oxidative Faltung importiert, stellt sich die Frage, welche Rolle einzelne Cysteinreste für den Import von Ccs1 spielen. Diese Frage soll mit Hilfe von Cystein-zu-Serin-Varianten des Ccs1 beantwortet werden. Ebenso sollen diese Varianten verwendet werden, um zu klären, welche Cysteinreste für die Interaktion mit Mia40 und dem Mia40-abhängigen

Import verantwortlich sind. Des Weiteren soll analysiert werden, ob Ccs1 nach Import in Mitochondrien Disulfidbrücken ausbildet.

In einem weiteren Teil der Arbeit soll das Protein Pet191 untersucht werden. Dieses IMR-Protein ist klein und weist vermutlich nur eine Domäne auf. Das Pet191 trägt jedoch neben seinem Zwillings-CX₉C-Motiv drei weitere Cysteine, deren Fehlen teilweise Auswirkungen auf seine Funktionalität zu haben scheinen (Khalimonchuk *et al.*, 2008), so dass es sich bei Pet191 um ein komplexeres Zwillings-CX₉C-Motiv-Protein handeln könnte. Unerwarteterweise ist der Import von Pet191 in Mitochondrien trotz des Zwillings-CX₉C-Motivs als unabhängig von funktionellem Erv1 beschrieben worden (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Möglicherweise könnte Pet191 ein spezielles Substrat sein, welches das Disulfid-Relay-System nicht für den Import, aber für die nachfolgende Faltung benötigt. Deshalb sollen in dieser Arbeit die Biogenese und der Import von Pet191 und dessen Abhängigkeit vom Disulfid-Relay-System charakterisiert werden. Da dieses System Disulfidbrücken auf seine Substrate überträgt, soll der Redoxzustand von Pet191 in Mitochondrien bestimmt werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob Mia40 mit Pet191 interagiert und dieses oxidiert.

II Material und Methoden

II - 1 Geräte und Ausrüstung

-20 °C Gefriergerät, Premium NoFrost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Allegra X-22R Centrifuge	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien (USA)
Anaerob Box	Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., Tokyo (Japan)
Automatikpipetten	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, Hamburg
Centrifuge 5417 R (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424 (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R (große Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Digital graphic printer Up-D897	Sony, Surrey (Großbritannien)
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois (USA)
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf (Schweiz)
Electrophoresis Power Supply EPS601	GE Healthcare, München
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
Entwicklermaschine, 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, München
GFL, -80 °C Gefriertruhe	Bavaria Kälte- und Klimatechnik GmbH, Ismaning
Glashomogenisator, 10 ml	B. Braun, Bethlehem, Pennsylvania (USA)
Glashomogenisator, 100 ml	Kontes Glass, Vineland, New Jersey (USA)
Glasmaterial (Kolben, Flaschen)	Schott, Mainz
Glovebox-System	Coy Laboratory Products Incorporation, Grass Lake, Michigan (USA)
IKA combimag RCT (Magnet-Mixer)	Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschüttler, Multitron Standard	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
Inkubatorschrank (30 °C, 67 °C)	Memmert, Schwabach
Inkubatorschrank (37 °C)	Haraeus Sepatech GmbH, Osterode
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Magnetic 80 (Magnet-Mixer)	Edwards Kniese & Co. Hochvakuum GmbH, Marburg
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000C Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Optima Max-E Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien (USA)
pH552 (pH-Elektrode)	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 10	Amersham Biosciences, Freiburg
Potentiometer Lab 850	Schott-Instruments GmbH, Mainz
Primus (PCR)	Peqlab, Erlangen

Sonifier 250 (Sonifikator)	Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut (USA)
Sterilabzüge, BDK	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad, Transsonic T310	Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen
Ultrospec 3000pro (UV spectrophotometer)	Amersham Biosciences, Freiburg
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)
Waage CP2202 S	Sartorius AG, Göttingen

II - 2 Computeranwendungen und Webseiten

ApE, A plasmid Editor	M. Wayne Davis, http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/ Goujon <i>et al.</i> , 2010; Sievers <i>et al.</i> , 2011
Clustal Omega	http://contra.stanford.edu/contrafold/server.html
CONTRAFold	http://web.expasy.org/protparam/
ExpASy ProtParam Tool	Vilbert Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
FUSION CAPT-Software, vers. 16.06	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
ncbi blast (blastn, blastp, blastx)	Microsoft, München
Microsoft Office 2007	R.O.M. logicware Soft- und Hardware GmbH, Berlin
Papyrus Autor 5	http://www.yeastgenome.org/
Saccharomyces genom database	

II - 3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

(NH ₄) ₂ SO ₄	AppliChem GmbH, Darmstadt
[³⁵ S]Cystein	MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien (USA)
[³⁵ S]Methionin	MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien (USA)
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Adenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose SERVA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Amicon Ultra Zentrifugationsfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anaerobe Sachets, GENbox anaer	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Antigensäule	Bio-Rad, München
Bakto-Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bakto-Hefeextrakt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bakto-Pepton	USB Corporation, Cleveland, Ohio (USA)
Bakto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Blottingpapier	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Bradfordreagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Molekularbiologische Ansätze)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
BSA (Proteinbiochemische Ansätze)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chromatographiesäule, Glas, 60 ml	Bio-Rad, München
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP Mix	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DTT	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
EDTA	Merck, Darmstadt
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid-Lösung (1%)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Freund's Adjuvant Incomplete	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FUJI Medical X-Ray film, Super RX, 100 NIF	FUJIFILM Corporation, Tokyo (Japan)
Galaktose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glaskugeln, 0,25 -0,5 mm	Roth, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzin	Merck, Darmstadt
Greiner bio-one cuvettes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
GSH-Kügelchen	Amersham Biosciences, Freiburg
Harnstoff	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Histidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IAA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IgG	Bio-Rad, München
Imidazol	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kodak BioMax MR film	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KOH	Merck, Darmstadt
Leucin	USB Corporation, Cleveland, Ohio (USA)
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer (Holland)
Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Milchsäure	Merck, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaOH	Roth, Karlsruhe
Nap5-Säule	GE Healthcare, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Kügelchen	Quiagen GmbH Deutschland, Hilden
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel

Nucleospin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Orange G Farbstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Chicago, Illinois (USA)
PD10 Säule	GE Healthcare, München
PEG 3350	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PMSF	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare, München
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Madison, Wisconsin (USA)
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röntgenfilme Fuji Medical X-ray Film 100N	FUJIFILM Corporation, Tokyo (Japan)
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
sekundärer Ziegenantikörper Anti-Hase oder Anti-Maus	Bio-Rad, München
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sterilfilter, 0,22 µm	Millipore GmbH, Schwalbach
STI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Madison, Wisconsin (USA)
Transferringpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tricin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Uracil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, Wisconsin (USA)
Yeast Nitrogen Base	Invitrogen (Life Technologies GmbH), Darmstadt
β-ME	Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

II - 4 Enzyme

Lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
PK	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Precision Protease	Karin Waegemann (rekombinant)
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zymolyase	Sekagalm Biobusiness, Tokyo (Japan)

II - 5 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

II - 6 Puffer und Lösungen

Agarose Gel Auftragspuffer (10x)	30 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,2 % Orange G Farbstoff
Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
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 ₂ O ₂ in 30 ml 100 mM Tris pH 8,5
Harnstoffpuffer	6 M Harnstoff, 20 mM MOPS pH 7,2, 5 mM DTT
His-Lysepuffer	20 mM Tris pH 7,4, 80 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
His-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7,4, 80 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8, 0,05 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
HisErv1-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF
HisErv1-Reinigungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF
HisErv1-Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 30 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF
Importpuffer	0,61 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,6 mM DTT, 2,5 mM MnCl ₂ , 2,5 mM EDTA, 50 mM Hepes pH7,2
Kathodenpuffer	100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25
Kopplungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , 0,5 M NaCl, pH 8,3
Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β-ME. Falls angegeben ohne Zugabe von β-ME.
Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8, 300 mM NaCl, 0,1 oder 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
Mitopräp-Puffer I	100 mM Tris, 10 mM DTT
Mitopräp-Puffer II	1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase, 20 mM KH ₂ PO ₄ pH7,4
Mitopräp-Puffer III	0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF
Phusion-Polymerase Puffer (5-fach)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Ponceau S Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA
Puffer akt. (aktiv)	20 mM Tris pH 7, 40 mM NaCl
Reinigungspuffer	20 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF
Restriktionsenzym Puffer NEB 1-4 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

II. Material und Methoden

SDS Puffer	2 % (w/v) SDS , 100 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA
SDS-PAGE Bodengel	1 % Agarose in SDS-PAGE Laufpuffer
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 62 mM Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS
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
SDS-PAGE Trenngel	8-16 % Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,6 %, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,06 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4
SH-KCl-Puffer	0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes pH 7,4, 80 mM KCl
T4-Ligase Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TAE Puffer (1x)	40 mM Tris-Acetat pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
Taq-Polymerase Puffer (10-fach)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5
Transferpuffer	20 mM Tris, 150 mM Glyzin, 0,02 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Waschpuffer I	0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH4,0
Waschpuffer II	0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH8,0

II - 7 Medien

Alle Medien wurden vor ihrer Nutzung autoklaviert und vor Zugabe von Antibiotika und Aminosäuren auf 50 °C abgekühlt. Um Platten herzustellen, wurden die Medien mit 1 % Bakto-Agar versetzt.

II - 7.1 Bakterienmedien

LB Medium	1 % Bakto-Trypton, 0,5 % Bakto-Hefeextrakt, 85,6 mM NaCl
SOC Medium	2 % (w/v) Bakto-Trypton, 0,5 % Bakto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose

II - 7.2 Hefemedien

YPD	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bakto-Pepton, pH 5,5, 2 % (v/v) Glukose
YPGal	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bakto-Pepton, pH 5,5, 2 % (v/v) Galaktose
Lactat	0,3 % (w/v) Hefeextrakt, 7,4 mM KH ₂ PO ₄ , 18,7 mM NH ₄ Cl, 3,4 mM CaCl ₂ , 8,6 mM NaCl, 4,8 mM MgSO ₄ , 18,5 μM FeCl ₃ , 2 % (v/v) Milchsäure, pH 5,5 mit KOH einstellen.
Minimal Medium (<i>Synthetic Dropout</i>)	0,17% (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und (NH ₄) ₂ SO ₄), 37,8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 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 zugesetzt). Als Kohlenstoffquelle wurden zugesetzt: 2 % (w/v) Glukose (SD), 2 % (w/v) Galaktose (SGal) oder 2 % (v/v) Milchsäure (SLac, pH 5,5 mit KOH eingestellt)

II - 8 Biologisches Material

Verwendete Bakterien- und Hefestämme können den Tabellen 1 und 2 entnommen werden.

Tabelle 1. Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Resistenzen	Quelle
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-	Nalidixinsäure	Invitrogen (Life Technologies GmbH), Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> XL1blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Nalidixinsäure, Tetrazyklin	Stratagene (Agilent Technologies GmbH & Co.KG), Waldbronn
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	-	Studier und Moffat, 1986

Tabelle 2. Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Johnston und Davis, 1984; Sikorski und Hieter, 1989
YPH499 GAL-MIA40	YPH499 His3-P _{GAL10} - <i>MIA40</i>	Terziyska <i>et al.</i> , 2005
YPH499 Δ Ccs1	YPH499 <i>ccs1::KanMX</i>	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
YPH499 Δ Ccs1 GAL-MIA40	YPH499 <i>ccs1::KanMX</i> His3-P _{GAL10} - <i>MIA40</i>	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
W303-1A	<i>MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}</i>	R. Rothstein, Columbia University, New York
W303 GAL-ERV1	W303-1A His3-P _{GAL10} - <i>ERV1</i>	Mesecke <i>et al.</i> , 2005
JRY-675, Erv1-ts	pet492-6A (Mat α, Δ leu2, ura3-52, pet492 tS)	Lisowsky, 1992

II - 9 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Tabelle 3) wurden mittels *ApE* und *CONTRAFold* entworfen und von Metabion, Martinsried, synthetisiert.

Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Sequenz
DG1	BamHI-Pet191-1	5'- CTC GGA TCC ATG GTA GCT AGT TGT AAA G - 3'
DG2	Pet191-327Stop-XhoI	5'- CTC CTC GAG TTA TCA GTC CTT CTG CTG GC - 3'
DG20	ApaI-Ccs1C159SP1	5' - GGG CCC GGA AGC TGA AAT GAA CAA GG - 3'
DG21	Ccs1C159SP2	5' - C GTT GAA GCT TTC AAT GGG TTC GTC GAA CTT G - 3'
DG22	Ccs1C159SP3	5' - C GAC GAA CCC ATT GAA AGC TTC AAC GAG AGT GA - 3'
DG23	Ccs1C159SP4-NotI	5' - GCG GCC GCT CTA GAC TAG ACC TGG AGG - 3'
DG24	BamHI-ACC-Ccs1	5'- CTT GGA TCC ACC ATG ACC ACG AAC GAT AC - 3'
DG25	Ccs1-Stop-HindIII	5'- CGC CGG AAG CTT CTA TTT GAT GTT GTT G - 3'
DG26	NdeI - cytb2 ccs1 start	5' - GAC GCG CAT ATG ACC ACG AAC GAT AC - 3'
DG27	ccs1 - EcoRI - ccs1	5' - GAT AGA ATT CGG CTT CCC GGC GCC TC - 3'
DG28	ccs1 wt test	5' - GCC TTT ATA TCA TTC ACG - 3'
DG29	pRS314 test	5' - CCA AGC TCG GAA TTA ACC - 3'
DG30	Ccs1_222-Stop-SalI	5' - GTA GTC GAC TCA CCC GGC GCC TCT TAT GAT G - 3'
DG33	XhoI-Ccs1CSP1	5' - GGA CTC GAG GGA AGC TGA AAT GAA CAA GG - 3'
DG34	Ccs1CSP4-NotI-2b	5' - GA GCG GCC GCT CTA GAC TAG ACC TGG AGG - 3'
DG35	Ccs1C64SP2	5' - CTT TAC CAC TGT TTC GCA AGG TGT TGA TG - 3'
DG36	Ccs1C64SP3	5' - CCT TGC GAA ACA GTG GTA AAG ACG CCA TC - 3'

II - 10 Plasmide

Verwendete Plasmide sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4. Plasmide.

Name	Beschreibung	Bakterienresistenz	Hefe-Selektion	Quelle
pYX142	Zentromerischer Vektor für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Zellen. Promotor: Triose Phosphat Isomerase	Ampicillin (100µg/ml)	Leucin	Novagen Inc., Madison, Wisconsin (USA)
pYX142-mia40His	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang.	Ampicillin (100µg/ml)	Leucin	C. Kozany, unveröffentlicht
pRS314	Zentromerischer Vektor für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Zellen.	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	Sikorski und Hieter, 1989
pRS314-ccs1 WT	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1-WT; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C17S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C17S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C20S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C20S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C17/20S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C17/20S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C27S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C27S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C64S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C27/64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C27/64S; mit <i>CCS1</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)

II. Material und Methoden

pRS314-ccs1 C159S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C159S; mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	diese Arbeit
pRS314-ccs1 C229S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C229S; mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C231S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C231S; mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C229/231S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C229/231S; mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-ccs1 C17/20/27/64/159/229/231S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C17/20/27/64/159/229/231S; mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -1) und <i>CDC23</i> -Terminator (1477 - 1938)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	diese Arbeit
pRS314-cytb ₂ (1-88) ccs1 WT	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1-WT und N-term. Cytochrom <i>b</i> ₂ -Sequenz (1 - 88); mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -10) und <i>CCSI</i> -Terminator (751 - 1015)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pRS314-cytb ₂ (1-88) ccs1 C17/20S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C17/20S und N-term. Cytochrom <i>b</i> ₂ -Sequenz (1 - 88); mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -10) und <i>CCSI</i> -Terminator (751 - 1015)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	diese Arbeit
pRS314-cytb ₂ (1-88) ccs1 C27/64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C27/64S und N-term. Cytochrom <i>b</i> ₂ -Sequenz (1 - 88); mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -10) und <i>CCSI</i> -Terminator (751 - 1015)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	diese Arbeit
pRS314-cytb ₂ (1-88) ccs1 C229/231S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C229/231S und N-term. Cytochrom <i>b</i> ₂ -Sequenz (1 - 88); mit <i>CCSI</i> -Promotor (-432 - -10) und <i>CCSI</i> -Terminator (751 - 1015)	Ampicillin (100µg/ml)	Tryptophan	S. Reddehase (Groß <i>et al.</i> , 2011)
pGEX6P1	Vektor für die rekombinante Expression in <i>E.coli</i> ; Proteinanhang: N-term. GST; Promotor: tac	Ampicillin (100µg/ml)	-	GE Healthcare, München
pGEX6P1-mia40C	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Mia40 (AS 284 - 403) mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	Grumbt <i>et al.</i> , 2007

II. Material und Methoden

pGEX6P1-pet191	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Pet191 mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-ccs1 dl WT	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Domäne I von Ccs1 (AS 1 – 74) mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-ccs1 dl C17/20S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Domäne I von Ccs1 (AS 1 – 74) mit Mutation C17/20S mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-ccs1 dl C27/64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Domäne I von Ccs1 (AS 1 – 74) mit Mutation C27/64S mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-ccs1 dl C27S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Domäne I von Ccs1 (AS 1 – 74) mit Mutation C27S mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-ccs1 dl C64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Domäne I von Ccs1 (AS 1 – 74) mit Mutation C64S mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEX6P1-tim10	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Tim10 mit N-term. GST-Anhang	Ampicillin (100µg/ml)	-	Terziyska <i>et al.</i> , 2009
pET24a+	Vektor für die rekombinante Expression in <i>E.coli</i> ; Proteinanhang: C-term. 6xHis; Promotor: T7	Kanamycin (30 µg/ml)	-	Novagen Inc., Madison, Wisconsin (USA)
pET24a+-erv1	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Erv1 mit C-term. Hexahistidyl-Anhang	Kanamycin (30 µg/ml)	-	Lee <i>et al.</i> , 2000
pGEM4	Vektor für die <i>in vitro</i> Transkription und Translation; Promotoren: Sp6, T7	Ampicillin (100µg/ml)	-	Promega, Madison, Wisconsin (USA)
pGEM4-ccs1 WT	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1-WT	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEM4-ccs1 C17/20S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C17/20S	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEM4-ccs1 C27/64S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C27/64S	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEM4-ccs1 C229/231S	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Ccs1 mit Mutation C229/231S	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit
pGEM4-pet191	Vektor mit DNS-Einfügung kodierend für Pet191	Ampicillin (100µg/ml)	-	diese Arbeit

II - 11 Kultivierungsmethoden

II - 11.1 Bakterienkultivierung

E. coli verschiedener Stämme wurden bei 37 °C in LB Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt.

II - 11.2 Hefekultivierung

S. cerevisiae wurde bei 30, 24 oder 37 °C in verschiedenen Medien kultiviert. Flüssigkulturen wurden mit 130 rpm geschüttelt. Vor einer Präparation von Mitochondrien wurden die Hefezellen mindestens drei Tage in Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

Bei Hefestämmen, die ein Gen mit vorgeschaltetem GAL-Promotor trugen, wurde für die Repression der entsprechenden Gene Medien mit 0,1 % (w/v) Glukose und für die Überexpression mit 0,1 % (w/v) Galaktose verwendet. Die dazugehörigen Wildtypstämme wurden parallel im gleichen Medium kultiviert. Zur Hemmung der Mia40 Expression wurden die Zellen zwischen 12 und 30 h in glukosehaltigem Medium kultiviert. Zur Hemmung der Erv1 Expression wurden die Zellen für 48 h in glukosehaltigem Medium kultiviert.

Um auf Zellen, die Plasmide mit Selektionsmarkern trugen, zu selektionieren, wurden diese in Selektivmedium kultiviert, dem die jeweiligen Marker fehlten.

II - 11.3 Herstellen von Hefezellvorräten in Glyzerin

Hefezellen wurden auf einer Agarplatte bei 30 °C inkubiert. Ein Zellhaufen mit einem Volumen von etwa 100 µl wurde anschließend mit einer sterilen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 800 µl 15 % (v/v) Glyzerin überführt, suspendiert und bei -80 °C gelagert.

II - 12 Molekularbiologische Methoden

II - 12.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNS

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarosegel-Elektrophorese in TAE Puffer. 1 % (w/v) Agarose in TAE Puffer wurde in einer Mikrowelle geschmolzen, auf circa 60 °C abgekühlt und 17 µl 0,25 % (w/v) Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Agarosegel hinzugegeben. Zur Auftrennung wurden die DNS-Proben mit Auftragspuffer versehen und in Taschen im Agarosegel geladen. Die Agarosegele wurden in Laufkammern mit 6,6 bis 8,5 V/cm Länge betrieben. Die Banden wurden unter UV-Licht (302 nm) analysiert.

Agarose Gel Auftragspuffer (10x)	30 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,2 % Orange G Farbstoff
TAE Puffer (1x)	40 mM Tris-Acetat pH 7.5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA

II - 12.2 Polymerase-Kettenreaktion

Polymerase-Kettenreaktionen (Mullis *et al.*, 1986) zur Amplifikation von Plasmid- oder genomischer Hefe-DNS erfolgten mit Taq- oder mit Phusion-Polymerase nach dem in Tabelle 5 dargestelltem Ansatz. Die Reaktionsbedingungen können Tabelle 6 bzw. 7 entnommen werden.

Tabelle 5. Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion.

Komponente	Menge
Taq standard Puffer (10 x)	1/10 Volumen
bzw. Phusion standard Puffer(5x)	1/5 Volumen
dNTPs	0,2 - 0,4 µM
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
DNS	10 – 400 ng
Taq Polymerase	0,25 Einheiten
ddH ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	20 bis 100 µl

Tabelle 6. Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion (Taq-Polymerase)

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

Tabelle 7. Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion (Phusion-Polymerase)

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
Erste Denaturierung	98	10 sek
<i>Zyklus:</i>		
Denaturierung	98	5 sek
Primer-Anlagerung	55 - 68	10 sek
Verlängerung	72	15 sek pro kb
<i>Zyklus 30 Mal wiederholt</i>		
Zusätzliche Elongation	72	5 min.

II - 12.3 Ligation von DNS

Von Restriktionsenzymen geschnittene DNS-Fragmente wurden mit ebenso vorbehandelter Vektor-DNS enzymatisch verknüpft. In einem 10 µl Ansatz wurden 150 ng linearisierter Vektor mit einem ca. 8fachen molaren Überschuss an DNS-Fragment vermischt. 2 U T4-Ligase und der dazugehörige Puffer (beides NEB) wurden in das Reaktionsgefäß dazugegeben. Die Lösung wurde bei RT für 20 min inkubiert.

II - 12.4 Transformation

II - 12.4.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 erreicht war, wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 2700 xg bei 4 °C für 20 min. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 200 ml eiskaltem 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

II - 12.4.2 Transformation von Escherichia coli

23 µl elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 bis 200 ng Plasmid-DNS oder 1 µl einer Ligationsreaktion vermischt. Die Reaktion wurde in eine Elektroporationsküvette gegeben und in einem Elektroporator elektrifiziert (400 Ω, 1,2 kV, 25 µFD). Daraufhin wurde die Probe schnell mit 1 ml kaltem SOC Medium versehen.

Bei Transformation von Plasmid-DNS wurden die Bakterien sofort in 50 ml flüssiges LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum versehen) überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bei Transformation einer Ligationsreaktion wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C inkubiert, dann auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Erhaltene Kolonien wurden in flüssigem LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert, die DNS aus den Zellen isoliert und mittels Restriktionsverdau kontrolliert.

II - 12.4.3 Transformation von Hefezellen

Hefezellen wurden mit der Lithium-Acetat-Methode mit Plasmid-DNS transformiert. Dazu wurde dem *Quick and Easy TRAF0 Protocol* (Woods and Gietz, 2001) gefolgt. Es

wurden nur sterile Lösungen verwendet. Etwa 50 µl Hefekultur wurden von Agarplatte mit ddH₂O gewaschen, in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und 5 min bei 30 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen zentrifugiert und das erhaltene Pellet mit 240 µl 50 % (w/v) PEG, 36 µl 1 M LiAc, 25 µl 2 mg/ml SS-DNS, 5 µl Plasmid-DNS (ca. 200 - 400 ng/µl) und 45 µl ddH₂O überschichtet. Das Pellet wurde mittels Vortex resuspendiert und 20 min bei 42 °C inkubiert. Darauf wurden die Zellen abermals pelletiert, anschließend in 200 µl ddH₂O resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 - 6 Tage bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden.

II - 12.5 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E.coli*

Plasmid-DNS wurde in kleinem Maßstab (50 µl DNS-Lösung gewonnen aus 2 ml dicht gewachsener *E. coli* Übernachtskultur) mittels des Kits *Nucleospin Plasmid QuickPure* und im großen Maßstab (600 µl DNS-Lösung gewonnen aus 50 ml dicht gewachsener *E. coli* Übernachtskultur) mittels des Kits *PureYield Plasmid Midiprep System* gewonnen. Es wurden die Anweisungen des jeweiligen Herstellers befolgt.

II - 12.6 Reinigung von DNS aus Agarose und nach einem Restriktionsverdau

Zur Isolation von DNS aus Agarose oder zur Reinigung von DNS nach einem Restriktionsverdau wurde das Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* verwendet. Es wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt.

II - 12.7 Messung von DNS Konzentrationen

DNS-Konzentrationen wurden mit einem *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* bei 260 nm gemessen. Dazu wurde 1 µl DNS-Probe verwendet. Die Bestimmung des Referenzwertes erfolgte mit 1 µl ddH₂O.

II - 12.8 Restriktionsverdau von DNS

Um Gensequenzen und Vektoren zu schneiden oder um nach einer Transformation in *E. coli* Zellen das Plasmid zu kontrollieren, erfolgten Restriktionsverdau mit Enzymen der Firma *New England Biolabs*. Optimale Enzymmengen, Temperatur, Dauer des Verdau und NEB Puffer für das jeweilige Restriktionsenzym wurden gemäß den Angaben des Herstellers ausgewählt. Testverdau erfolgten während 10 min, präparative Verdau während 60 bis 120 min. Die geschnittenen Plasmide wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

II - 12.9 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNS wurden von der Firma *Eurofins MWG GmbH*, Ebersberg, durchgeführt.

II - 13 Proteinbiochemische Methoden

II - 13.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet (Laemmli, 1970). Die Gele wurden in einer Größe von insgesamt 14x10 cm angefertigt und waren folgendermaßen geschichtet (von unten nach oben): Bodengel 1 cm, Trenngel 7 cm, Sammelgel 2 cm. Die Geldicke betrug 1 mm.

Der Acrylamidanteil im Trenngel, und damit der Vernetzungsgrad, variierte je nach zu analysierender Proteinprobe zwischen 12 und 16 % Acrylamid (zwischen 0,32 und 0,43 % Bisacrylamid). Tricin-SDS-Gele enthielten zusätzlich 10,3% (v/v) Glycerin. Die Auftrennung erfolgte bei 35 mA für 1,5-2 h. Als Laufpuffer wurde SDS-PAGE-Laufpuffer verwendet oder, wo angegeben (Tricin-SDS-Gel), Anoden- bzw. Kathodenpuffer. Anschließend wurden die im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
Kathodenpuffer	100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25
SDS-PAGE Bodengel	1 % Agarose in SDS-PAGE Laufpuffer
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 62 mM Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS
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'-Tetramethylethylendiamin
SDS-PAGE Trenngel	8-16 % Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,6 %, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,06 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,1% (w/v) N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

II - 13.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Kyhse-Andersen, 1984). Verwendet wurden Blottingpapiere (17x12 cm), das Polyacrylamidgel und eine Nitrozellulosemembran (15x10 cm). Diese wurden mit Transferpuffer getränkt und folgendermaßen angeordnet: Kathode, Blottingpapier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Blottingpapier, Anode. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 1 h. Anschließend wurde die Membran mit ddH₂O gespült und mit Ponceau S Färbelösung angefärbt.

Ponceau S Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA
Transferpuffer	20 mM Tris, 150 mM Glyzin, 0,02 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

II - 13.3 Autoradiografie

Auf Nitrozellulosemembranen übertragene radioaktiv markierte Proteine wurden mit einem lichtempfindlichen Film detektiert (Kodak BioMax MR film). Die Entwicklung der Filme erfolgte maschinell mit Lösungen der Firma AGFA.

II - 13.4 Fällung von Proteinen mit TCA

Die Probe wurde mit 12 % (v/v) TCA (finale Konzentration) versehen und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 xg und 4 °C für 20 min. Nach einem Waschschrift mit -20 °C kaltem Aceton und kräftigem Vortexen wurde erneut bei 20000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT 5 min getrocknet. Zum Schluss wurde das gewonnene Pellet in SDS-Puffer oder Laemmli-Puffer aufgenommen.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β -ME.
SDS Puffer	2 % (w/v) SDS, 100 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA

II - 13.5 Gewinnung von Gesamtzellproteinen

II - 13.5.1 Gewinnung von Gesamtzellproteinen zur Analyse der Proteinmengen

Eine Menge an Hefezellen, die einer optischen Dichte von 2 entsprachen, (zwischen 4 – 6 ml) wurden sedimentiert, in 100 μ l ddH₂O resuspendiert und mit 100 μ l 0,2 M NaOH versetzt. Die Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde 5 min bei 18000 xg bei RT pelletiert und anschließend in Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach Erhitzen bei 95 °C für 3 min wurde das Material erneut bei 18000 xg bei RT 1 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzuscheiden. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β -ME.
----------------	---

II - 13.5.2 Gewinnung von Gesamtzellproteinen zur Analyse der Redoxzustände der Proteine

Eine Menge an Hefezellen, die einer optischen Dichte von 10 entsprachen, (zwischen 11 – 16 ml) wurden sedimentiert und in 360 µl SH-Puffer mit 1 mM PMSF und 10 mM EDTA resuspendiert. Die Lösung wurde mit kleinen Glaskugeln (Durchmesser zwischen 0,25 - 0,5 mm) versetzt und 6 Mal 30 sek gevortext. Dazwischen wurde die Lösung 30 sek lang auf Eis gekühlt. Mittels einer Zentrifugation von 3 min bei 1000 xg und 4 °C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zellkerne abgetrennt. Der gewonnene Überstand wurde mit TCA gefällt (s. II - 13.4) und dann als Gesamtzelleextrakt weiter analysiert (s. II - 13.12.1). Zum Ausschluss von Sauerstoff wurde die Prozedur in einem Glovebox-System durchgeführt.

SH-Puffer

0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4

II - 13.6 Gewinnung von Zytosol zur Analyse der Redoxzustände der Proteine

Die Zellen aus 50 ml einer Hefezellkultur wurden sedimentiert, mit ddH₂O gewaschen und in 10 ml Mitopräp-Puffer II resuspendiert. Dann erfolgte 30 min Inkubation bei 30 °C. Die Zellen wurden sedimentiert und in 1 ml Mitopräp-Puffer III (ohne BSA) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte auf Eis mit dreißig Zügen in einem kleinen Glashomogenisator mit einem Pistill. Das gewonnene Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1700 xg und 4 °C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 15000 xg und 4 °C 10 min zentrifugiert, um die Mitochondrien und andere Zellkompartimente abzutrennen. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit TCA gefällt (s. II - 13.4) und dann als Zytosol weiter analysiert (s. II - 13.12.1). Zum Ausschluss von Sauerstoff wurde die Prozedur nach Zugabe der Zymolyase in einem Glovebox-System durchgeführt.

Mitopräp-Puffer II

1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase, 20 mM KH₂PO₄
pH7,4

Mitopräp-Puffer III (ohne BSA)

0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

II - 13.7 Rekombinante Proteinexpression in E.coli

E.coli Bl21 oder XL1blue Zellen mit entsprechenden Expressionsplasmiden wurden bei 37 °C in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin kultiviert. Wenn die Kulturen eine OD₆₀₀ von 1 erreicht hatten, wurde 1 mM IPTG zugesetzt und weitere 3 h bei 37 °C (bzw. im Fall von His-Erv1: 16 h bei 28 °C) schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert und in 40 ml Reinigungspuffer (oder HisErv1-Reinigungspuffer) resuspendiert. 0,2 mg/ml Lysozym wurden hinzugegeben und die Lösung 10 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Das Zelllysate wurde auf Eis sonifiziert (Tastgrad 80 %, Kontrolleinstellung 4), indem die Probe 10 Mal abwechselnd 12 sek Schall ausgesetzt wurde und 18 sek auf Eis abgekühlt wurde. Unlösliche Zellreste und unaufgeschlossene Zellen wurden mittels Zentrifugation (30000 xg, 20 min, 4 °C) abgetrennt (Proteinexpression und -reinigung nach Grumbt *et al.*, 2007).

HisErv1-Reinigungspuffer

50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8,
1 mM PMSF

Reinigungspuffer

20 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF

II - 13.8 Reinigung rekombinanter Proteine

II - 13.8.1 GSH-Affinitätschromatographie

Eine Chromatographiesäule (Glas, 60 ml, Niederdruck) wurde mit 3 ml GSH-Kügelchen beladen. Diese wurden mit 10 Säulenvolumen Reinigungspuffer äquilibriert. Alle Pufferdurchflüsse der Säule erfolgten per Gravitation. Der Überstand des Bakterienlysates (siehe II - 13.7) wurde zweimal über die Säule gegeben und diese dann mit 30 Säulenvolumen an Reinigungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen zusammen mit 10 ml Reinigungspuffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit *Precision Protease* (160 ng/ml) versetzt. Die Proben wurden 3 h bei 30 °C oder über Nacht bei 4 °C über Kopf geschüttelt, um das Protein von seinem GST-Anhang abzutrennen. Anschließend wurden die GSH-Kügelchen zurück in die Chromatographiesäule gegeben und der

Durchfluss gesammelt (Proteinreinigung nach Grumbt *et al.*, 2007). Die eluierte Proteinlösung wurde mittels *Amicon Ultra Zentrifugationsfilter* zehnfach konzentriert und die Konzentration dann mittels Bradfordtest bestimmt. Die rekombinanten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Reinigungspuffer	20 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF
------------------	---

II - 13.8.2 Nickel-NTA-Reinigung von HisErv1

Eine Chromatographiesäule (Glas, 60 ml, Niedrigdruck) wurde mit 1 ml Ni-NTA-Kügelchen beladen. Diese wurden mit 20 Säulenvolumen HisErv1-Reinigungspuffer äquilibriert. Alle Pufferdurchflüsse der Säule erfolgten per Gravitation. Der Überstand des Bakterienlysates (siehe II - 13.7) wurde zweimal über die Säule gegeben und diese dann mit 15 Säulenvolumen an HisErv1-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen mit 10 Mal 1 ml HisErv1-Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradfordtest bestimmt. Die rekombinanten Proteine wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

HisErv1-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF
HisErv1-Reinigungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF
HisErv1-Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, 30 mM Imidazol pH 8, 1 mM PMSF

II - 13.9 *In vitro* Transkription und Translation radioaktiv markierter Proteine

Zur Herstellung radioaktiv markierter Proteine wurde das *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* von Promega gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Es wurden radioaktiv markiertes [³⁵S]Methionin als auch [³⁵S]Cystein verwendet.

II - 13.10 Fällung radioaktiv markierter Proteine

Das Proteingemisch wurde mit dem doppelten Volumen an gesättigter Lösung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in drei Schritten versetzt (Endkonzentration $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2,7 M). Dazwischen wurde die Lösung jedes Mal gevortext. Anschließend wurde die Probe 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 15000 xg 12 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Harnstoffpuffer aufgenommen und direkt für den *in vitro* Import verwendet.

Harnstoffpuffer

6 M Harnstoff, 20 mM MOPS pH 7,2, 5 mM DTT

II - 13.11 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradfordtest)

Die Konzentrationsbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Das fünffachkonzentrierte Bradfordreagenz wurde nach Vorschrift eingesetzt. Zur Eichung wurde eine Standardmessreihe aus 24, 12, 6, 3 und 0 mg/ml IgG verwendet. 5 und 10 µl der Probe wurden in einer Verdünnung von 1:10 oder 1:100 in 1 ml einer einfachen Bradfordreagenz gegeben. Die Extinktion wurde mit einem Eppendorf BIO Photometer ermittelt und daraus die Proteinkonzentration in den Proben errechnet.

II - 13.12 Modifikation von Proteinen

II - 13.12.1 Proteinmodifikation mit AMS

AMS bindet kovalent an freie Sulfhydrylgruppen eines Proteins und vergrößert dessen Masse um etwa 0,5 kDa. Es wurden verschiedene Proben modifiziert: 50 bis 150 µg isolierte Mitochondrien in SDS Puffer; Zytosol entsprechend einer Menge Hefezellen von 1 OD₆₀₀ in SDS Puffer; Gesamtzellextrakt entsprechend einer Menge Hefezelle von 2,5 OD₆₀₀ in SDS Puffer; zwischen 2 und 10 µg rekombinanter Proteine in Puffer akt. Die Proben wurden mit 10, 20 oder 30 mM AMS versetzt (Endvolumen je 20 µl) und lichtgeschützt bei 25 oder 37 °C für 1 h inkubiert. Laemmli-Puffer wurde zugesetzt und die Proben gekocht (95 °C, 3 min). Die weitere Analyse erfolgte mit SDS-PAGE und Immunodekoration.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β -ME.
Puffer akt. (aktiv)	20 mM Tris pH 7, 40 mM NaCl
SDS Puffer	2 % (w/v) SDS, 100 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA

II - 13.12.2 Proteinmodifikation mit IAA

IAA bindet freie Sulfhydrylgruppen unter Bildung einer kovalenten Bindung. Eine Modifikation mit IAA wurde eingesetzt, um transiente Interaktionen via eine Disulfidbrücke zu stabilisieren (z.B. Mia40-Substrat-Intermediate). Bindung von IAA an Proteine änderte deren Laufverhalten während einer SDS-PAGE nur unmerklich. Bei der Modifikation von Mitochondrien wurden 50 bis 200 μ g Mitochondrien in SH-Puffer mit 50, 70 oder 80 mM IAA versetzt und für zwischen 10 und 25 min bei 25 °C inkubiert.

SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4
-----------	------------------------------------

II - 13.13 Behandlung von Proteinen mit DTT

Zur Überprüfung der Stabilität der Disulfidbrücken wurden Proteine mit dem starken Reduktionsmittel DTT behandelt. Die Proteinlösung oder isolierte Mitochondrien wurden mit zwischen 5 und 80 mM DTT versetzt und bei 25 oder 95 °C 10 oder 15 min inkubiert. Danach folgten eine Fällung der Proteine mit TCA und eine Behandlung mit AMS. Zum Ausschluss von Sauerstoff wurde die Prozedur bei der Analyse von Gesamtzellprotein und Zytosol in einem Glovebox-System durchgeführt.

II - 13.14 Interaktion von Ccs1 Domäne I (AS 1 – 74; Ccs1 dl) mit rekombinanten Mia40C

100 μ l *E. coli* Lysat in Reinigungspuffer aus Zellen, die die Domäne I (AS 1 – 74) der Ccs1-Varianten mit einem GST-Anhang exprimierten, wurden zu 30 μ l GSH-Kügelchen gegeben und mit 5 mM DTT versetzt. Die Proben wurden 1 h bei 4 °C geschüttelt, dann dreimal mit 1 ml Reinigungspuffer gewaschen und in zwei Proben aufgeteilt. Zu einer der Proben wurden 220 μ M Mia40C (funktioneller Teil von Mia40; AS 284 – 403;

Grumbt *et al.*, 2007) hinzugegeben, zur anderen Reinigungspuffer. Daraufhin wurde 10 min bei 25 °C inkubiert, 50 mM IAA hinzugegeben und dreimal mit 1 ml Reinigungspuffer gewaschen. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer ohne β -ME eluiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 95 °C gekocht. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit einem Antikörper gegen Mia40.

Laemmli-Puffer ohne β -ME	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau.
Reinigungspuffer	20 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF

II - 13.15 *In vitro* Oxidation von Pet191 und Tim10 durch das Disulfid-Relay-System

100 μ l rekombinantes Pet191 (66 μ M) in Reinigungspuffer oder 100 μ l rekombinantes Tim10 (41 μ M) in Reinigungspuffer wurden mit 15 mM DTT 10 min bei 25 °C behandelt. Daraufhin wurde die Proteinlösung mittels einer Nap5-Säule gereinigt und mit Puffer akt. eluiert. 2 μ M Pet191 oder 2 μ M Tim10 wurden mit 2 μ M Mia40C und/oder 2 μ M Erv1 15 min bei 25 °C in 10 μ l Puffer akt. inkubiert. Daraufhin wurden weitere 10 μ l Puffer akt. hinzugegeben. In alle Proben bis auf eine (-AMS) wurde 10 mM AMS hinzugegeben und 1 h bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Dann wurde die Lösung mit 50 mM IAA vermischt, mit Laemmli-Puffer versehen und 3 min bei 95 °C gekocht. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191 und Tim10.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β -ME.
Puffer akt. (aktiv)	20 mM Tris pH 7, 40 mM NaCl
Reinigungspuffer	20 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF

II - 14 Methoden zur Arbeit *in organello*

II - 14.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen

Hefekulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 – 1,5 in Flüssigmedium angezogen und bei 4000 xg, 5 min, RT geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden einmal mit ddH₂O gewaschen. Dem Feuchtgewicht entsprechend wurde das Pellet in 2 ml Mitopräp-Puffer I pro 1 g resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min bei 30 °C geschüttelt und für 5 min bei 2800 xg und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen, in 6,6 ml Mitopräp-Puffer II pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min bei 30 °C geschüttelt. Die entstandenen Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation bei 1100 xg für 5 min bei 4 °C geerntet. Der Rest der Präparation wurde auf Eis mit eisgekühlten Reagenzien durchgeführt. Die pelletierten Sphäroblasten wurde in 6,6 ml Mitopräp-Puffer III je Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und in einem Glashomogenisator mit einem Pistill mit zehn Zügen aufgeschlossen. Intakte Zellen, Membranen und Zellkerne wurden durch eine zweimalige Zentrifugation bei 1900 xg für 5 min bei 4 °C abgetrennt. Die Mitochondrien wurden durch eine Zentrifugation bei 18000 xg für 12 min bei 4 °C pelletiert und anschließend in 30 ml SH-Puffer resuspendiert. Verunreinigungen wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 1900 xg für 5 min 4 °C entfernt. Der Überstand wurde bei 17000 xg für 12 min zentrifugiert und so die Mitochondrien isoliert. Das Pellet wurde vorsichtig je nach Größe in 0,3 bis 5 ml SH-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels Bradfordtest bestimmt. Die isolierten Mitochondrien wurden auf eine Konzentration von 10 mg/ml mit SH-Puffer verdünnt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Mitopräp-Puffer I	100 mM Tris, 10 mM DTT
Mitopräp-Puffer II	1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase, 20 mM KH ₂ PO ₄ pH7,4
Mitopräp-Puffer III	0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF
SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4

II - 14.2 Proteinimport in den IMR von isolierten Mitochondrien

In vitro Importexperimente wurden mit isolierten Mitochondrien durchgeführt (Glick, 1991). Pro Reaktion (100 µl) wurden 50 oder 250 µg Mitochondrien in Importpuffer aufgenommen und bei 25 °C 3 min vorinkubiert. Für den Test der Abhängigkeit des Imports von Pet191 von ATP und NADH wurden, wie angegeben, 2 mM ATP und 4 mM NADH zugegeben oder weggelassen. Für den Test der Abhängigkeit des Imports von Pet191 von DTT wurde zum Importpuffer zwischen 0 und 10 mM DTT zugefügt. 3 oder 12% (v/v) gefälltes, radioaktiv markiertes Protein wurden hinzugefügt und der Ansatz bei 25 °C für 2 oder 15 min inkubiert. Der Import wurde durch zehnfaches Verdünnen in eiskaltem SH-Puffer gestoppt und nichtimportiertes Material durch Zugabe von Trypsin (50 µg/ml) oder PK (100 µg/ml) abgebaut. Nach 15 oder 20 min Inkubation auf Eis wurde die Protease durch Zugabe von 1 mg/ml STI (Trypsin) oder 1 oder 2 mM PMSF (PK) und weitere 10 min Inkubation auf Eis inhibiert. Die Mitochondrien wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 20000 xg und 4 °C sedimentiert. Das Mitochondrienpellet wurde mit 500 µl eiskaltem SH-KCl-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und für weitere Analysen verwendet oder in Laemmli-Puffer resuspendiert, 3 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Importpuffer	0,61 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,6 mM DTT, 2,5 mM MnCl ₂ , 2,5 mM EDTA, 50 mM Hepes pH7,2.
Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β-ME (wo angegeben ohne β-ME).
SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4
SH-KCl-Puffer	0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes pH 7,4, 80 mM KCl

II - 14.3 Herstellung mitochondrialer Lysate

Die Lyse von 50 bis 500 µg pelletierten Mitochondrien erfolgte durch Resuspendieren in 100 µl Lysepuffer und anschließender Inkubation für 10 min bei RT. Der Ansatz wurde in TBS mit 0,05 % (v/v) Triton X-100 10fach verdünnt und nicht-solubilisiertes Material mittels Ultrazentrifugation (90.000 xg, 4 °C, 20 min) abgetrennt.

Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8, 300 mM NaCl, 0,1 oder 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5

II - 14.4 Trypsinbehandlung von Mitochondrien

Um die Lokalisation von Ccs1 im Inneren der Mitochondrien zu bestätigen, wurden isolierte Mitochondrien mit Protease behandelt. Dazu wurden 25 µg Mitochondrien in 20 µl SH-Puffer mit 100 µg/ml Trypsin versetzt. Anschließend wurde 20 min auf Eis inkubiert und dann die Protease mit 2 mg/ml STI gestoppt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Mitochondrien pelletiert, mit SH-KCl-Puffer gewaschen und in Laemmli-Puffer resuspendiert. Nach dem Kochen bei 95 °C für 3 min erfolgte die weitere Analyse mittels SDS-PAGE.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β-ME.
SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4
SH-KCl-Puffer	0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes pH 7,4, 80 mM KCl

II - 14.5 Trypsinbehandlung von mitochondrialen Extrakten

50 oder 60 µg Mitochondrien in 37 µl SH-Puffer wurden mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 versetzt und 15 min auf Eis lysiert. Daraufhin wurden zwischen 10 und 200 µg/ml Trypsin hinzugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Protease wurde mittels 4 mg/ml STI oder TCA-Fällung gestoppt. Daraufhin wurde die Probe mit Laemmli-Puffer versehen, gekocht (95 °C, 3 min) und mittels SDS-PAGE und Immundekoration weiter analysiert.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β-ME.
SH-Puffer	0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7,4

II - 14.6 Erzeugung von Mitoplasten

Zur Erzeugung von Mitoplasten (Mitochondrien mit geborstener äußerer Membran) wurden Mitochondrien (50 µg in 100 µl) mit einer 20 mM Hepes Lösung (pH 7,4) zehnfach verdünnt und 15 min auf Eis inkubiert.

II - 14.7 Präzipitation mitochondrialer Proteine mittels Nickel-NTA

250 – 800 µg Mitochondrien wurden in 230 µl His-Lysepuffer 20 min auf Eis lysiert. Darauf folgte die Abtrennung von unlysiertem und präzipitiertem Material mittel Ultrazentrifugation (90000 xg, 4 °C, 20 min). Vom erhaltenen Überstand wurde eine Ladekontrolle abgenommen und der Rest zusammen mit Ni-NTA-Kügelchen (30 µl) 1 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Darauf wurde eine Probe des Überstandes entnommen und die Kügelchen mit je 1 ml His-Waschpuffer dreimal gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Laemmli-Puffer ohne β-ME, aber mit 300 mM Imidazol eluiert. Die Probe wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gekocht (95 °C, 3 min) und mittels SDS-PAGE weiter analysiert.

His-Lysepuffer	20 mM Tris pH 7,4, 80 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
His-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7,4, 80 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8, 0,05 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF
Laemmli-Puffer ohne β-ME mit Imidazol	10 % (w/v) Glyzerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 300 mM Imidazol

II - 15 Immunologische Methoden

II - 15.1 Generierung von Antikörpern gegen Pet191

Als Antigen wurde das Protein Pet191 als GST-Fusionsprotein rekombinant von einem pGEX6P1 Vektor in *E. coli* exprimiert, affinitätschromatographisch aus dem Zellysat gereinigt und mit der *Precision Protease* vom GST-Anhang befreit (siehe II - 13.7 und II - 13.8.1). Das Protein wurde anschließend mittels SDS-PAGE gereinigt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Das mittels Ponceau S Färbelösung angefärbte Protein

wurde mit einem Skalpell aus der Membran ausgeschnitten, in 250 µl DMSO gelöst und mit 250 µl *Freund's Adjuvant Incomplete* vermischt. Pro Injektion wurden 50-150 µg Protein verwendet. Die Lösung wurde einem Hasen injiziert und die Injektion im Abstand von 6 Wochen wiederholt. Jeweils 10 – 12 Tage nach Injektion wurden Blutproben mit einem Volumen von 5 – 20 ml abgenommen.

Ponceau S Färbelösung

0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA

II - 15.2 Erzeugung von Serum aus Blut

Das bei RT agglutinierte Hasenblut wurde 10 min bei RT und bei 3200 xg zentrifugiert, um die agglutinierten Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde erneut bei 13000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um die restlichen unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Der nun verbleibende Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Durch Inkubation im Wasserbad bei 56 °C für 25 min wurde das Komplementsystem inaktiviert. Das Serum wurde daraufhin bei -20 °C gelagert.

II - 15.3 Reinigung der Antikörper

Um aus dem Serum von Kaninchenblut die Antikörper affinitätschromatografisch zu reinigen, wurde Antigen an eine Säule gekoppelt. Das Protein wurde mittels einer PD10 Säule in den Kopplungspuffer überführt. Dazu wurde zuerst mit 40 ml Kopplungspuffer äquilibriert, und 2,5 – 5 mg des Antigens in 2,5 ml Puffer auf die Säule gegeben. Alle Pufferdurchflüsse der Säule erfolgten per Gravitation. Die 2,5 ml des Durchflusses wurden verworfen und das Antigen mit 3,5 ml Kopplungspuffer eluiert.

Zur Bereitstellung des Säulenmaterials wurden 0,5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B eingewogen und in 10 ml einer 1 mM HCl Lösung 20 min geschwollen. Die Sepharosekugeln wurden daraufhin auf einer Fritte mit 200 ml einer 1 mM HCl Lösung gewaschen. Für die Kopplung wurde 1 ml geschwollener Sepharosekugeln in eine leere Säule pipettiert und der Überschuss an HCl auslaufen gelassen. Die Säule wurde mit dem Antigen beladen und 1 h bei RT gerollt. Der Überstand wurde daraufhin eluiert und verworfen. Ungebundenes Material wurde mit 6 ml Kopplungspuffer weggewaschen. Freie aktive Gruppen an

der Sepharose wurden mit 2 ml einer 1 M Ethanolamin Lösung (pH 8,0) blockiert, indem die Kugeln 2 h bei RT in der Lösung inkubierten. Die Ethanolamin Lösung wurde anschließend ablaufen gelassen. Die Säule wurde dann dreimal im Wechsel mit je 6 ml Waschpuffer I und Waschpuffer II gewaschen. Die Säule wurde in 5 ml einer 10 mM Tris Lösung (pH 7,5) mit 0,05 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

Zur Reinigung der Antikörper wurde die Antigensäule mit 10 ml einer 10 mM Tris Lösung (pH 7,5) äquibriert. Alle Pufferdurchflüsse der Säule erfolgten per Gravitation. Zwischen 6 und 12 ml des Kaninchenserums wurden mit einer 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM PMSF, 1 mM EDTA Lösung zu 30 ml aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Ungebundenes Material wurde durch Waschen mit 10 ml einer 10 mM Tris Lösung (pH 7,5), dann mit 10 ml einer 10 mM Tris und 0,5 M NaCl Lösung (pH 7,5) und schließlich mit 10 ml einer 100 mM Natriumcitrat Lösung (pH 4,0) entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit 10 ml einer 100 mM Glycin Lösung (pH 2,5) eluiert. Die gesammelten Fraktionen von 1 ml (G1 – G10) wurden sofort mit 200 µl einer 1 M Tris Lösung (pH 8,8) neutralisiert. Die Säule wurde dann mit 10 ml einer 10 mM Tris Lösung (pH 7,5) gewaschen und unter 5 ml einer 10 mM Tris Lösung (pH 7,5) mit 0,05 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert. Die eluierten Antikörperfraktionen wurden dann mittels Immunodekoration von 50 µg Mitochondrien auf ihre Wirksamkeit getestet. Die Eluate wurden anschließend bei - 20 °C gelagert.

Kopplungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , 0,5 M NaCl, pH 8,3
Waschpuffer I	0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH4,0
Waschpuffer II	0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH8,0

II - 15.4 Immunodekoration von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran mit einer 5%igen (w/v) Milchpulverlösung in TBS bei RT 30 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem gegen das zu dekorierende Protein spezifischen Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperkonzentration in 5%iger Milchpulverlösung in TBS wurde individuell abgestimmt, für Pet191 wurde eine 1:25-Verdünnung gereinigter Antikörper von Fraktion G3 verwendet (s. II - 15.3).

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran mit TBS gespült, dann 5 min mit TBS, 5 min mit TBS mit 0,05 % (v/v) Triton X-100, daraufhin erneut kurz gespült und 5 min mit TBS gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (1:10.000) für 45 min bei RT oder bis zu 5 h bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde abermals wie oben beschrieben gewaschen, mit ECL-Reagenz (ECL1 + ECL2 in gleichen Teilen) versetzt und mit Röntgenfilmen (FUJI Medical X-Ray film, Super RX) entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte maschinell mit Lösungen der Firma AGFA.

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 ₂ O ₂ in 30 ml 100 mM Tris pH 8,5
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5

II - 15.5 Immunopräzipitation

Zur Darstellung kovalenter Protein-Protein-Interaktion von Mia40 mit seinem Substrat wurden gereinigte Antikörper gegen das C-terminale Peptid von Mia40 an Protein-A-Sepharose gekoppelt. 10 mg Sepharosekugeln wurden in ddH₂O geschwollen und in TBS gewaschen. Anschließend wurden 60 µl Antikörper mit den Sepharosekugeln für 30 min schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Mitochondriale Lysate (s. II - 14.3) wurden zu den Protein-A-Sepharosekugeln hinzugefügt und 2 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurde das Säulenmaterial zweimal mit TBS mit 0,05 % (v/v) Triton X-100 und einmal mit TBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Vortexen, Zugabe von Laemmli-Puffer mit oder ohne β-ME und Kochen (95 °C, 3 min) von den Sepharosekugeln eluiert und per SDS-PAGE analysiert.

Laemmli-Puffer	10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 6,8, 0,1 g/l Bromphenolblau, 5 % β-ME (wo angegeben ohne β-ME).
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5

III Ergebnisse

III - 1 Ccs1 – ein unkonventionelles Substrat des Disulfid-Relay-Systems

III - 1.1 Die mitochondriale Lokalisierung des Ccs1 ist abhängig von Cystein-Resten in Ccs1

Es ist bekannt, dass Ccs1 sowohl im Zytosol als auch im IMR von Mitochondrien vorliegt und dass die Mengen an Ccs1 im IMR vom Disulfid-Relay-System abhängen (Sturtz *et al.*, 2001; Kawamata und Manfredi, 2008; Khalimonchuk *et al.*, 2008; Reddehase *et al.*, 2009). Bei den Substraten des Disulfid-Relay-Systems mit Zwillings-CX_nC-Motiv sind Cysteine aus diesem Motiv für den Import der Substrate in den IMR essentiell (Lutz *et al.*, 2003; Milenkovic *et al.*, 2009; Sideris *et al.*, 2009). Bisher ist nicht bekannt, wie Substrate ohne Zwillings-CX_nC-Motiv in Mitochondrien importiert werden. Haben auch Cysteine in Ccs1 Einfluss auf die Lokalisation des Proteins im IMR? Um dies zu charakterisieren, wurden Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 untersucht. Die Varianten wurden in einem $\Delta ccs1$ -Stamm von einem Plasmid unter dem endogenen *CCS1*-Promotor exprimiert.

III - 1.1.1 Vergleich der Expressionsmengen der Ccs1-Varianten in Hefezellen

Um sichere Aussagen darüber treffen zu können, welche Ccs1-Variante in größeren oder kleineren Mengen in Mitochondrien vorkommt, muss zuerst überprüft werden, ob sich die Varianten in ihrer Expression und damit in ihrer Gesamtmenge in der Zelle unterscheiden. Dazu wurden von drei Doppelmutanten und sechs Einzelmutanten Zellextrakte angefertigt und mittels SDS-PAGE und Immunodekoration analysiert. Das Matrixprotein Tim44 diente als Ladekontrolle. Die Varianten C17/20S und C27/64S waren in ihren Mengen nicht unterschiedlich zu der Ccs1-Menge im Wildtyp (s. Abb. 4). Dies traf auch auf die Varianten C17S, C20S, C27S und C64S zu. Die Varianten C229/231S, C229S und C231S lagen jedoch in erhöhten Mengen vor. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese Varianten nicht-funktionell sind und Sod1 nicht aktivieren können (Schmidt

et al., 1999; Caroline Burgard, Groß *et al.*, 2011). Es scheint eine Rückkopplung zu geben, die zu einer höheren Expression von Ccs1 führt, wenn dieses nicht funktionell ist. Diese Ungleichheit in der Expression muss bedacht werden, wenn man die Mengen von in Mitochondrien importiertem Ccs1 untersucht.

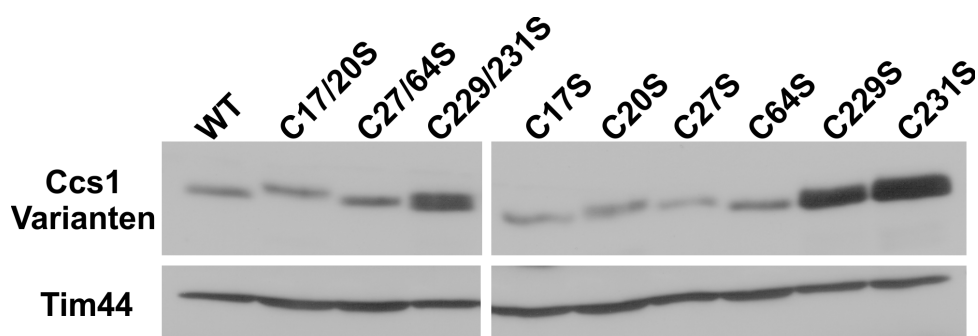


Abb. 4: Zellextrakte von Zellen mit verschiedenen Ccs1 Varianten. Von jeder Variante wurden Zellextrakte aufgetragen, die einer Zellmenge von 0,5 OD₆₀₀ entsprechen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

III - 1.1.2 Vergleich der Proteinmengen an Ccs1-Varianten in Mitochondrien

Um festzustellen, welche Cysteine eine Rolle beim Import von Ccs1 spielen, wurden die Mengen der verschiedenen Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 in Mitochondrien untersucht. Zuerst wurden Mitochondrien aus Hefezellen isoliert, die Ccs1-Varianten mit einer einzelnen Cystein-zu-Serin-Mutation exprimierten. Die Proteinmengen der einzelnen Varianten in den Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration untersucht. Die Varianten C17S, C20S und C27S zeigten keine Abweichung von Wildtyp-Ccs1 (s. Abb. 5). Entsprechend ihrer erhöhten Zellmengen waren die Menge der Varianten C229S und C231S auch in den Mitochondrien erhöht. Eindeutig erniedrigt war die Menge der Variante C64S. Von dieser Variante schien aufgrund des fehlenden Cysteins C64 weniger in die Mitochondrien importiert worden zu sein. Oder die Ccs1-Variante C64S war weniger stabil nach dem Import in Mitochondrien. Die Variante C159S wurde ebenfalls untersucht und verhielt sich in allen Experimenten wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Tim44 diente als Ladekontrolle.

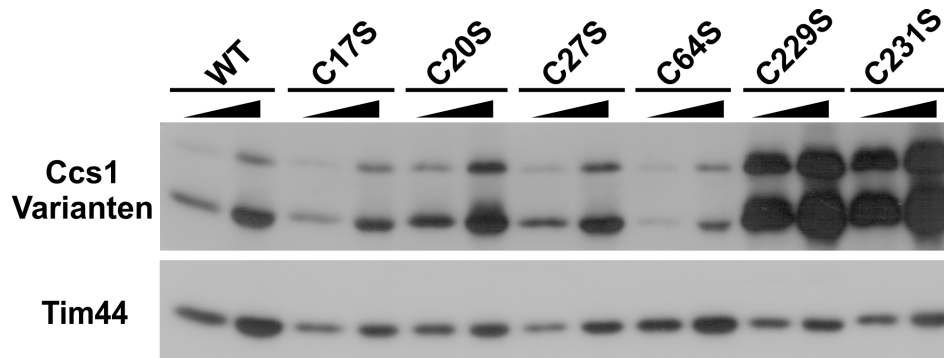


Abb. 5: Mitochondriale Proteinmengen der Ccs1-Einzelvarianten. Es wurden 12,5 und 25 μ g isolierte Mitochondrien aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die Varianten wurden mit 2 HA-Anhängen exprimiert. In Mitochondrien wurde jedoch ein Abbau dieser Anhänge durch nicht identifizierte, endogene Proteasen beobachtet. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang. Tim44 diente als Ladekontrolle.

Analog zu den Varianten mit einzelnen Cystein-Mutationen wurden auch die Mengen der Ccs1-Varianten mit zweifacher Cystein-Mutation in isolierten Mitochondrien untersucht. Die Variante C17/20S zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp (s. Abb. 6). Die Menge der Variante C229/231S war erhöht, wie es auch bei den zugehörigen Einzelvarianten beobachtet worden war. Die Menge der Variante C27/64S war als Einzige vermindert. Tim44 diente als Ladekontrolle.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Cystein C64 für die Menge an Ccs1 in Mitochondrien wichtig ist und das Fehlen eines der restlichen sechs Cysteine keinen großen Einfluss auf die Lokalisation von Ccs1 hat. Die Verminderung in der Menge der Ccs1-Variante C27/64S bestätigt die Wichtigkeit des Cysteins C64 des Ccs1 für die Biogenese des Proteins in Mitochondrien.

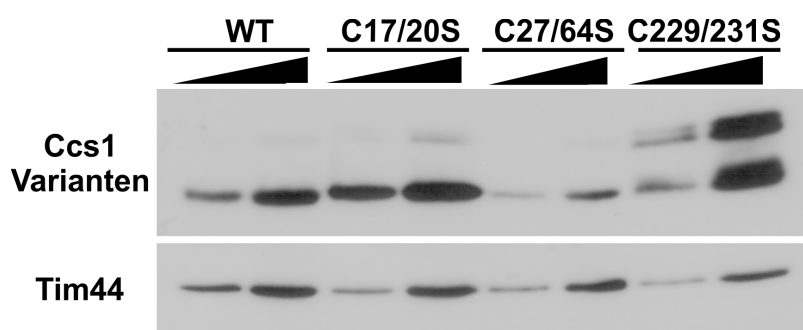


Abb. 6: Mitochondriale Proteinmengen der Ccs1-Doppelvarianten. Es wurden 12,5 und 25 μ g isolierte Mitochondrien aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau. Tim44 diente als Ladekontrolle.

III - 1.1.3 Bestätigung der mitochondrialen Lokalisation der Ccs1-Varianten

Während der Präparation von Mitochondrien können auch Proteine mitisoliert werden, die außerhalb der Organellen anhaften. Um sicherzustellen, dass die betrachteten Mengen an Ccs1 im Inneren der Mitochondrien vorlagen, wurden intakte Mitochondrien mit Protease behandelt und damit alle Proteine abgebaut, die nicht im Inneren der Mitochondrien geschützt waren. Die Mengen an Ccs1 änderten sich mit der Zugabe der Protease nicht (s. Abb. 7). Das Kontrollprotein Tim44, das in der Matrix vorliegt (Blom *et al.*, 1993), war ebenfalls nicht betroffen, während Tom70, das als Protein der äußeren Membran von der Protease angegriffen werden kann (Hines *et al.*, 1990), verdaut wurde.

Somit ist gezeigt, dass das in den Mitochondrienfraktionen detektierte Ccs1 und die Ccs1-Varianten innerhalb der Mitochondrien vorliegen.

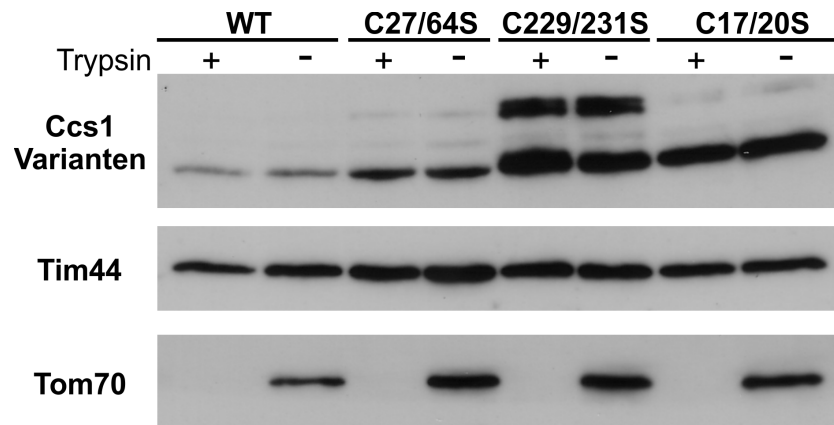


Abb. 7: Ccs1 befindet sich im Inneren intakter Mitochondrien. Es wurden 100 µg/ml Trypsin und 25 µg Mitochondrien pro Spur verwendet. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau.

III - 1.1.4 Vergleich der Proteinmengen von nur mitochondrial lokalisierten Ccs1-Fusionsproteinen

Die Verringerung der mitochondrialen Proteinmengen der Ccs1-Varianten C64S und C27/64S muss nicht direkt vom Import der Proteine durch das Disulfid-Relay-System abhängen. Es könnte lediglich auf einen erhöhten Proteinabbau dieser Varianten im IMR beruhen. Um dies auszuschließen, wurden Konstrukte verwendet, bei denen die Ccs1-Varianten eine Cytochrom *b*₂-Präsequenz (AS 1-88) trugen. Mit dieser Präsequenz am N-Terminus wird das Protein zuerst über die TIM23-Translokase in die innere Membran inseriert (Stopp-Transfer-System). Dann werden die Präsequenz und das hydrophobe Segment durch die endogenen Proteasen MPP und IMP abgeschnitten und das lösliche Protein wird im IMR freigesetzt (Glick *et al.*, 1992). Der Import dieser Fusionsproteine in den IMR ist somit unabhängig vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System.

Die Mengen der Doppelvarianten der Ccs1-Fusionsproteine wurden in isolierten Mitochondrien untersucht. Es fanden sich gleichgroße Mengen von WT und den beiden Ccs1-Fusionsprotein-Varianten C17/20S und C27/64S (s. Abb. 8). Dies zeigte, dass die Ccs1-Fusionsprotein-Variante C27/64S in Mitochondrien nicht vermehrt abgebaut wurde. Durch die höhere Expression der Ccs1-Fusionsprotein-Variante C229/231S fanden

sich, wie für die Ccs1-Variante C229/231S, größere Mengen dieser Variante in den Mitochondrien. Tim44 diente als Ladekontrolle.

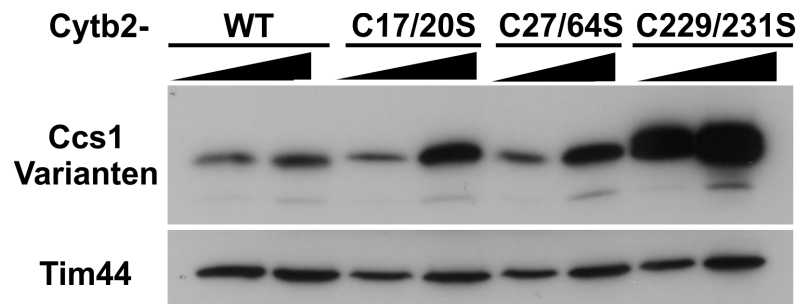


Abb. 8: Mitochondriale Mengen der Ccs1-Fusionsproteine.

Es wurden 12,5 und 25 μg Mitochondrien aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die obere Bande der Ccs1-Fusionsprotein-Varianten entsprach Ccs1 ohne HA-Anhang. Die untere Bande war ein Abbauprodukt von Ccs1. Tim44 diente als Ladekontrolle. Cytb2: Proteine wurden mit einer N-term. Cytochrom b_2 -Präsequenz (AS 1-88) exprimiert.

Dieses Ergebnis demonstriert, dass der mangelhafte Import der Ccs1-Variante C27/64S in Mitochondrien auf einen Importdefekt dieser Variante und nicht auf ihren Abbau in Mitochondrien beruht.

III - 1.2 Spezifische Cystein-Reste in Ccs1 vermitteln den Mia40-abhängigen Import von Ccs1

Es wurde gezeigt, dass die Menge an WT-Ccs1 in den Mitochondrien von der Menge an Mia40 abhängt (Reddehase *et al.*, 2009). Zusammen mit den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit ergab sich die Frage, in wieweit die Proteinmengen der einzelnen Ccs1-Cystein-Varianten von der Menge an Mia40 abhängen. Hat das Fehlen bestimmter Cysteine direkten Einfluss auf den Mia40-abhängigen Import von Ccs1? Hängt der oben gezeigte verminderte Import der Ccs1-Varianten C64S und C27/64S in Mitochondrien direkt mit Mia40 und dem Disulfid-Relay-System zusammen? Um dies zu untersuchen, wurden die einzelnen Varianten in einem $\Delta ccs1$ -Stamm exprimiert, der einen galaktose-induzierbaren Promotor vor dem *MIA40*-Gen aufweist. Damit war es durch Wahl der

Zuckerquelle im Wachstumsmedium möglich, die Mengen an Mia40 herauf- (Galaktose) oder herunterzuregulieren (Glukose).

Zuerst wurde ein Stamm untersucht, in dem die Menge an Mia40 hochreguliert war, und dieser mit einem Stamm ohne galaktoseinduzierbaren Promotor verglichen. Die Proteinmengen der Ccs1-Varianten und des WT-Ccs1 in den Mitochondrien wurden miteinander verglichen. Wie bereits beschrieben, stiegen auch hier die Mengen an WT-Ccs1, wenn mehr Mia40 in den Mitochondrien für den Import zur Verfügung stand (Reddehase *et al.*, 2009). Das war auch der Fall für die Varianten C17/20S und C229/231S (s. Abb. 9). Die Menge an Ccs1 C27/64S war hingegen nicht erhöht. Als Ladekontrolle diente wiederum Tim44. Das Mia40-Substrat Tim13, das nur in Mitochondrien vorkommt, war bei einer Hochregulation der Mengen von Mia40 nicht verändert. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen (Reddehase *et al.*, 2009).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Import der Ccs1-Variante C27/64S durch eine größere Menge an Mia40 nicht mehr verstärkt und damit die gegenüber den anderen Varianten verringerte Menge an Ccs1 nicht vermehrt werden kann.

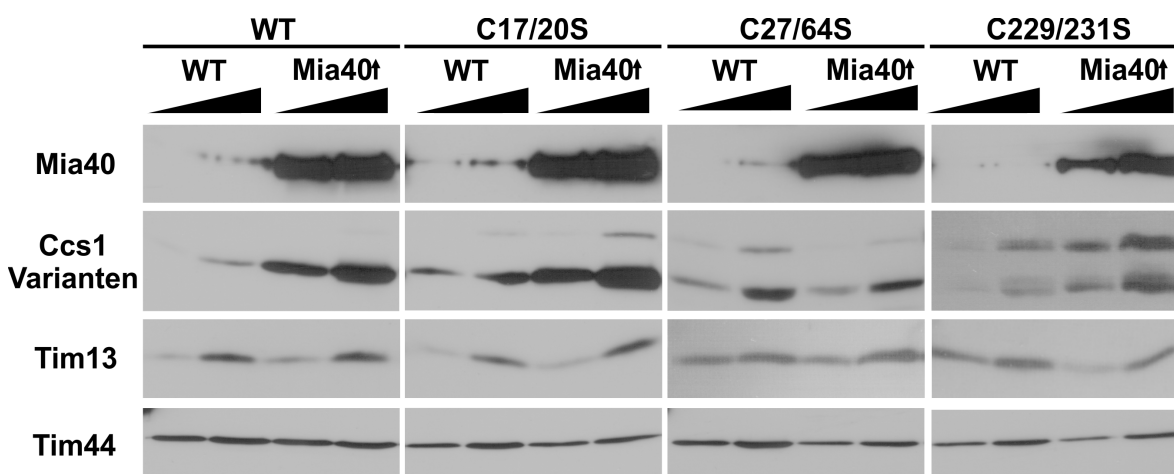


Abb. 9: Die mitochondrialen Mengen der Variante C27/64S werden durch mehr Mia40 nicht erhöht. Es wurden 12,5 und 25 µg Mitochondrien aufgetragen. WT: Wildtypzellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Mia40↑: Zellen mit hochregulierter Menge an Mia40. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die Expositionen wurden entsprechend gewählt, um ähnliche Signalstärken zu zeigen. Vergleiche der absoluten Proteinmengen von Ccs1 dürfen deshalb zwischen den Varianten nicht gezogen werden. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau. Tim44 diente als Ladekontrolle.

Als Nächstes wurden die Proteinmengen von Ccs1 in isolierten Mitochondrien untersucht, in denen die Menge an Mia40 runterreguliert und das Protein somit nahezu entfernt worden war. Die Mengen an WT-Ccs1 waren, wie bereits beschrieben, in den Mitochondrien mit wenig Mia40 verringert (Reddehase *et al.*, 2009). Dies traf ebenso auf die Ccs1-Varianten C17/20S und C229/231S zu (s. Abb. 10). Die Variante C27/64S war ebenfalls verringert, jedoch zu einem kleineren Grad. Als Ladekontrolle diente Tim44. Tim13 war als Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems durch die geringe Menge an Mia40 ebenfalls betroffen und seine Menge verringert. Durch die verlängerte Verdopplungszeit der Zellen der funktionell gestörten Ccs1-Variante C229/231S liegt in den Mitochondrien, die aus diesem Stamm präpariert wurden, noch mehr Mia40 vor. Dadurch sind keine Effekte auf die Mengen an Tim13 zu sehen. Die Mengen der Ccs1-Variante C229/231S sind in diesen Mitochondrien jedoch bereits betroffen und ebenfalls verringert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ccs1-Variante C27/64S anders auf eine Herauf- und Herunterregulation der Mengen von Mia40 reagiert als der WT und die restlichen Varianten. Eine im Gegensatz zu den anderen Varianten verminderte Menge der Ccs1-Variante C27/64S wird in Mitochondrien importiert. Diese Menge kann nicht vermehrt werden, wenn mehr Mia40 für den Import zur Verfügung steht. Dennoch ist die importierte Menge an Ccs1 C27/64S verringert, wenn weniger Mia40 in den Mitochondrien vorliegt. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, könnte aber auf eine indirekte Beteiligung des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems beim Import von Ccs1 C27/64S hinweisen. Die indirekte Beteiligung des Disulfid-Relay-Systems geschieht eventuell über ein anderes Substrat dieses Systems, dessen Menge in Mitochondrien mit mehr Mia40 nicht erhöht, in Mitochondrien mit weniger Mia40 jedoch verringert ist. Durch die verminderte Menge dieses unbekanntes Substrates könnte auch die Menge an Ccs1 C27/64S ohne direkte Beteiligung von Mia40 sinken.

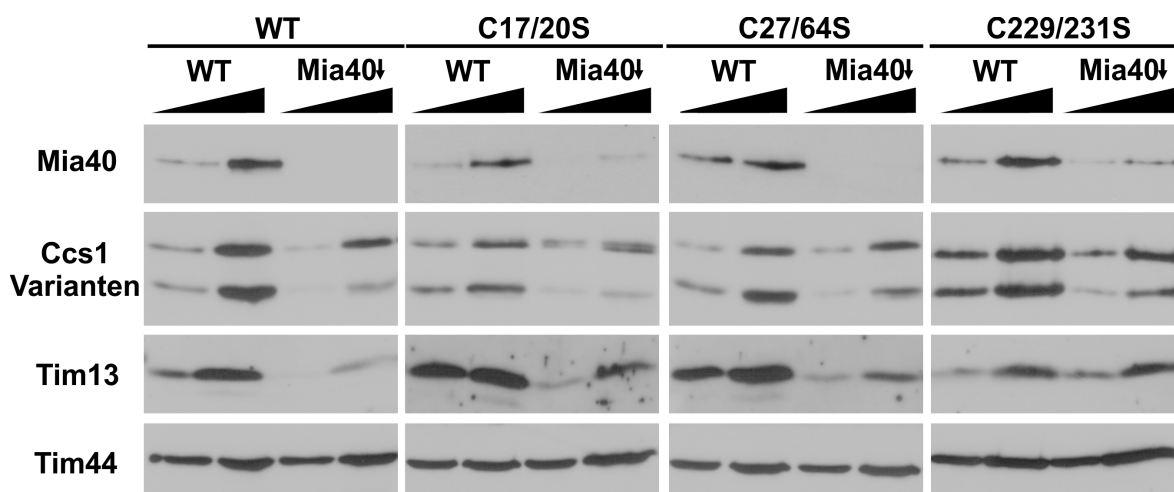


Abb. 10: Die mitochondrialen Mengen der Ccs1-Varianten werden durch geringere Mengen an Mia40 reduziert.

Es wurden 12,5 und 25 μg Mitochondrien aufgetragen. WT: Wildtypzellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Mia40 \downarrow : Zellen mit runterregulierter Menge an Mia40; Zellen wuchsen 30 h in Medium mit Glukose. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Die Auswahl der Expositionen erfolgte, wie für Abb. 9 beschrieben. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau. Tim44 diente als Ladekontrolle.

III - 1.3 Mia40 interagiert mit Ccs1 vor allem über dessen Cysteinrest C64

Die unterschiedlichen mitochondrialen Proteinmengen der Ccs1-Varianten und ihre ungleiche Abhängigkeit von den Mengen an Mia40 weisen darauf hin, dass bestimmte Cysteinreste von Ccs1 für dessen Mia40-abhängigen Import wichtig sind. Das Cystein C64 scheint bei dem Import von Ccs1 in Mitochondrien durch das Disulfid-Relay-System eine besondere Rolle zu spielen. Im Weiteren soll die direkte Interaktion von Ccs1 mit Mia40 und deren Abhängigkeit von den einzelnen Cysteinen von Ccs1 mit Hilfe der Cystein-Varianten beleuchtet werden.

III - 1.3.1 In der Importreaktion wird kein Disulfid-Intermediat zwischen der Ccs1-C27/64S-Variante und Mia40 detektiert

Das Intermediat einer Interaktion zwischen Mia40 und Ccs1 kann auf einem nicht-reduzierendem SDS-Gel nachgewiesen werden (Reddehase *et al.*, 2009). Um zu kontrollieren, welche Cysteinreste eine Rolle bei der Bildung des Disulfid-Intermediates zwischen

importiertem Ccs1 und Mia40 spielen, wurde radioaktiv markiertes Ccs1 in isolierte Mitochondrien importiert. Dazu wurde das *in vitro* translatierte und mit radioaktivem Methionin und Cystein markierte Protein mit isolierten Mitochondrien für 15 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurde das unimportierte Material mittels Trypsin verdaut und die Mitochondrien isoliert. Gleich im Anschluss wurden die Mitochondrien lysiert und Mia40 mittels seinem Oktahistidyl-Anhang durch Ni-NTA-Präzipitation gereinigt. Durch Autoradiographie wurde auf koisoliertes Ccs1 untersucht. Das Intermediat zwischen Ccs1 und Mia40 war im WT sowohl in der Ladekontrolle als auch im Eluat zu sehen (s. Abb. 11). Dies traf auch für die beiden Varianten C17/20S und C229/231S zu. Anders verhielt sich die Variante C27/64S. Hier konnte kein Intermediat mit Mia40 nachgewiesen werden.

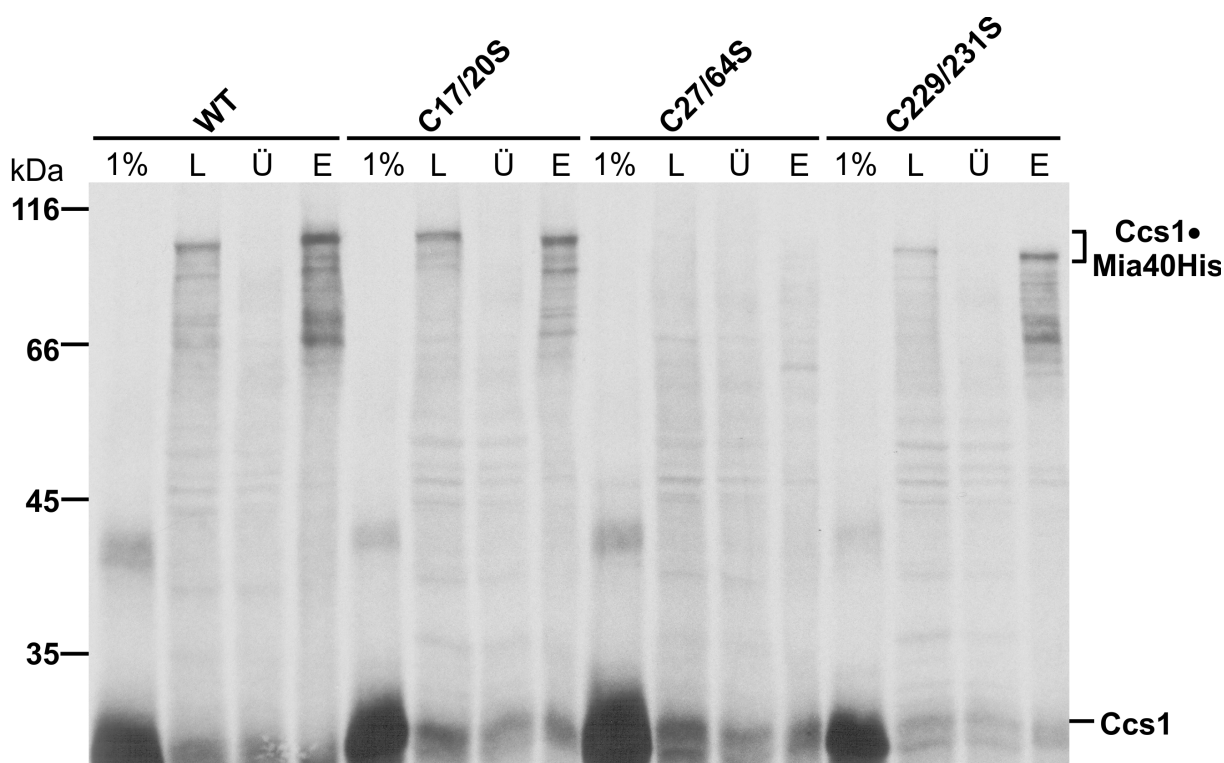


Abb. 11: Radioaktiv markiertes Ccs1 C27/64S interagiert während einer Importreaktion nicht mit Mia40. Radioaktiv markiertes Ccs1 (12 %) wurde mit 250 µg isolierten Mitochondrien für 15 min bei 25 °C in 100 µl Importpuffer inkubiert. Der Ansatz wurde mit 80 mM IAA behandelt (15 min, 25 °C). Nicht importiertes Material wurde durch Zugabe von 50 µg/ml Trypsin auf Eis für 15 min verdaut, danach der Verdau mit STI (1 mg/ml) gestoppt und die Mitochondrien isoliert. Daraufhin wurden die Mitochondrien lysiert und Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang mittels Ni-NTA Präzipitation präzipitiert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie der radioaktiv markierten, koisolierten Ccs1-Varianten. 1%: 1 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Ccs1. L: 10 % des eingesetzten Materials dienten als Ladekontrolle. Ü: Überstand. E: Eluat, gebundenes Material. Ccs1•Mia40His: Intermediat zwischen radioaktiv markiertem Ccs1 und Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang.

Die Ccs1-Variante C27/64S interagiert also nicht oder kaum mit Mia40 während eines *in vitro* Imports. Dadurch kann Ccs1 C27/64S nicht durch Mia40 in Mitochondrien importiert werden. Dies erklärt, die geringen Proteinmengen dieser Variante in isolierten Mitochondrien und warum diese Mengen beinahe völlig unabhängig von der Menge an Mia40 sind.

III - 1.3.2 Auch endogenes Ccs1 interagiert vor allem über seinen Cystein-Rest C64 mit Mia40

Auch endogenes Ccs1 kann in Mitochondrien ein Intermediat mit Mia40 bilden (Reddehase *et al.*, 2009). Deshalb wurde untersucht, welche Cysteine bei dieser Interaktion von endogenem Ccs1 mit Mia40 eine Rolle spielen. Dazu wurde ein Kopräzipitationsexperiment mit isolierten Mitochondrien durchgeführt. Die Mitochondrien wurden mit IAA inkubiert, lysiert und Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang mittels Ni-NTA-Präzipitation isoliert. WT-Ccs1 konnte zusammen mit Mia40 im Intermediat nachgewiesen werden (s. Abb. 12). Auch das Intermediat der Varianten C17/20S und C229/231S mit Mia40 konnte in der Ladekontrolle (L) und dem Eluat (E) gefunden werden. Die Varianten C27/64S und C64S bildeten hingegen kein oder kaum Intermediat mit Mia40. Die Variante C27S bildete sehr viel Intermediat. Vergleich man die Menge an Intermediat mit der Menge an Monomer, fiel der Unterschied der Variante C27S zum WT und den beiden Varianten C17/20S und C229/231S besonders auf. In dieser Variante lag das Cystein C64 vermutlich reduziert und damit für Mia40 zugänglich vor, während in allen anderen Varianten das Cystein C64 nach dem Import von Ccs1 in den IMR oxidiert als Disulfid vorlag (vgl. III - 1.4).

Auch in isolierten Mitochondrien zeigt sich, dass endogenes Ccs1 ohne das Cystein C64 nicht oder kaum fähig ist, mit endogenem Mia40 zu interagieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mia40 mit Ccs1 über eine intermolekulare Disulfidbrücke mit dem Cystein C64 interagiert und das Intermediat formt. Ohne dieses Cystein kommt dieses Intermediat kaum zu Stande. Im Wildtyp könnte die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Ccs1 und Mia40 durch die Bildung einer intramolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen von Ccs1 gelöst werden, wie es auch für andere Substrate von Mia40

postuliert ist (Mesecke *et al.*, 2005). Dass mit der Ccs1-Variante C27S mehr Intermediat zu sehen ist, ist ein Hinweis darauf, dass in dieser Variante das zweite Cystein fehlt, das die intramolekulare Disulfidbrücke in Ccs1 bildet. Die intermolekulare Brücke kann also nicht aufgelöst werden und es ist mehr Intermediat zu sehen. Um die Existenz einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 nachzuweisen, wurde der Redoxzustand von Ccs1 untersucht (s. III - 1.4).

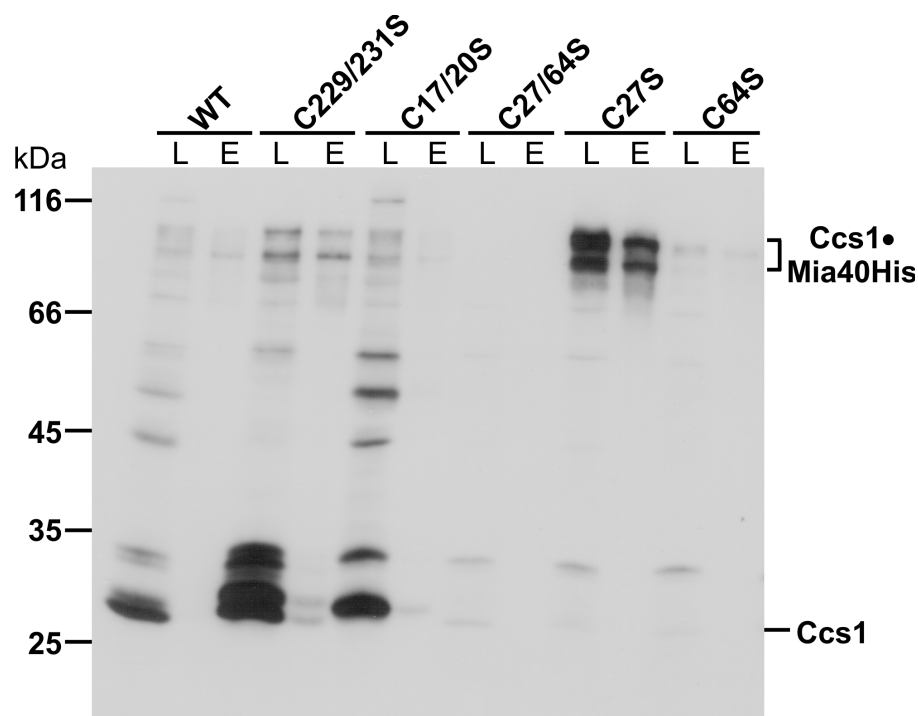


Abb. 12: Die Ccs1-Varianten C27/64S und C64S interagieren in Mitochondrien nicht oder kaum mit Mia40.

Isolierte Mitochondrien wurden mit 70 mM IAA 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Mitochondrien wurden lysiert und Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang mittels Ni-NTA-Präzipitation isoliert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Ccs1. Die Bande über dem markierten Ccs1-Monomer entspricht Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die restlichen, nicht markierten Banden zeigen Kreuzreaktionen des Antikörpers. L: 10 % des eingesetzten Materials dienten als Ladekontrolle. E: Eluat, gebundenes Material. Ccs1•Mia40His: Intermediat zwischen Ccs1 und Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang.

III - 1.3.3 Die rekombinante Domäne I von Ccs1 interagiert mit Mia40

Um die Interaktion zwischen Ccs1 und Mia40 über das Cystein C64 von Ccs1 *in vitro* zu bestätigen, wurde ein Interaktionsexperiment mit rekombinatem Mia40 und rekombinanten Ccs1 aus *E. coli* durchgeführt. Um das System einfach zu halten, wurde nur die Domäne I von Ccs1 (Ccs1-dI) exprimiert und untersucht. Ebenso wurde nur der funktionelle Teil von Mia40 (Mia40C) verwendet (Grumbt *et al.*, 2007). Die über einen GST-Anhang gereinigte, gefaltete Domäne I von Ccs1 wurde mit DTT reduziert und anschließend mit gefaltetem Mia40C inkubiert. Der Ansatz wurde gewaschen, dann über eine SDS-PAGE analysiert und mittels Immunodekoration mit Antikörpern gegen Mia40 auf koisoliertes Mia40C untersucht. WT-Ccs1 interagiert mit Mia40C und formte ein Intermediat (s. Abb. 13). Dies konnte auch für die Variante C17/20S beobachtet werden. Die Variante C27/64S jedoch interagiert kaum mit Mia40C. Dasselbe traf für die Variante C64S zu. Hingegen interagiert die Variante C27S besonders stark mit Mia40C und bildete mehr Intermediat als der WT, wie es auch schon für das endogene Ccs1 beobachtet wurde (vgl. III - 1.3.2).

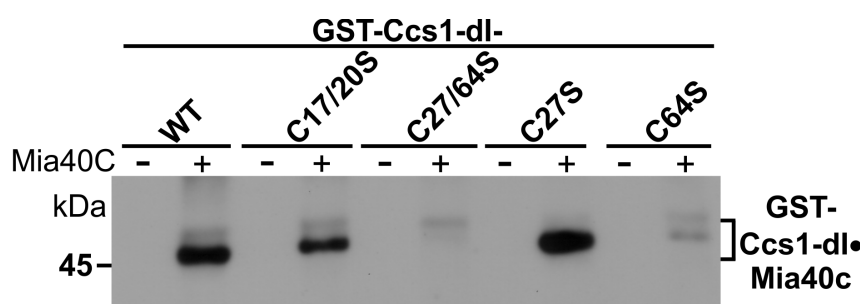


Abb. 13: Die rekombinante Domäne I der Ccs1-Varianten C27/64S und C64S interagiert nicht mit rekombinatem Mia40C.

Rekombinantes Ccs1 wurde mit GST-Anhang aus *E. coli* isoliert. Das Lysat wurde an GSH-Kügelchen gebunden, 1 h bei 4 °C mit 5 mM DTT reduziert und mit 220 µM Mia40C 10 min bei 25 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 50 mM IAA behandelt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Mia40. GST-Ccs1-dI: rekombinante Domäne I (AS 1 – 74) von Ccs1 fusioniert an GST. GST-Ccs1-dI•Mia40c: Intermediat zwischen rekombinanter Domäne I von Ccs1 fusioniert an GST und Mia40C.

Die mit den rekombinanten Proteinen erzielten Ergebnisse stimmen mit den in Mitochondrien gewonnenen Ergebnissen überein. Es konnte bestätigt werden, dass Mia40 mit Ccs1 über sein Cystein C64 interagiert und dass das Cystein C27 offenbar nötig ist, um die intermolekulare Disulfidbrücke wieder zu lösen.

III - 1.4 Der Redoxzustand der Ccs1-Varianten

III - 1.4.1 Ccs1 weist in Mitochondrien eine stabile Disulfidbrücke auf

Die klassischen Substrate des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems tragen Disulfidbrücken. WT-Ccs1 trägt insgesamt 7 Cysteine. Um zu testen, ob und zwischen welchen Cysteinen Ccs1 Disulfidbrücken trägt, wurden AMS Experimente durchgeführt. AMS lagert sich an freie Thiole an und fügt so dem Protein 500 Da hinzu. Die so erzeugte Änderung der Laufgeschwindigkeit in einer SDS-PAGE erlaubt es, auf die Anzahl der freien Thiole im Protein und im Umkehrschluss auf vorhandene Disulfidbrücken zu schließen. Isolierte Mitochondrien wurden in SH-Puffer mit oder ohne Zugabe von DTT bei 25 oder 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit AMS versehen. Die dadurch erzeugten Veränderungen in der Laufgeschwindigkeit wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration gegen Ccs1 analysiert. WT-Ccs1 zeigte bei Inkubation von isolierten Mitochondrien mit AMS mehrere langsamere Spezies in der Gelelektrophorese (s. Abb. 14, Abschnitt links oben, Spur 2). Dies ließ darauf schließen, dass mehrere freie Thiole in diesem Protein vorhanden waren. Nach Inkubation mit DTT bei 25 °C war nur noch eine Bande zu sehen (Spur 3). Dies wies darauf hin, dass es in dem Protein Disulfidbrücken gab, die durch die milden reduzierenden Bedingungen geöffnet wurden. Wenn mit DTT bei 95 °C inkubiert wurde (Spur 4), wurde das Protein vollkommen reduziert und unterlag einer weiteren Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit.

Dies zeigt, dass eine Disulfidbrücke in Ccs1 vorhanden ist, die gegen DTT bei 25 °C stabil ist und nur durch harsche Reduktionsbedingungen geöffnet wird.

Um die Frage zu klären, zwischen welchen Cysteinen diese stabile Disulfidbrücke besteht, wurden die Ccs1-Cystein-Varianten untersucht. Die beiden Varianten C17/20S und C229/231S zeigten ein dem WT sehr ähnliches Verhalten (s. Abb. 14, untere Abschnitte). Nur die Variante C27/64S unterschied sich in ihrem Verhalten. Wenn DTT

hinzugefügt wurde, zeigte die Variante schon bei 25 °C ihre langsamste Laufform. Nach einer Inkubation bei 95 °C erfolgte keine zusätzliche Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit (s. Abb. 14, Abschnitt rechts oben, Spuren 3 und 4). Alle Disulfidbrücken wurden in dieser Variante offensichtlich bereits durch milde reduzierende Bedingungen geöffnet. Die stabile Disulfidbrücke des WT's ist in dieser Variante nicht vorhanden. Daraus ergibt sich, dass die Cysteine C27 und C64 von Ccs1 eine stabile Disulfidbrücke bilden.

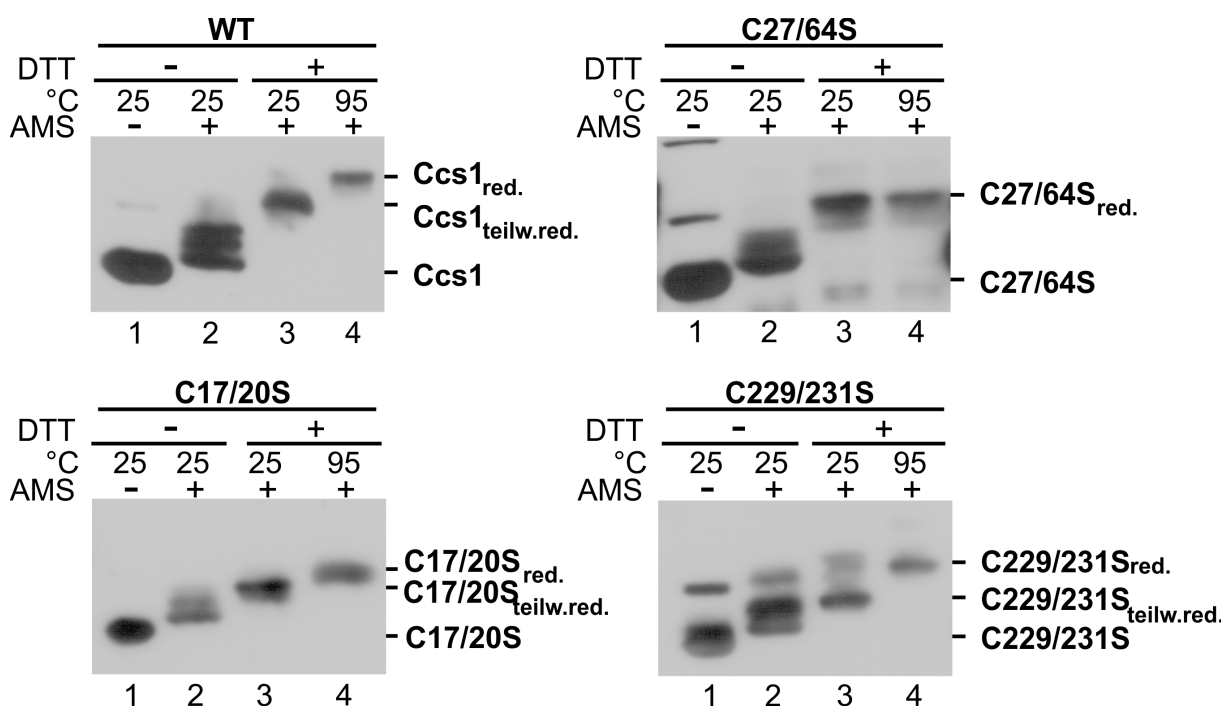


Abb. 14: Ccs1 enthält eine stabile Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64.

Isolierte Mitochondrien aus Zellen, in denen die Expression von Mia40 hochreguliert war, wurden in SH-Puffer mit oder ohne 15 mM DTT bei 25 oder 95 °C 10 min inkubiert. Nach TCA-Fällung wurde das Proteinpellet in SDS-Puffer resuspendiert und mit oder ohne AMS (10 mM) 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit 50 mM IAA versehen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Ccs1. Teilweise sichtbare, höhere Banden entsprechen Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. red.: reduziert, teilw. red.: teilweise reduziert

III - 1.4.2 Die stabile Disulfidbrücke ist auch in den Ccs1-Fusionsproteinen vorhanden

Um zu testen, ob die Bildung der stabilen Disulfidbrücke direkt vom Mia40-getriebenen Import abhängt, wurden zwei Varianten der Ccs1-Fusionsproteine untersucht, deren Import durch ihre Cytochrom b_2 -Präsequenz vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System unabhängig ist (vgl. III - 1.1.4). Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass die Menge der jeweiligen Ccs1 Variante einen Einfluss auf ihre Oxidation hat, da die Menge der Ccs1-Fusionsproteine sich in Mitochondrien zwischen den Varianten nicht unterscheidet. Die beiden Varianten der Ccs1-Fusionsproteine (Cytb2-WT und Cytb2-C27/64S) wurden in einem AMS-Experiment untersucht, wie es oben unter III - 1.4.1 beschrieben wurde. Jedoch wurden keine isolierten Mitochondrien verwendet, sondern ganze Zellen, da sämtliches Ccs1 der Fusionsproteine in Mitochondrien vorlag. Die Zellen wurden in einer O_2 -freien *Glovebox* geöffnet und das Experiment darin durchgeführt, um eine artifizielle Oxidation der Cysteine des Proteins in den Mitochondrien durch Luftsauerstoff auszuschließen. Das Ccs1-Fusionsprotein Cytb₂-WT verhielt sich ähnlich dem Ccs1-WT ohne Cytochrom b_2 -Präsequenz (vgl. III - 1.4.1, Abb. 14). Auch in diesem Experiment unter Ausschluss des Luftsauerstoffs konnte im WT-Protein eine stabile Disulfidbrücke nachgewiesen werden, die nur durch Inkubation mit DTT bei 95 °C zu öffnen war (s. Abb. 15). Die Ccs1-Variante Cytb₂-C27/64S zeigte diese Brücke wie erwartet nicht. Interessanterweise baut Mia40 die stabile Disulfidbrücke also auch in Ccs1 ein, das über einen alternativen Importweg unabhängig von Mia40 in den IMR von Mitochondrien importiert wurde. Dies könnte eventuell für die Faltung des Proteins von Bedeutung sein. Der Ausschluss von Luftsauerstoff sorgte dafür, dass schon ohne DTT nach Behandlung mit AMS größtenteils nur die oberste der teilweise reduzierten Banden zu sehen war. Dies spricht dafür, dass die nicht-stabilen Disulfidbrücken, die in Abb. 14 in den Spuren 2 zu sehen waren, während der Präparation gebildet werden könnten und *in vivo* womöglich nicht vorhanden sind.

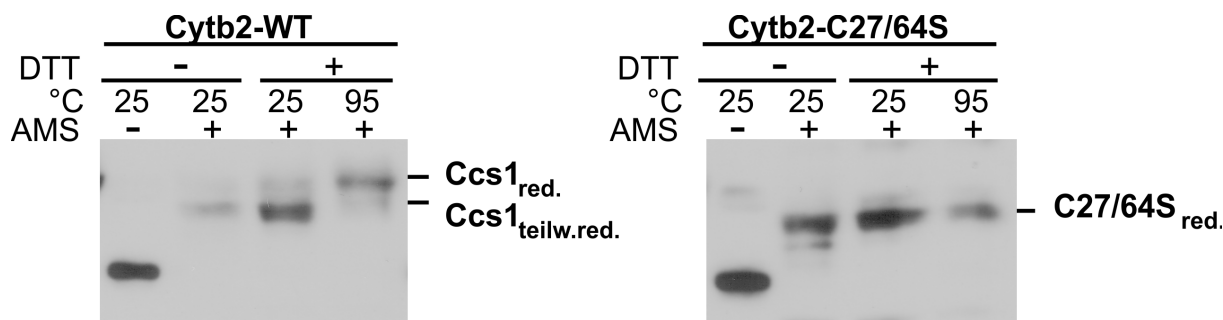


Abb. 15: Die Bildung der stabilen Disulfidbrücke in Ccs1 durch Mia40 ist nicht auf einen Mia40-vermittelten Import angewiesen.

Ganze Hefezellen wurden in einer O₂-freien *Glovebox* mit Glaskügelchen geöffnet und das Lysat mit oder ohne 50 mM DTT bei 25 oder 95 °C 10 min inkubiert. Nach TCA-Fällung wurde das Proteinpellet in SDS-Puffer resuspendiert und mit oder ohne AMS (10 mM) 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit 50 mM IAA versehen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Ccs1. Cytb2: Proteine wurden mit einer N-term. Cytochrom *b*₂-Präsequenz (AS 1-88) exprimiert. red.: reduziert, teilw. red.: teilweise reduziert

III - 1.4.3 In zytosolischem Ccs1 findet sich keine stabile Disulfidbrücke

Da Mia40 nur in Mitochondrien vorkommt (Chacinska *et al.*, 2004), Ccs1 aber auch im Zytosol (Culotta *et al.*, 1997; Sturtz *et al.*, 2001), kommt die Frage auf, ob zytosolisches Ccs1 auch die stabile Disulfidbrücke trägt, die in Mitochondrien beobachtet wurde. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein AMS-Experiment mit Zytosol durchgeführt. Zytosolisches WT-Ccs1 zeigte schon ohne Zugabe von DTT mit AMS fast nur die langsamste Laufform, die einem vollständig reduziertem Protein entsprach (s. Abb. 16). Dies wies darauf hin, dass Ccs1 im Zytosol zu einem sehr großen Teil reduziert vorlag und möglicherweise nur eine sehr kleine Menge teilweise oxidiert war. Auch nach Zugabe von DTT änderte sich das Laufverhalten des Ccs1-WT nicht. Die Ccs1-Variante C27/64S besitzt 2 Cysteine weniger. Dadurch konnten sich in diesem Experiment 2 AMS weniger an dieses Protein lagern und die Laufgeschwindigkeit war schneller als beim Ccs1-WT. Ansonsten verhielt sich die Ccs1-Variante C27/64S aber wie der WT und zeigte ebenfalls keine Disulfidbrücke.

Im WT-Ccs1 im Zytosol ist die stabile Disulfidbrücke nicht nachzuweisen, die das Protein in Mitochondrien trägt. Ccs1 scheint im Zytosol zu einem großen Teil vollständig reduziert vorzuliegen. Das legt den Schluss nahe, dass Mia40 nötig ist, um die stabile Disulfid-

brücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 in Ccs1 einzubauen, was folglich nur in Mitochondrien geschehen kann.

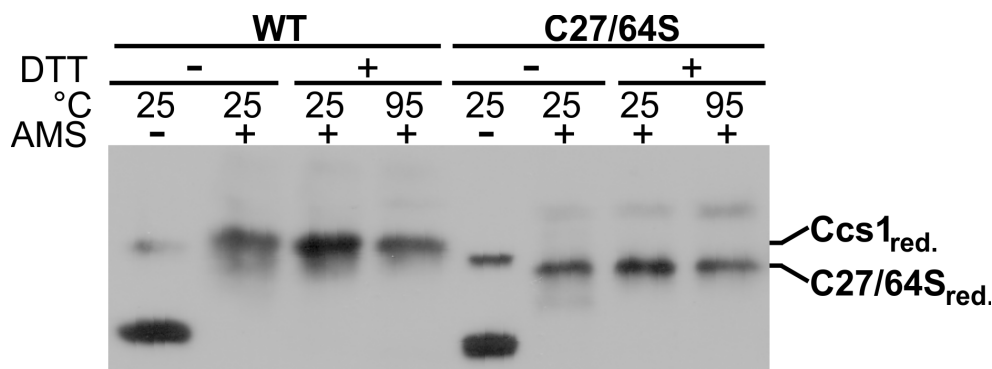


Abb. 16: Zytoplasmatisches Ccs1 trägt keine Disulfidbrücken.

Ganze Hefezellen wurden in einer O₂-freien *Glovebox* mittels eines Glashomogenisators mit einem Pistill geöffnet. Ungeöffnete Zellen und Organellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das Lysat mit oder ohne 15 mM DTT bei 25 oder 95 °C 10 min inkubiert. Nach TCA-Fällung wurde das Proteinpellet in SDS-Puffer resuspendiert und mit oder ohne AMS (10 mM) 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit 50 mM IAA versehen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Ccs1. Teilweise sichtbare, höhere Banden entsprechen Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. red.: reduziert.

III - 1.5 Der Einfluss der Ccs1 Varianten auf den Redoxzustand von Sod1 in Mitochondrien

Offensichtlich wird in Ccs1 während seines Imports eine Disulfidbrücke gebildet. Auch funktionelles Sod1 liegt in Mitochondrien oxidiert vor (Roe *et al.*, 1988; Leitch *et al.*, 2009). Ccs1 vermittelt den Einbau einer Disulfidbrücke in Sod1 (Furukawa *et al.*, 2004). Die Frage stellt sich, welche Cysteine von Ccs1 möglicherweise eine Funktion in der Oxidation von Sod1 haben und ob eventuell die gebildete Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C27 und C64 darin involviert ist. Um zu testen, ob fehlende Cysteine von Ccs1 auf den Redoxzustand von Sod1 Einfluss haben, wurde ein SDS-Gel mit Mitochondrien der verschiedenen Varianten von Ccs1 beladen. Reduziertes Sod1 erkennt man an einem langsameren Laufverhalten in einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE (Jonsson *et al.*, 2006). Die reduzierte Form von Sod1 konnte nur in der Ccs1-Variante C229/231S beob-

achtet werden (s. Abb. 17). In allen anderen Varianten zeigte Sod1 dasselbe Laufverhalten wie im Wildtyp und lag oxidiert vor. Auch wenn in den Mitochondrien aus Zellen mit der Ccs1-Cytb₂-Fusionsprotein-Variante C229/231S mehr Ccs1 vorhanden war (s. Abb. 17, +Cytb₂), konnte der oxidierte Redoxzustand von Sod1, der in den anderen Varianten sichtbar war, nicht hergestellt werden. Im Gegenteil dazu war Sod1 in der Ccs1-Fusionsprotein-Variante C27/64S vollständig oxidiert. Dies war auch der Fall, wenn in der Ccs1-Variante C27/64S ohne Cytochrom *b*₂-Präsequenz weniger Ccs1 als im WT vorhanden war (- Cytb₂).

Das Fehlen der Cysteine C27 und C64 hat also keinen direkten Einfluss auf die Fähigkeit von Ccs1, Sod1 zu oxidieren. Die Funktionalität der Ccs1-Variante C27/64S wurde ebenfalls durch Sod1-Aktivitätsassays von C. Burgard gezeigt (Groß *et al.*, 2011). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die stabile Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 struktureller und nicht funktioneller Natur ist und damit keinen direkten Einfluss auf die Funktion von Ccs1 hat. Dies bestätigt die Ergebnisse, nach denen die Domäne III von Ccs1, die die Cysteine C229 und C231 enthält, unentbehrlich für Aktivierung von Sod1 ist (Schmidt *et al.*, 1999). Der Import von Ccs1 durch das Disulfid-Relay-System in den IMR und damit die Verfügbarkeit von Ccs1 in Mitochondrien hängt jedoch durchaus von den Cysteinen C27 und C64 ab.

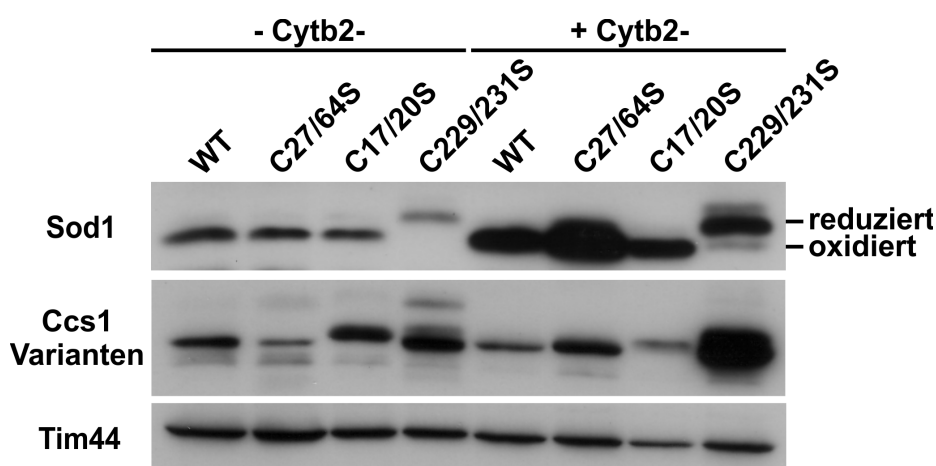


Abb. 17: Redoxzustand von Sod1 in den Ccs1 Varianten. Isolierte Mitochondrien wurden mit Laemmli-Puffer ohne β -ME versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Tim44 diente als Ladekontrolle. Bei den Ccs1-Varianten (- Cytb₂) teilweise sichtbare, höhere Banden entsprechen Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. + Cytb₂: Ccs1-Fusionsprotein-Varianten wurden mit einer N-term. Cytochrom *b*₂-Präsequenz (AS 1-88) exprimiert.

III - 1.6 Die Sensitivität des Ccs1 und der Ccs1-Variante C27/64S gegenüber Trypsin

III - 1.6.1 Die mitochondriale Ccs1-Variante C27/64S ist empfindlicher gegenüber dem Verdau mit Trypsin als WT-Ccs1

Um die Funktion der stabilen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 näher zu bestimmen, wurde untersucht, in wieweit Ccs1 gegenüber einem Verdau mit Trypsin empfindlich ist. Isolierte Mitochondrien aus Zellen mit WT-Ccs1 und mit der Ccs1-Variante C27/64S wurden mit Triton X-100 lysiert, das Lysat mit Trypsin behandelt und dann mittels einer SDS-PAGE analysiert. WT-Ccs1 zeigte nach Inkubation mit Trypsin ein stabiles Fragment (s. Abb. 18). Dieses nur unwesentlich kürzere Fragment f1 dürfte die Domäne I und II von Ccs1 umfassen. Anders verhielt sich die Ccs1-Variante C27/64S. Dieses Protein wurde zu einem großen Teil verdaut. Übrig blieb nur das etwa 16 kDa große Fragment f2, das der Domäne II entsprechen könnte (Schmidt *et al.*, 1999).

Da in der Variante C27/64S die Disulfidbrücke in der Domäne I fehlt, kann diese Domäne möglicherweise nicht stabil falten und könnte dadurch sensitiv gegenüber einem Verdau mit Trypsin sein. Die Disulfidbrücke in Ccs1 zwischen den Cysteinen C27 und C64 sorgt im WT-Protein für eine stabile Faltung und verleiht so der Domäne I eventuell eine Resistenz gegen den Verdau mit Trypsin.

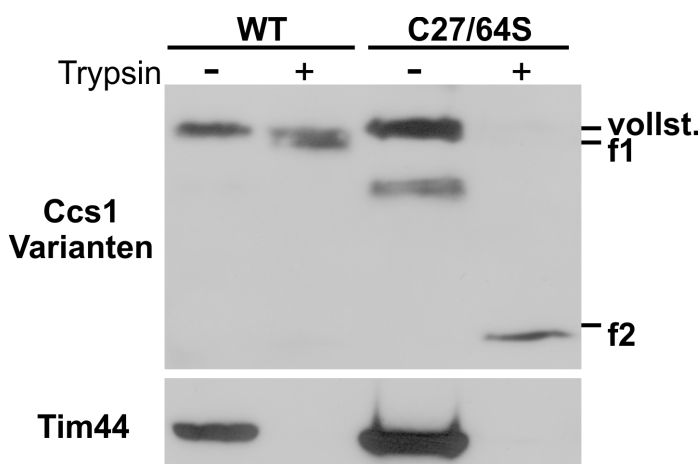


Abb. 18: Die Ccs1-Variante C27/64S ist nicht resistent gegen Verdau mit Trypsin. 60 µg Mitochondrien in SH-Puffer wurden mit 0,5 % Triton X-100 lysiert. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis mit 200 µg/ml Trypsin verdaut und der Verdau dann mit 4 mg/ml STI gestoppt. Die Probe wurde mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Tim44 diente als Kontrolle der Lyse der Mitochondrien und des Verdau. vollst.: Ccs1 mit voller Länge. f1, f2: Fragment 1 und Fragment 2.

III - 1.6.2 Die Ccs1-Fusionsprotein-Variante C27/64S ist auch sensitiv gegenüber Trypsinverdau

Um zu testen, ob die beobachtete Stabilität von Ccs1 auch für das Protein zutrifft, wenn es nicht über das Disulfid-Relay-System importiert wurde, wurden die Ccs1-Fusionsproteine von WT-Ccs1 und der Ccs1-Variante C27/64S untersucht. Wie oben beschrieben wurden auch hier isolierte Mitochondrien aus Zellen mit Ccs1-Fusionsproteinen des Cytb2-WTs und der Variante Cytb2-C27/64S mit Triton X-100 lysiert, das Lysat mit Trypsin behandelt und dann mittels einer SDS-PAGE analysiert. Der Ccs1-Cytb2-WT bildete nach Inkubation mit Trypsin ein stabiles Fragment, das nur wenig kürzer wie das Volllängenprotein war (s. Abb. 19). Die Ccs1-Variante Cytb2-C27/64S hingegen wurde von Trypsin zu einem großen Teil abgebaut, wie es auch für die Ccs1-Variante C27/64S ohne Präsequenz beobachtet worden war.

Dies zeigt, dass die Ccs1-Fusionsproteine sich zwar in ihrem Importweg von der Version ohne Präsequenz unterscheiden, aber sowohl über denselben Redoxzustand (s. III - 1.4.2), als auch über die gleiche Stabilität verfügen. Dies lässt vermuten, dass Mia40 auch bei diesen Konstrukten nach ihrem Import für die Oxidation und Faltung des Proteins sorgt.

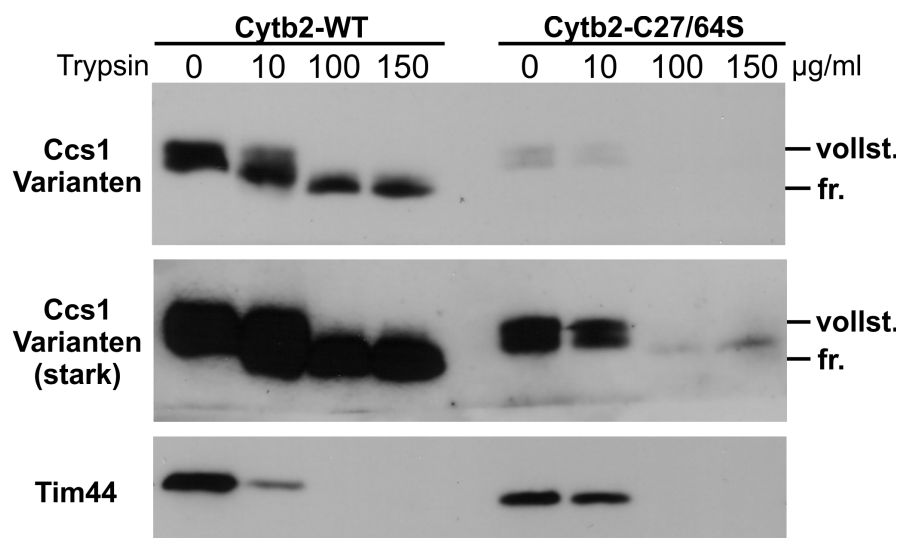


Abb. 19: Die Ccs1-Fusionsprotein-Variante C27/64S ist ebenfalls nicht resistent gegen Verdau mit Trypsin.

100 µg Mitochondrien in SH-Puffer wurden mit 0,5 % Triton X-100 lysiert. Verdau erfolgte 15 min auf Eis mit den angegebenen Trypsinkonzentrationen. Der Verdau wurde durch TCA-Fällung gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Tim44 diente als Kontrolle der Lyse der Mitochondrien und des Verdau. Cytb2: Ccs1-Varianten wurden mit einer N-term. Cytochrom *b*₂-Präsequenz (AS 1-88) exprimiert. vollst.: vollständiges Protein. fr.: Fragment.

III - 1.7 Lokalisierung einer Cystein-freien Ccs1-Variante

Auch in den Ccs1-Varianten C64S und C27/64S findet sich immer noch Ccs1 in den Mitochondrien. Wenn der Import von Ccs1 in Mitochondrien allein von der Interaktion zwischen Mia40 und dem C64 des Ccs1 abhinge, dürfte man in dieser Variante kein Ccs1 mehr in den Mitochondrien detektieren können. Möglicherweise können bei Fehlen des Cysteins C64 andere Cysteine dessen Aufgabe zu einem kleinen Teil übernehmen. Um zu überprüfen, ob ein Import in Mitochondrien auch für ein Ccs1 ohne Cysteine möglich ist, wurde eine Variante erzeugt, in der alle sieben Cysteine durch Serine ausgetauscht wurden.

III - 1.7.1 Die Expression der Cystein-freien Ccs1-Variante ist in Zellen erhöht

Zuerst wurde das Expressionslevel der Cystein-freien Ccs1-Variante in ganzen Zellen bestimmt und mit WT-Ccs1 verglichen, um später Rückschlüsse auf die Proteinmengen

der Variante in Mitochondrien im Verhältnis zu den Mengen in ganzen Zellen ziehen zu können. In der Variante ohne Cysteine (C17/20/27/64/159/229/231S) wurde eine starke Zunahme der Proteinmenge sowohl in Zellen des Wildtypstamms als auch in Zellen des Stamms mit hochregulierten Mengen an Mia40 beobachtet (s. Abb. 20). Die Expression des mitochondrialen Proteins Hep1 war nicht verändert.

Die Hochregulation der Mengen der Cystein-freien Ccs1-Variante entspricht der beobachteten Hochregulation der Mengen der nicht-funktionellen Varianten C229S, C231S und C229/231S (s. III - 1.1.1). Wenn man die Proteinmengen in Mitochondrien betrachtet, muss also bedacht werden, dass in Zellen mit der Cystein-freien Ccs1-Variante insgesamt mehr Ccs1 exprimiert wird.

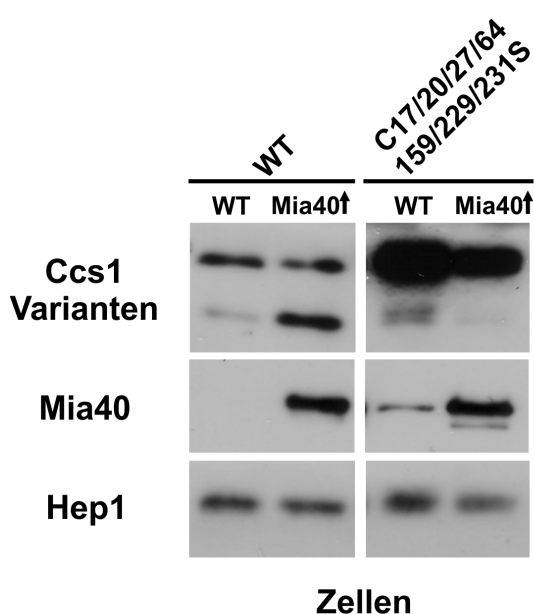


Abb. 20: Ccs1 ohne Cysteine ist in Hefezellen hochreguliert.

Von jeder Variante wurde eine Menge des Zellextrakts aus Hefezellen aufgetragen, die einer Zellmenge von 0,5 OD₆₀₀ entsprachen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Es wurde die gleiche Expositionszeit gewählt. Dadurch sind Vergleiche der absoluten Proteinmengen zwischen den Abschnitten möglich. Die obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau. Das Matrixprotein Hep1 diente als Ladekontrolle. WT: Wildtypzellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Mia40↑: Zellen mit hochregulierten Mengen an Mia40.

III - 1.7.2 Die Menge der Cystein-freien Ccs1-Variante in Mitochondrien ist unabhängig von der Menge an Mia40

Die Proteinmengen der Cystein-freien Ccs1-Variante in isolierten Mitochondrien wurden mit denen von WT-Ccs1 verglichen. In Mitochondrien mit der Cystein-freien Ccs1-Variante war weit weniger Ccs1 vorhanden, als es bei Mitochondrien mit WT-Ccs1 der Fall war (s. Abb. 21), obwohl die Proteinmenge der Cystein-freien Ccs1-Variante in den Zellen deutlich größer war (vgl. III - 1.7.1). Die Mengen von Tim13 und Tim44

waren nicht beeinflusst und dienten als Ladekontrolle. In Mitochondrien, die aus Zellen isoliert wurden, in denen Mia40 hochreguliert war, änderte sich die Menge der Cystein-freien Ccs1-Variante nicht (s. Abb. 21, Mia40 \uparrow). Die Menge des WT-Ccs1 war wie erwartet in Mitochondrien mit mehr Mia40 erhöht.

Dies zeigt, dass immer noch Ccs1 in Mitochondrien importiert wird, auch wenn alle Cysteine fehlen und keine Oxidation des Proteins durch das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems möglich ist. Allerdings sind die Proteinmengen dieser Variante nicht von den Mengen an Mia40 abhängig. Auf welche Weise die geringe Menge an Cystein-freiem Ccs1 in Mitochondrien importiert wird, bleibt zu klären.

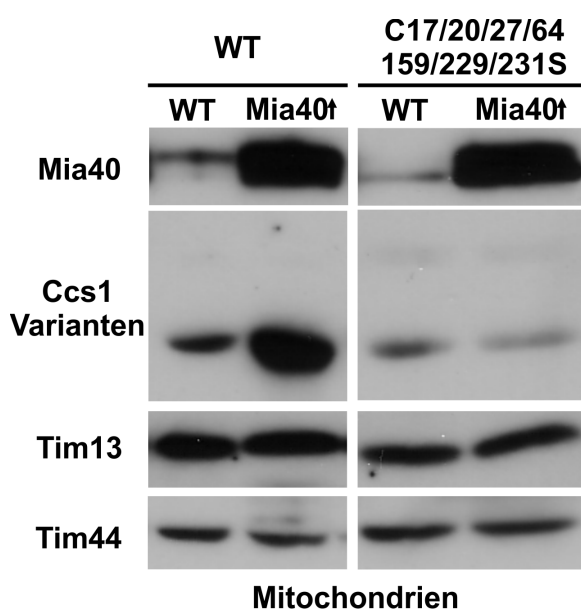


Abb. 21: Cystein-freies Ccs1 findet sich in Mitochondrien und seine Menge ist von Mia40 unabhängig. Es wurden 50 μ g Mitochondrien pro Spur aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine. Es wurde die gleiche Expositionszeit gewählt. Dadurch sind Vergleiche der absoluten Proteinmengen zwischen den Abschnitten möglich. Die nur sehr schwach sichtbare obere Bande der Ccs1-Varianten entsprach Ccs1 mit 2 HA-Anhängen. Die untere Bande entsprach Ccs1 ohne diesen Anhang nach endogenem Abbau. Tim13 und Tim44 dienten als Ladekontrolle. WT: Mitochondrien aus Wildtypzellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Mia40 \uparrow : Mitochondrien mit hochregulierten Mengen an Mia40.

III - 2 Pet191 – ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems

Der Cytochrom-*c*-Oxidase-Assemblierungsfaktor Pet191 gehört zu der Klasse der IMR-Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv. Proteine mit diesem Motiv werden als Substrate des Disulfid-Relay-Systems beschrieben. In vielen Fällen ist experimentell bestätigt worden, dass das Disulfid-Relay-System aus Mia40 und Erv1 den Import von Proteinen dieser Klasse in den IMR vermittelt und Disulfidbrücken in diese Proteine einbaut. Erstaunlicherweise wurde berichtet, dass die Depletion von funktionellem Erv1 den Import von Pet191 in Mitochondrien nicht beeinträchtigt (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, wie Pet191 in Mitochondrien importiert wird und ob Mia40 und Erv1 bei diesem Schritt oder in einem anderen Schritt der Biogenese von Pet191 eine Rolle spielen.

III - 2.1 Abhängigkeit der Mengen an Pet191 in Mitochondrien von Mia40 und Erv1

Substrate des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems nahmen in ihren mitochondrialen Proteinmengen ab, wenn die Menge an Mia40 oder Erv1 herunterreguliert wurde (Mesecke *et al.*, 2005; Terziyska *et al.*, 2007; Reddehase *et al.*, 2009). Deshalb wurde getestet, ob die Mengen an Pet191 in Mitochondrien von der mitochondrialen Menge an Mia40 und Erv1 abhängig sind.

III - 2.1.1 In Mitochondrien mit verringerten Mengen an Mia40 liegt weniger Pet191 vor

Es wurden Mitochondrien untersucht, die aus Zellen isoliert wurden, in denen die Expression von Mia40 herunterreguliert wurde. Die Mengen verschiedener Proteine in diesen Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit denen in Mitochondrien aus WT-Zellen verglichen. Die Menge an Pet191 war in Mitochondrien, in denen Mia40 nicht mehr detektiert wurde, drastisch verringert (s. Abb. 22 A). Damit verhielt sich Pet191 wie die Mia40-Substrate Tim13 und Erv1, die beide ebenfalls in ihren Mengen verringert waren (Mesecke *et al.*, 2005, Terziyska *et al.*, 2007). Im Falle

von Tim44 und Tom70 hingegen, die beide einem jeweils anderen Importweg folgen, der unabhängig vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System ist, änderten sich die Mengen nicht (Bömer *et al.*, 1997a; Neupert und Herrmann, 2007). Neben Pet191 waren also nur bekannte Substrate des Disulfid-Relay-Systems durch die geringeren Mengen an Mia40 betroffen.

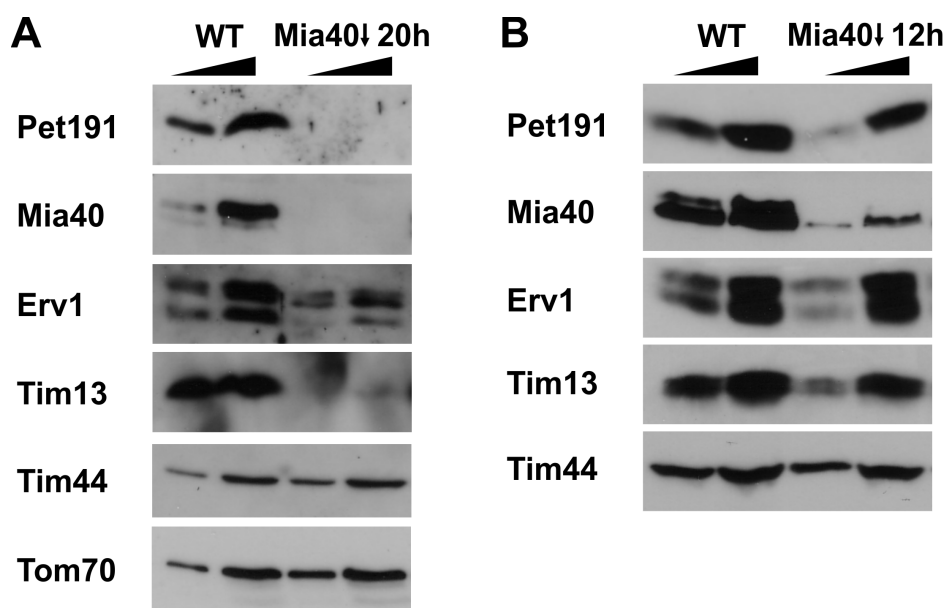


Abb. 22: Abhängigkeit der mitochondrialen Mengen an Pet191 von Mia40. WT: Mitochondrien aus WT-Zellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Mia40↓: Mitochondrien aus Zellen mit runterregulierter Expression von Mia40; Zellen wuchsen 20 h (A) oder 12 h (B) in Medium mit Glukose. Es wurden 25 und 50 µg (A) oder 50 und 100 µg (B) Mitochondrien aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

In den Mitochondrien, die aus Zellen stammten, in denen die Expression von Mia40 für 20 h herunterreguliert worden war, waren die Mia40-Substrate beinahe vollständig depletiert. Um auszuschließen, dass sich dadurch sekundäre Effekte ergaben, die für die Abnahme der Menge an Pet191 verantwortlich waren, wurden Mitochondrien aus Zellen untersucht, in denen die Expression von Mia40 nur für 12 h runterreguliert wurde. In diesen Mitochondrien mit weniger Mia40 (Mia40↓ 12 h) war Pet191 zu detektieren, jedoch war bereits eine Abnahme der Menge zu beobachten (s. Abb. 22 B), die mindestens genauso stark ausfiel wie bei Tim13 und Erv1, Substrate des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems (Mesecke *et al.*, 2005; Terziyska *et al.*, 2007).

Die Proteinmengen von Pet191 in Mitochondrien hängen also direkt von der Menge an Mia40 ab. Damit verhält sich das Protein wie ein Mia40-Substrat.

III - 2.1.2 In Mitochondrien mit verringerten Mengen an Erv1 liegt weniger Pet191 vor

Um die Abhängigkeit der mitochondrialen Mengen an Pet191 von Erv1 zu testen, wurden die Proteinmengen in Mitochondrien untersucht, die aus Zellen stammten, in denen die Expression von Erv1 herunterreguliert wurde, und mit denen aus Mitochondrien aus WT-Zellen verglichen. Ebenso wie in Mitochondrien mit reduzierten Mengen an Mia40 (III - 2.1.1, vgl. Abb. 22) waren die Mengen an Pet191 in den Mitochondrien mit reduzierten Mengen an Erv1 verringert (s. Abb. 23). Die Mengen an Tim13, einem Substrat des Disulfid-Relay-Systems, waren wie erwartet ebenfalls verringert (Mesecke *et al.*, 2005). Die Menge an Mia40 hingegen war stabil, wodurch die beobachteten Effekte nicht durch das Fehlen von Mia40 bedingt waren, sondern vermutlich durch die mangelnde Oxidation dieses Proteins durch Erv1 und damit durch die mangelnde Funktion des Disulfid-Relay-Systems. Die stabilen Mengen an Tim44 und Tom70 zeigten, dass Proteine anderer Importwege nicht betroffen waren.

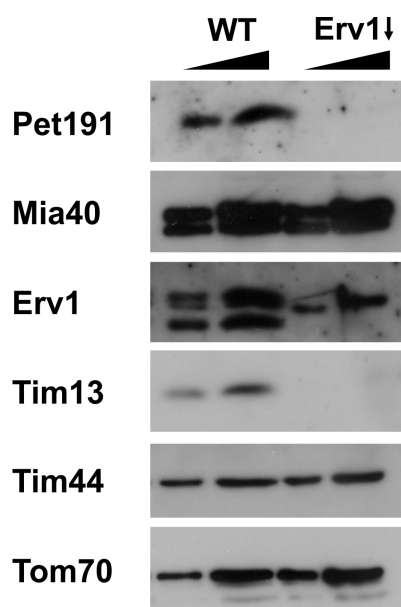


Abb. 23: Abhängigkeit der mitochondrialen Mengen an Pet191 von Erv1.

WT: Mitochondrien aus WT-Zellen, gleichzeitig mit dem regulierbaren Stamm präpariert. Erv1↓: Mitochondrien aus Zellen mit runterregulierter Expression von Erv1; Zellen wuchsen 48 h in Medium mit Glukose. Es wurden 25 und 50 µg Mitochondrien aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

Die mitochondriale Menge an Pet191 hängt also auch von der Menge an Erv1 in Mitochondrien ab, wie es bei bekannten Substraten des Disulfid-Relay-Systems beobachtet wurde (Mesecke *et al.*, 2005).

Zusammenfassend ergab die Analyse der mitochondrialen Mengen an Pet191, dass diese in hohem Maße sowohl von den Mengen an Mia40, als auch an Erv1 in Mitochondrien abhängen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Pet191 das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems für seine Biogenese in Mitochondrien benötigt.

III - 2.2 Der Import von Pet191 in Mitochondrien

Die Bedeutung von Mia40 und Erv1 für die Biogenese von Pet191 in Mitochondrien könnte sowohl mit der Faltung des Proteins im IMR und damit seiner Stabilität, aber auch mit dem Import in Mitochondrien zusammenhängen. Deshalb wurden *in vitro* Import-Experimente durchgeführt, um den Import von Pet191 zu charakterisieren und zu überprüfen, ob sich dieses Protein unter diesem Aspekt ebenfalls wie andere Substrate des Disulfid-Relay-Systems verhält und sein Import von Mia40 und Erv1 abhängig ist.

III - 2.2.1 Die Zugabe von ATP und NADH hat keinen Einfluss auf den *in vitro* Import von Pet191

Der Import von Mia40-Substraten in den IMR benötigt kein ATP oder NADH (Lutz *et al.*, 2003). Für den *in vitro* Import von radioaktiv markiertem Pet191 wurde getestet, ob eine Zugabe von ATP und NADH zu der Reaktion den Import stimuliert. Pet191 wurde *in vitro* in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin und Cystein translatiert. Das markierte Protein wurde mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Nichtimportiertes Material wurde mit PK abverdaut. 1 bis 2 % des eingesetzten Materials war vor dem Verdau geschützt und befand sich deshalb in den Mitochondrien (s. Abb. 24, Spur mit PK). Zur Kontrolle, ob das radioaktiv markierte Protein wie erwartet im IMR vorlag, wurden die Mitochondrien durch Inkubation in hypotoner Lösung geschwollen und damit die Außenmembran zerrissen. Dadurch wurden die IMR-Proteine für PK zugänglich. Die Spuren mit dem Schwellen (s. Abb. 24, SW) beinhalteten weit weniger radioaktives Sig-

nal. Das radioaktiv markierte Pet191 war also wie erwartet im IMR lokalisiert. Im Vergleich mit einem Import ohne Zugabe von ATP und NADH (-ATP/NADH) wurde nicht weniger Pet191 in den IMR importiert als mit Zugabe (+ATP/NADH).

Der Import von Pet191 in den IMR von Mitochondrien wird folglich von größeren Mengen an ATP oder NADH nicht verbessert, wie es auch für Substrate des Mia40-Erv1-Di-sulfid-Relay-Systems bekannt ist (Lutz *et al.*, 2003).

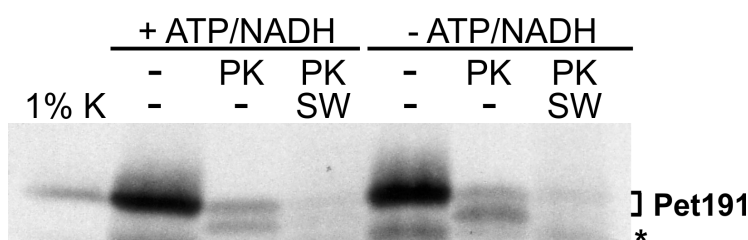


Abb. 24: Der Import von Pet191 ist nicht abhängig von exogener Zugabe von ATP und NADH.

3 % (v/v) radioaktiv markiertes Pet191 wurden mit 50 µg isolierten Mitochondrien für 15 min bei 25 °C in 100 µl Importpuffer inkubiert. Die Importansätze wurden entweder in SH-Puffer verdünnt oder in 20 mM Hepes geschwollen (SW) und der IMR dadurch zugänglich gemacht. Wenn angegeben (PK) wurde unimportiertes Material durch Zugabe von 100 µg/ml PK auf Eis 15 min lang verdaut und danach der Verdau mit 2 mM PMSF gestoppt. Die Mitochondrien/Mitoplasten wurden isoliert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie des radioaktiv markierten, koisolierten Pet191. *: verkürztes Translationsprodukt; +ATP/NADH: 2 mM ATP und 4 mM NADH wurden der Importreaktion beigefügt; -ATP/NADH: keine Zugabe von ATP und NADH; 1% K: 1 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Pet191.

III - 2.2.2 Bei steigender DTT-Konzentration nimmt der *in vitro* Import von Pet191 ab

Die Zugabe des Reduktionsmittels DTT zur Importreaktion kann den Mia40-abhängigen Import von Substraten in den IMR behindern (Mesecke *et al.*, 2005). Um zu testen, ob auch der Import von Pet191 in Mitochondrien von DTT abhängig ist, wurde DTT zu einer Importreaktion titriert. Die Menge an radioaktiv markiertem, importiertem Pet191 wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und mittels Quantifizierung

ausgewertet. Bei steigender DTT-Konzentration nahm der Import des radioaktiv markierten Proteins zuerst leicht zu (s. Abb. 25, 0,15 mM DTT) und fiel dann stark ab. Bei einer Konzentration von 10 mM DTT war kaum mehr importiertes Material nachzuweisen.

Der Import von Pet191 in den IMR ist also redoxsensitiv, wie es auch für andere Substrate des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems beobachtet wurde (Mesecke *et al.*, 2005). Beim Import von Pet191 scheinen also ebenfalls Oxidationsprozesse eine wichtige Rolle zu spielen.

Pet191 reagierte demzufolge auf die verschiedenen getesteten Importbedingungen wie ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems.

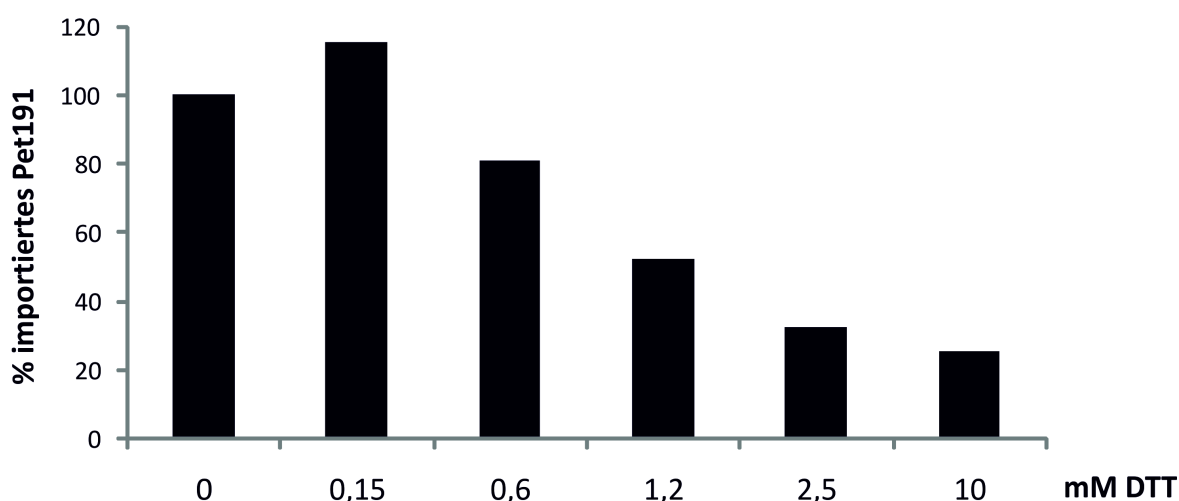


Abb. 25: Abhängigkeit des Pet191 Imports von der Konzentration an DTT.

Der *in vitro* Import von radioaktiv markiertem Pet191 in isolierte Mitochondrien wurde unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen an DTT ansonsten wie für Abb. 24 beschrieben durchgeführt. Die Mitochondrien wurden nach dem Import mit 100 µg/ml PK 15 min auf Eis behandelt und der Verdau mit 1 mM PMSF gestoppt. Die Analyse erfolgte durch Tricin-SDS-PAGE, Autoradiographie des radioaktiv markierten, koinzidierten Pet191 und Quantifizierung dieses Signals. 100 % entsprechen der Menge an importiertem Pet191 ohne Zugabe von DTT (0 mM).

III - 2.2.3 Der *in vitro* Import von Pet191 hängt von den mitochondrialen Mengen an Mia40 ab

Da sich Pet191 in den durchgeführten *in vitro* Importversuchen wie ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems verhielt, ergab sich die Vermutung, dass der Import von Pet191 auch abhängig von diesem System ist. Um die Frage zu beantworten, ob Mia40 an dem Import von Pet191 in Mitochondrien beteiligt ist, wurden Importreaktionen in verschiedene, isolierte Mitochondrien durchgeführt, in denen im Vergleich zum WT weniger oder mehr Mia40 vorhanden war. In Mitochondrien, in denen die Menge an Mia40 reduziert war (Mia40↓), wurde weniger radioaktiv markiertes Pet191 importiert als in die entsprechenden Mitochondrien aus WT-Zellen (s. Abb. 26 A). In Mitochondrien, die über mehr Mia40 verfügten (Mia40↑), wurde radioaktiv markiertes Pet191 hingegen vermehrt in den IMR importiert (s. Abb. 26 B).

Der *in vitro* Import von Pet191 in den IMR hängt also direkt von den Mengen an Mia40 in den Mitochondrien ab. Dies zeigt, dass Mia40 beim Import von Pet191 in Mitochondrien eine wesentliche Rolle spielt.



Abb. 26: Der Import von Pet191 hängt von der Menge an Mia40 ab.

A) Mia40↓: Mitochondrien aus Zellen mit herunterregulierter Expression von Mia40; Zellen wuchsen 16 h in Medium mit Glukose. B) Mia40↑: Mitochondrien aus Zellen mit hochregulierter Expression von Mia40, gewachsen in Medium mit Galaktose. A und B) WT: Mitochondrien aus WT-Zellen, gleichzeitig mit dem jeweiligen regulierbaren Stamm präpariert. Der *in vitro* Import von radioaktiv markiertem Pet191 in isolierte Mitochondrien wurde wie für Abb. 24 beschrieben durchgeführt. Die Mitochondrien wurden nach dem Import mit 100 µg/ml PK 15 min auf Eis behandelt und der Verdau mit 2 mM PMSF gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie des radioaktiv markierten, koisolierten Pet191. 1% K: 1 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Pet191, nicht PK behandelt.

III - 2.2.4 Der *in vitro* Import von Pet191 benötigt funktionelles Erv1

Als Nächstes sollte getestet werden, in wieweit der Import von Pet191 nicht nur von der Menge an Mia40, sondern auch von der Funktionalität des Disulfid-Relay-Systems abhängt. Dazu wurden Mitochondrien verwendet, die aus Hefezellen isoliert wurden, die eine temperatursensitive Mutante von Erv1 enthielten. Mitochondrien, die aus Zellen präpariert wurden, die bei 24 °C wuchsen, enthielten funktionelles Erv1. Die aus bei 37 °C gewachsenen Zellen präparierten Mitochondrien enthielten nicht-funktionelles Erv1 (Lisowsky, 1992). Dadurch war das Disulfid-Relay-System in diesen Mitochondrien ebenfalls nicht-funktionell. Es wurden Importreaktionen in beide Typen von Mitochondrien (24 °C und 37 °C) für 2 und 15 min durchgeführt und verglichen. In die 24 °C-Mitochondrien wurde radioaktiv markiertes Pet191 importiert (s. Abb. 27). In 37 °C-Mitochondrien fand hingegen kein Import statt. Nach Schwellen der Mitochondrien in hypotonem Medium (SW) konnte kein radioaktives Signal mehr nachgewiesen werden, was belegte, dass sich das importierte Material im IMR befunden hatte.

Dies zeigt, dass Pet191 nur dann erfolgreich in den IMR von Mitochondrien importiert wird, wenn Erv1 funktionell vorliegt und damit ein funktionelles Disulfid-Relay-System vorhanden ist.

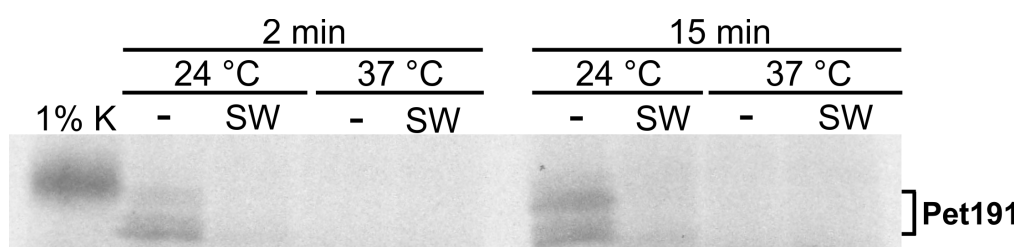


Abb. 27: Pet191 benötigt funktionelles Erv1 für den Import.

Es wurden Mitochondrien verwendet, die aus einem Hefestamm isoliert wurden, der eine temperatursensitive Mutante von Erv1 enthielt (Lisowsky, 1992). 24 °C: Mitochondrien aus Zellen, die bei 24 °C kultiviert wurden und in denen funktionelles Erv1 gebildet wurde; 37 °C: Mitochondrien aus Zellen, die bei 37 °C kultiviert wurden und in denen Erv1 nicht funktionell vorlag. Der *in vitro* Import von radioaktiv markiertem Pet191 in isolierte Mitochondrien wurde wie für Abb. 24 beschrieben durchgeführt. Die Mitochondrien bzw. Mitoplasten (SW) wurden nach dem Import mit 100 µg/ml PK 15 min auf Eis behandelt und der Verdau mit 2 mM PMSF gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie des radioaktiv markierten, koisolierten Pet191. 1% K: 1 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Pet191, nicht PK behandelt.

Wenn man alle *in vitro* Importexperimente zusammenfassend betrachtet, kann gesagt werden, dass sich Pet191 in diesen Experimenten wie ein Substrat des Disulfid-Relay-Systems verhielt. Pet191 benötigt für seinen Import in den IMR von Mitochondrien also das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System.

III - 2.3 Der Redoxzustand von Pet191 in Mitochondrien

III - 2.3.1 *Pet191 bildet stabile Disulfidbrücken*

Wenn Pet191 ein Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems ist, wie es die bisherigen Experimente vermuten lassen, und sein Import redoxsensitiv ist, sollte es von Mia40 oxidativ gefaltet werden und deshalb in Mitochondrien Disulfidbrücken aufweisen. Durch AMS-Experimente mit isolierten WT-Mitochondrien wurde untersucht, ob Pet191 Disulfidbrücken trägt. Die Mitochondrien wurden mit oder ohne DTT bei 25 oder 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben ohne oder mit AMS weiterinkubiert. Die Modifikation der freien Thiole des Pet191 durch AMS und der damit verbundene Größenunterschied wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration gegen Pet191 sichtbar gemacht.

Gegenüber den unbehandelten Mitochondrien (s. Abb. 28, Spur 1) führte das bloße Kochen bei 95 °C ohne die Zugabe von AMS zu keiner Änderung der Mobilität (Spur 2). Wurden die Mitochondrien jedoch mit DTT versetzt und bei 95 °C inkubiert, führte dies zu einer starken Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit des Pet191 während der SDS-PAGE (Spur 5). Daraus kann geschlossen werden, dass freie Thiole von AMS modifiziert wurden. Das Protein lag nach dieser harschen Behandlung wahrscheinlich vollständig reduziert vor, so dass alle 7 Cysteinreste mit AMS modifiziert werden konnten. Wurden hingegen die unbehandelten Mitochondrien mit AMS versetzt, ergab sich eine viel kleinere Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit (Spur 3). Dies zeigte, dass in diesen nativen Mitochondrien nicht alle Cysteine von Pet191 für AMS zugänglich waren und damit vermutlich oxidiert als Disulfidbrücken vorlagen. Aufgrund der Größe der Laufgeschwindigkeitsveränderung könnten 1 oder 3 AMS-Moleküle an die freien Thiole des Proteins angelagert worden sein, was auf 3 oder 2 Disulfidbrücken in Pet191 schließen lässt. Wurden die Mitochondrien bei 25 °C mit DTT inkubiert und dann mit AMS ver-

sehen (Spur 4), änderte sich das Laufverhalten von Pet191 nicht gegenüber dem Pet191 aus den ohne DTT, aber mit AMS versehenen Mitochondrien (Spur 3). Die Disulfidbrücken in Pet191 sind folglich resistent gegen eine Behandlung mit 10 mM DTT bei 25 °C und damit stabil. Eine Besonderheit war das Laufverhalten des reduzierten und modifizierten Pet191 nach Inkubation mit DTT bei 95 °C und Behandlung mit AMS (Spur 5). Es kann nicht erklärt werden, weshalb das Protein während der SDS-PAGE nicht als einzelne Bande lief, sondern sich das Signal des Proteins als breiter Streifen darstellte.

Dieses Experiment zeigt klar, dass Pet191 stabile Disulfidbrücken trägt. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Pet191 3 Disulfidbrücken trägt; allerdings ist nicht gänzlich auszuschließen, dass es sich nur um 2 Disulfidbrücken handelt. Im Vergleich mit anderen Substraten des Disulfid-Relay-Systems liegt jedoch sehr nahe, dass sich zumindest die beiden Brücken zwischen den vier Cysteinen des Zwillings-CX₉C-Motivs ebenfalls in Pet191 finden.

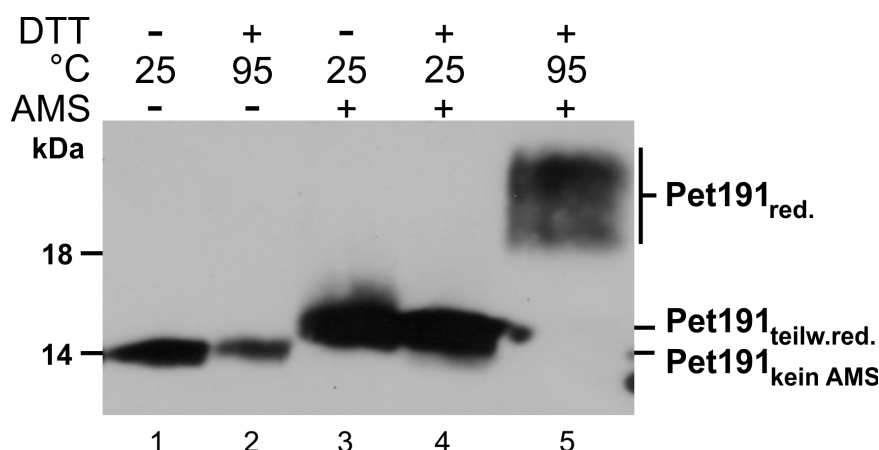


Abb. 28: Die stabilen Disulfidbrücken von Pet191.

Isolierte Mitochondrien wurden mit oder ohne 10 mM DTT bei 25 oder 95 °C 10 min inkubiert. Danach wurden sie mit oder ohne AMS (30 mM) 60 min bei 25 °C inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191. Pet191kein AMS: unmodifizierte Form; Pet191red.: reduzierte, mit AMS modifizierte Form; Pet191teilw.red.: teilweise reduzierte, mit AMS modifizierte Form.

III - 2.3.2 Die Stabilität der Disulfidbrücken von Pet191 ändert sich nach einer TCA-Fällung

Eine Fällung mit TCA kann zur teilweisen oder völligen Entfaltung eines Proteins führen (Sagar und Pandit, 1983; Sivaraman *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, in wieweit die Faltung von Pet191 Einfluss auf die Stabilität seiner Disulfidbrücken hat, wurden aus Hefezellen isolierte Mitochondrien mit TCA gefällt und die mitochondrialen Proteine damit entfaltet. Das erhaltene Proteinpellet wurde in einem Puffer mit 2 % SDS aufgenommen und dann wie unter III - 2.3.1 beschrieben mit oder ohne DTT und AMS weiterbehandelt. Nach der Fällung der Mitochondrien mit TCA und damit der Entfaltung der Proteine verhielt sich Pet191 während des AMS-Experiments fast identisch, wie es im Versuch mit nativen Mitochondrien beobachtet wurde (vgl. III - 2.3.1). Der einzige Unterschied lag in der Laufgeschwindigkeit des Proteins, nachdem es mit DTT bei 25 °C und AMS behandelt wurde (s. Abb. 29, Spur 4). Nach dieser Behandlung lief das Protein langsamer, als das Protein aus Mitochondrien, die ohne DTT, aber ebenfalls mit AMS inkubiert worden waren (Spur 3). Dies war für das Protein aus nativen Mitochondrien nicht beobachtet worden (vgl. Abb. 28, Spuren 3 und 4). Daraus ergab sich, dass durch eine Inkubation mit DTT bei 25 °C im entfalteten Pet191 bereits mindestens eine Disulfidbrücke geöffnet wurde, was im gefalteten Pet191 nicht beobachtet wurde. Die Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit des entfalteten Pet191 nach DTT Behandlung bei 25 °C entsprach aber nicht der Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit nach DTT Behandlung bei 95 °C (s. Abb. 29, Spuren 4 und 5). Folglich blieben auch im entfalteten Pet191 nach DTT Behandlung bei 25 °C oxidierte Cysteine und damit Disulfidbrücken erhalten.

Allgemein kann gesagt werden, dass durch die Entfaltung von Pet191 mittels TCA-Fällung nicht alle Cysteine des Proteins für AMS zugänglich gemacht wurden. Dies geschah auch in diesem Experiment erst durch Inkubation mit DTT bei 95 °C. Dieses Verhalten zeigte, dass es keine sterischen Gründe waren, weshalb AMS in nativen Mitochondrien die Cysteinreste von Pet191 nicht modifizieren konnte, sondern dass diese Cysteine oxidiert vorlagen.

Pet191 besitzt also Disulfidbrücken mit unterschiedlicher Qualität. Nach Entfaltung des Proteins wird mindestens eine Disulfidbrücke weniger resistent gegenüber einer

Behandlung mit DTT bei 25 °C. Dies weist darauf hin, dass diese Disulfidbrücke ihre Stabilität verloren hat. Möglicherweise wird mindestens eine der Disulfidbrücken in Pet191 durch die Faltung des Proteins stabilisiert.

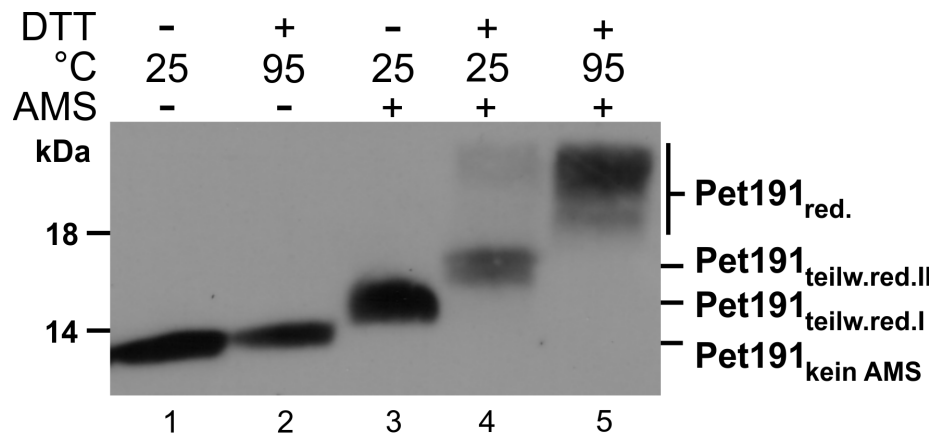


Abb. 29: Die Stabilität der Disulfidbrücken von Pet191 gegenüber DTT ändert sich nach einer TCA-Fällung.

Isolierte Mitochondrien wurden mit TCA gefällt. Das Proteinpellet wurde in SDS-Puffer (2 % SDS, 200 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit oder ohne 5 mM DTT bei 25 oder 95 °C 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe mit oder ohne AMS (20 mM) 60 min bei 25 °C inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191. Pet191kein AMS: unmodifizierte Form; Pet191red.: reduzierte, mit AMS modifizierte Form; Pet191teilw.red.: teilweise reduzierte, mit AMS modifizierte Form; II: Form mit mehr reduzierten Cysteinen; Form I entspricht der teilweisen reduzierten Form aus Abb. 28.

III - 2.4 *In vitro* Rekonstitution der Bildung von Disulfidbrücken in Pet191 durch das Disulfid-Relay-System

Um zu zeigen, dass die in Pet191 nachgewiesenen Disulfidbrücken von Mia40 eingebaut werden, wurde ein *in vitro* Rekonstitutionsexperiment mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Dazu wurde reduziertes Pet191 mit oxidiertem Mia40C bzw. Erv1 15 min bei 25 °C inkubiert. Um die Funktionalität des verwendeten Systems zu kontrollieren, wurde das Mia40-Substrat Tim10 verwendet. Die anschließende Markierung mit AMS machte die unterschiedlichen Redoxzustände durch Größenunterschiede der modifizierten Proteine sichtbar. Versetzen des rekombinanten Pet191 mit AMS zeigte, dass das Protein reduziert vorlag (s. Abb. 30 A, linker Abschnitt, +AMS). Nach Zugabe von

Mia40C bildete sich eine Pet191-Form, die mit weniger AMS markiert wurde, also im Laufe der SDS-PAGE schneller lief (s. Abb. 30 A, rechter Abschnitt). In dieser Form traten mehr oxidierte Cysteine auf. Diese oxidierte Form entstand nicht nach Inkubation mit Erv1 alleine. Jedoch wurde mehr von der oxidierten Form von Pet191 gebildet, wenn Erv1 zusätzlich zu Mia40C anwesend war. Die Oxidation von Tim10 durch Mia40C zeigte, dass Mia40C oxidiert und somit aktiv vorlag (s. Abb. 30 B).

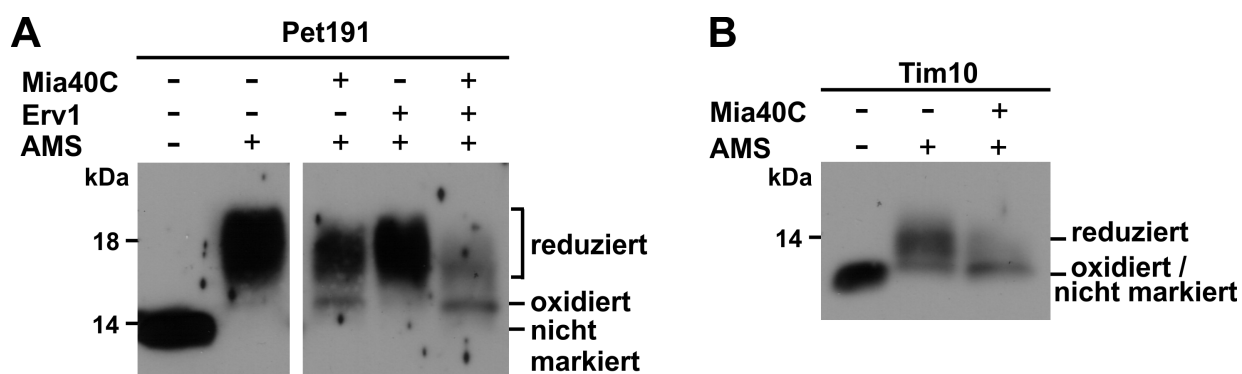


Abb. 30: *In vitro* Rekonstitution der Oxidation von Pet191.

Rekombinantes Pet191 oder Tim10 wurde mit 15 mM DTT 10 min bei 25 °C reduziert und über eine Nap5-Säule gereinigt. Jeweils 2 µM Protein wurden in Puffer akt. mit 2 µM Mia40 und/oder 2 µM Erv1 für 15 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurde die Lösung mit AMS (10 mM) versehen und 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde daraufhin mit 50 mM IAA versehen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191 (A) oder Tim10 (B). reduziert: Protein ohne Disulfidbrücken, alle Cysteine durch AMS modifiziert; oxidiert: Protein mit Disulfidbrücken, mögliche freie Thiole mit AMS markiert; nicht markiert: Protein ohne Modifikation durch AMS; im Falle von Tim10 laufen oxidierte und nicht-markierte Form auf einer Höhe.

Dieses Experiment belegt, dass Pet191 durch Mia40 oxidiert wird. Erv1 selbst oxidiert die Cysteine des Pet191 jedoch nicht. Wie bereits bekannt ist, oxidiert Erv1 reduziertes Mia40 und ermöglicht so eine weitere Runde der Substratoxidierung durch Mia40 (Messecke *et al.*, 2005). Genauso sorgte Erv1 in diesem Experiment dafür, dass mehr oxidiertes Mia40 zur Verfügung stand, das wiederum Pet191 oxidieren konnte. Es ist nicht möglich eine Aussage dazu zu treffen, welche oder wie viele Disulfidbrücken von Mia40C in Pet191 eingeführt wurden.

III - 2.5 Interaktion von Pet191 mit Mia40

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass der Import von Pet191 in Mitochondrien vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System abhängt. Außerdem trägt Pet191 Disulfidbrücken, die von diesem System in das Protein eingebaut werden. Dies impliziert eine Interaktion von Pet191 mit Mia40. Im Folgenden soll überprüft werden, ob Pet191 mit Mia40 interagiert.

III - 2.5.1 Radioaktiv markiertes Pet191 interagiert mit Mia40 nach in vitro Import

Da bisher davon ausgegangen wird, dass die Substrate von Mia40 nur während der kurzen Phase des Imports und ihrer Oxidation mit Mia40 interagieren (Herrmann und Riemer, 2012), wurde die Interaktion von Mia40 mit radioaktiv markiertem Pet191 während dessen *in vitro* Imports untersucht. Die Mitochondrien wurden nach dem *in vitro* Import von Pet191 isoliert, lysiert und eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen Mia40 durchgeführt. Die Proben wurden mittels einer nicht-reduzierenden (ohne β -ME) bzw. reduzierenden (mit 5% β -ME) SDS-PAGE analysiert. Koisoliertes, radioaktives Pet191 wurde nach einer Autoradiographie sichtbar. In der Tat bildete Pet191 mit Mia40 ein Intermediat von einer Größe um die 67 kDa (s. Abb. 31, - β -ME). Rechnerisch entsprach diese Laufgeschwindigkeit des Intermediats einem Molekül Mia40 und einem Molekül Pet191, wenn man nicht die reine Größe der Proteine, sondern ihre Laufeigenschaften während einer SDS-PAGE betrachtete (54 kDa bzw. 13 kDa). Dieses Intermediat konnte in der Immunopräzipitation mit Mia40 Antikörpern spezifisch isoliert werden (s. Abb. 31, - β -ME, α -Mia40). Pet191 Monomer war in dieser Spur nicht zu sehen. Dies zeigt, dass nur das Pet191 spezifisch isoliert wurde, das an Mia40 gebunden war. Wenn dieselbe Probe unter reduzierenden Bedingungen analysiert wurde, war das Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 nur noch schwach zu sehen (s. Abb. 31, + β -ME). Stattdessen tauchte in der Spur, die das mit Mia40 koisolierte Material zeigt, (+ β -ME, α -Mia40), das Monomer von Pet191 auf. Dies zeigt, dass unter diesen Bedingungen die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Pet191 und Mia40 reduziert wurde. Wenn während der Importreaktion 10 mM DTT anwesend waren, wurde der Import von

Pet191 in die Mitochondrien nahezu komplett verhindert (+ DTT/ - β -ME). In diesem Fall waren weder Pet191 Monomer, noch ein Intermediat mit Mia40 zu sehen.

Pet191 interagiert also im Laufe seiner Importreaktion mit Mia40. Diese Interaktion ist redoxsensitiv und kann durch Inkubation mit β -ME während einer reduzierenden SDS-PAGE aufgelöst werden. Sie beruht folglich auf mindestens einer intermolekularen Disulfidbrücke.

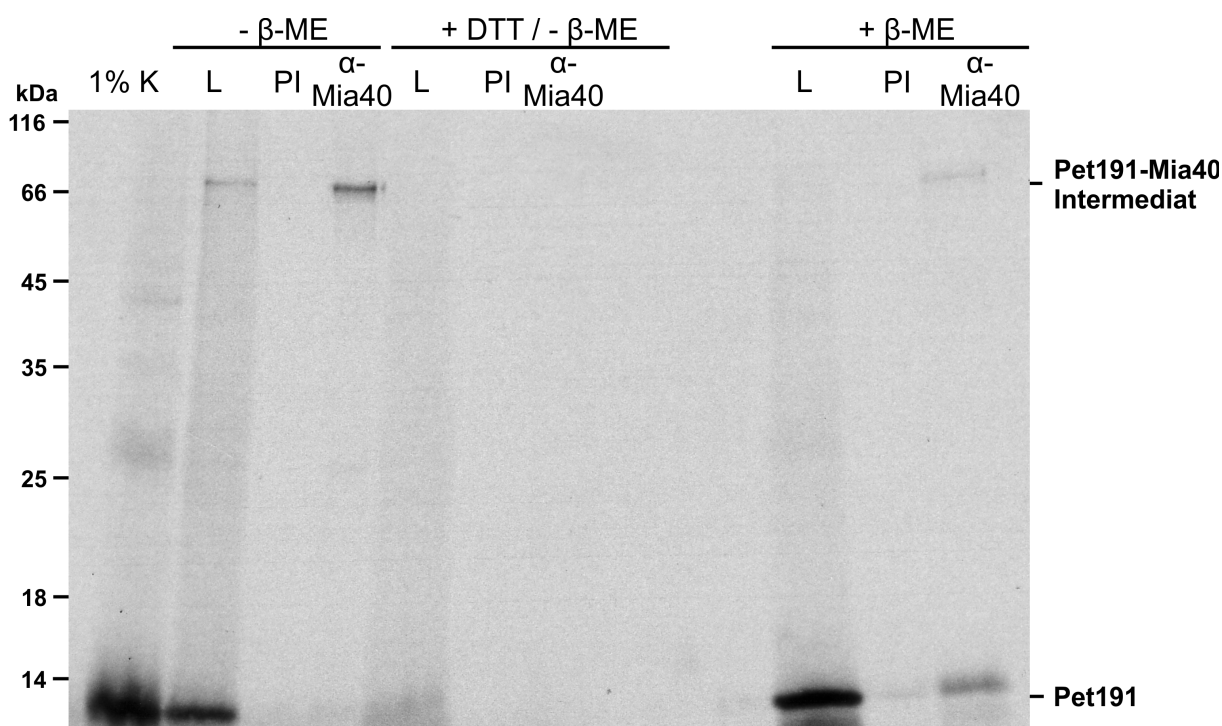


Abb. 31: Intermediat von Pet191 und Mia40 während des *in vitro* Imports von Pet191.

3 % (v/v) radioaktiv markiertes Pet191 wurden mit 50 μ g isolierten Mitochondrien mit hochreguliertem Mia40 für 15 min bei 25 °C in 100 μ l Importpuffer inkubiert. Unimportiertes Material wurde durch Zugabe von 50 μ g/ml Trypsin auf Eis 15 min lang verdaut, danach der Verdau mit STI (1 mg/ml) gestoppt und die Mitochondrien isoliert. Daraufhin wurden die Mitochondrien lysiert und Mia40 mittels Immuno-Präzipitation mit Antikörpern gegen Mia40 isoliert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie des radioaktiv markierten, koisolierten Pet191. 1% K: 1 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Pet191; L: 10 % des lysierten Materials dienten als Ladekontrolle; PI: Präimmunsereum; α -Mia40: Antikörper gegen Mia40C; -/+ β -ME: kein oder 5 % β -ME im Laemmli-Puffer; + DTT: 10 mM DTT während Importreaktion.

III - 2.5.2 Ein Disulfid-Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 bildet sich in isolierten Mitochondrien

Um die Frage zu beantworten, ob Pet191 auch außerhalb einer Importreaktion mit Mia40 interagiert, wurde untersucht, ob sich das Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 in isolierten Mitochondrien bildet. Dazu wurden Mitochondrien unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und dann das Laufverhalten des Pet191 mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191 analysiert. In der Tat konnte nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE eine langsamer laufende Spezies von Pet191 beobachtet werden, die die gleiche Laufeigenschaft zeigte, wie sie für das Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 nach dem *in vitro* Import oben beschrieben wurde (s. Abb. 32 A, linker Bildabschnitt, - β -ME; vgl. III - 2.5.1). Nach einer reduzierenden SDS-PAGE hingegen konnte diese langsamere Spezies nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 32 A, rechter Bildabschnitt, + β -ME). Die langsamere Laufform von Pet191 bildete sich nicht, wenn die Mitochondrien mit DTT inkubiert wurden (s. Abb. 32 A, linker Bildabschnitt, + DTT). Wurden die Mitochondrien aber mit IAA inkubiert, vermehrte sich die Menge an der langsameren Laufform von Pet191 stark (s. Abb. 32 A, linker Bildabschnitt, -DTT +IAA).

Die beobachtete langsamere Spezies von Pet191 entsprach sehr wahrscheinlich dem Intermediat zwischen Pet191 und Mia40. Dieses Intermediat scheint also auch in isolierten Mitochondrien unabhängig vom Import von Pet191 gebildet zu werden. Wie bei dem Intermediat beobachtet, das sich während eines Imports von Pet191 bildet, ist das endogene Intermediat ebenfalls redoxsensitiv, was darauf schließen lässt, dass es auch auf mindestens einer intermolekularen Disulfidbrücke beruht. Die Anwesenheit von IAA und damit die Blockade aller freien Thiole verstärkt entweder die Bildung oder erhöht die Stabilität des Intermediates.

Um abschließend zu klären, ob es sich bei der langsameren Laufform wirklich um ein Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 handelte, wurde eine Ni-NTA-Kopräzipitation durchgeführt. Dafür wurden Mitochondrien verwendet, in denen Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang anwesend war. Als Kontrolle der Spezifität der Isolation wurden Mitochondrien verwendet, in denen Mia40 lediglich hochreguliert war, um die gleiche Menge an

Mia40 wie im Stamm mit Oktahistidyl-Anhang zu gewährleisten, aber keinen solchen Anhang trug. Um möglichst viel Intermediat nachweisen zu können, wurden die Mitochondrien vor der Ni-NTA-Kopräzipitation mit IAA inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191 analysiert. Es wurden gereinigte Antikörper von Pet191 verwendet, so dass die in Abb. 32 A sichtbaren Kreuzreaktionen nicht mehr auftraten. Tatsächlich konnte die zuvor beobachtete langsamere Laufform von Pet191 auch in der Spur nachgewiesen werden, die das Material enthielt, das zusammen mit Mia40 isoliert wurde (s. Abb. 32 B, Mia40His, E). Aus Mitochondrien mit Mia40 ohne Anhang konnte diese Spezies nicht koisoliert werden (s. Abb. 32 B, Mia40↑, E). Dennoch war die langsamere Spezies von Pet191 auch in diesen Mitochondrien vorhanden, wie es die Spuren mit den aufgetragenen Mitochondrien (M) und lysierten Mitochondrien (L) zeigen.

Die langsamere Laufform von Pet191 wurde also von Pet191-Antikörpern erkannt und zusammen mit Mia40 isoliert. Dies zeigt, dass es sich bei dieser Laufform tatsächlich um ein Intermediat aus Pet191 und Mia40 handelt. Seine Größe weist darauf hin, dass das sichtbare Intermediat jeweils aus einem Molekül Mia40 und einem Molekül Pet191 besteht.

Pet191 zeigt also die Besonderheit, auch in isolierten Mitochondrien abseits einer Importreaktion Intermediate mit Mia40 zu bilden.

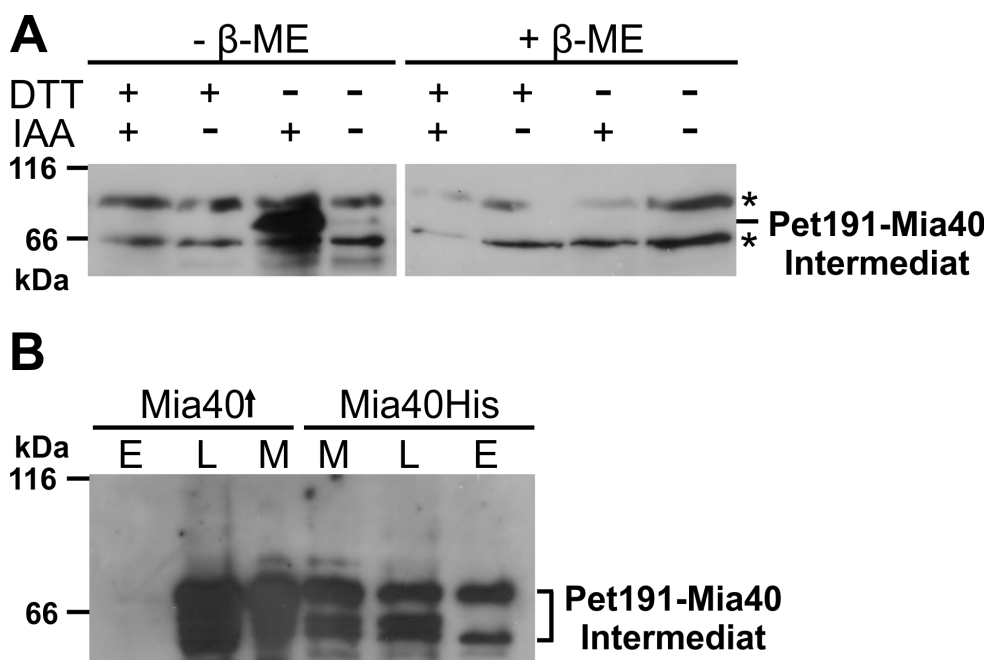


Abb. 32: Das Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 wird auch in isolierten Mitochondrien gebildet.

A) Isolierte Mitochondrien wurden in SH-Puffer mit oder ohne 5 mM DTT 10 min bei 25 °C und dann mit oder ohne 80 mM IAA 20 min bei 25 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Laemmli-Puffer ohne und mit 5 % β -ME versetzt (-/+ β -ME). Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191. *: unspezifische Kreuzreaktion des ungereinigten Pet191-Antikörpers.

B) Isolierte Mitochondrien wurden in SH-Puffer mit 80 mM IAA 20 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurden die Mitochondrien lysiert und Mia40 mittels Ni-NTA-Präzipitation isoliert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit gereinigten Antikörpern gegen Pet191. M: 10 % unlysierte Mitochondrien; L: 10 % des lysierten Materials dienten als Ladekontrolle; E: Eluat, gebundenes Material; Mia40 \uparrow : Mitochondrien mit hochreguliertem Mia40; Mia40His: Mitochondrien mit Mia40 mit Oktahistidyl-Anhang.

III - 2.5.3 Mehr *Erv1* verringert die Menge des Intermediats in isolierten Mitochondrien nicht

Es wäre möglich, dass Mia40 und Pet191 in dem Intermediat aneinander gebunden bleiben, bis ein zusätzlicher Faktor die Reaktion vollendet. Dieser Faktor könnte die zweite Hauptkomponente des Disulfid-Relay-Systems sein, *Erv1*. Für das Substrat *Cmc1* wurde gezeigt, dass es Mia40 und funktionelles *Erv1* benötigt, um effizient oxidiert und aus dem Intermediat mit Mia40 entlassen zu werden (Bourens *et al.*, 2012). Um zu testen, ob *Erv1* fähig ist, das Intermediat zwischen Pet191 und Mia40 zu lösen, wurden isolierte

Mitochondrien untersucht, die unterschiedliche Mengen von Erv1 enthielten. Wenn Erv1 dafür sorgen würde, dass das Intermediat aus Pet191 und Mia40 aufgelöst wird, wäre weniger Intermediat zu erwarten, wenn mehr Erv1 in den Mitochondrien zur Verfügung stünde. Es wurde jedoch beobachtet, dass in Mitochondrien, aus Zellen in denen die Expression von Erv1 hochreguliert war, nicht weniger Intermediat nachgewiesen werden konnte als in Mitochondrien aus zugehörigen WT-Zellen (s. Abb. 33). Als Ladekontrolle diente Tim44.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Menge des Intermediats aus Pet191 und Mia40 von den Mengen an Erv1 unabhängig ist und Erv1 deshalb wohl nicht für eine Auflösung des Intermediats verantwortlich ist.

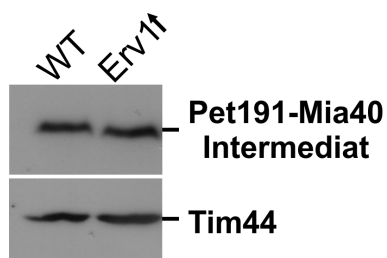


Abb. 33: Die Menge des Intermediats aus Pet191 und Mia40 hängt nicht von der Menge an Erv1 ab.

Isolierte Mitochondrien aus WT-Zellen (WT) oder aus Zellen mit hochregulierter Expression von Erv1 (Erv1↑) wurden mit 80 mM IAA in SH-Puffer 25 min bei 25 °C inkubiert. Die Mitochondrien wurden isoliert und mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Pet191 (oberer Bildabschnitt) und Tim44 (unterer Bildabschnitt).

IV Diskussion

IV - 1 Ccs1

IV - 1.1 Der Importweg von Ccs1 in Mitochondrien

Obwohl Ccs1 kein Zwillings-CX_nC-Motiv trägt, ist sein Import in Mitochondrien dennoch von Mia40 abhängig (Reddehase *et al.*, 2009). In dieser Arbeit sollte analysiert werden, welche Cysteine von Ccs1 für seinen Import in den IMR durch das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System verantwortlich sind. Ccs1 gelangt höchstwahrscheinlich reduziert und entfaltet durch die TOM-Pore in den IMR. Mit seinem Cystein C64 bildet es eine intermolekulare Disulfidbrücke mit Mia40. Daraufhin wird durch Mia40 eine Disulfidbrücke in Ccs1 zwischen seinen Cysteinresten C27 und C64 eingebaut und seine Domäne I faltet. Dadurch ist das nun gefaltete Protein im IMR der Mitochondrien gefangen (*folding trap*-Mechanismus). Die Unterschiede in den mitochondrialen Mengen der untersuchten Ccs1-Cystein-zu-Serin-Varianten zeigen deutlich, dass das Cystein C64 eine wichtige Rolle in der Lokalisation von Ccs1 hat. Falls dieses Cystein fehlt, wie in den Ccs1-Varianten C64S und C27/64S, ist die Menge an Ccs1 in Mitochondrien stark verringert. Um zu beweisen, dass die Verminderung an Protein in diesen Varianten in der Tat auf weniger Import und nicht nur auf eine geringere Stabilität in den Mitochondrien zurückzuführen ist, wurden Ccs1-Fusionsprotein-Varianten mit einer Cytochrom *b*₂-Präsequenz untersucht, deren Importweg unabhängig von Mia40 ist. In diesem Fall glichen sich alle mitochondrialen Proteinmengen der Ccs1-Fusionsprotein-Varianten mit Ausnahme der hochregulierten Mengen der Fusionsprotein-Variante C229/231S. Dadurch ist gezeigt, dass Ccs1 ohne das Cystein C64 in Mitochondrien genauso stabil ist wie das WT-Ccs1. Vielmehr hat das Fehlen des Cysteins C64 direkte Auswirkungen auf den Mia40-abhängigen Import.

Die Menge an importiertem Ccs1 erhöht sich für die Varianten C17/20S und C229/231S sowie für den WT, wenn die Menge an Mia40 hochreguliert ist. Die Variante C27/64S ist jedoch nicht von einer Hochregulierung der Menge an Mia40 betroffen. Dies erklärt sich dadurch, dass keine Interaktion zwischen dem Cystein C64 und Mia40 stattfinden kann. Deshalb erhöht sich die Häufigkeit dieser Interaktion auch nicht, wenn mehr Mia40 in

Mitochondrien zur Verfügung steht. Die Menge an importiertem Ccs1 C27/64S wird nicht erhöht. Interessanterweise wird Ccs1 C27/64S in geringen Mengen immer noch in Mitochondrien importiert. Es ist unbekannt, durch welchen Mechanismus dies geschieht. In Mitochondrien mit reduzierten Mengen an Mia40 ist diese Menge der Variante C27/64S hingegen nochmals leicht erniedrigt gegenüber der Menge in WT-Mitochondrien. Dieser Effekt ist schwer zu erklären, weist er ja darauf hin, dass die Proteinmenge trotz fehlendem Cystein C64 nicht gänzlich von Mia40 unabhängig zu sein scheint. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Mia40 mit anderen Cysteinen von Ccs1 interagieren kann. Dies könnte speziell dann der Fall sein, wenn das Cystein C64 fehlt. Es ist auch denkbar, dass Mia40 abseits des Imports mit zusätzlichen Cysteinen von Ccs1 interagiert, um diese zu oxidieren, und dadurch zum Beispiel die funktionellen Cysteine C229 und C231 zu aktivieren. Diese eigentlich funktionelle Interaktion führt dann zum Import der Varianten ohne dem Cystein C64. Da aber auch die Cystein-freie Ccs1-Variante in Mitochondrien zu finden ist, muss es einen Importmechanismus geben, der gänzlich von Cysteinen in Ccs1 unabhängig ist. Möglich wäre, dass der Mia40-unabhängige Import von Ccs1 wiederum von einem Faktor abhängt, der selbst Mia40 abhängig ist. In einem Stamm mit hochregulierten Mengen an Mia40 erhöhen sich die Mengen der typischen Substrate des Disulfid-Relay-Systems wie beispielsweise Tim13 nicht, da schon in Stämmen mit normalen Mengen an Mia40 alle translatierten Substratproteine vollständig in Mitochondrien importiert werden (Reddehase *et al.*, 2009). Damit wäre auch nicht mehr von dem unbekanntem Faktor in diesen Mitochondrien zu finden, wodurch die Menge von Ccs1 C27/64S nicht erhöht würde. Wenn jedoch die Mengen von Mia40 runterreguliert werden, verringert sich die Menge des Faktors in Mitochondrien und mit ihm die Menge an importiertem Ccs1. Die Ccs1-Varianten ohne das Cystein C64 wären also nicht mehr direkt, aber immer noch indirekt in ihrem Import von Mia40 abhängig.

IV - 1.2 Die Interaktion von Ccs1 mit Mia40

Die Untersuchungen der Cystein-zu-Serin-Varianten von Ccs1 haben gezeigt, dass Mia40 vor allem mit dem Cystein C64 von Ccs1 interagiert. Die Frage bleibt, wie Mia40 Ccs1 erkennt. Obwohl Ccs1 sich stark von anderen Substraten des Disulfid-Relay-Systems

unterscheidet, zeigt es doch auch Gemeinsamkeiten. So ist ein bestimmtes Cystein wichtig für den Import des Proteins. Zusätzlich finden sich auch in Ccs1 zwei α -Helices, an deren Enden jeweils die Cysteine C27 und C64 liegen (Lamb *et al.*, 1999). Die Sequenz um das Cystein C64 zeigt Ähnlichkeiten mit einem ITS-Signal (X[Ar]XX[Hy][Hy]XXC, Sideris *et al.*, 2009). So finden sich, neben anderen hydrophoben AS, mit Leucin L61 und Alanin A68 jeweils eine hydrophobe AS auf Position -3 und +3. Ein schwächeres ITS könnte auch um das Cystein C27 zu finden sein, wo ebenfalls eine amphipathische α -Helix existiert und sich ein Isoleucin an Position -3 und ein Valin an Position +4 befinden. Ganz allgemein scheint in Substraten als Erkennungs- und Importsignal für Mia40 eine α -Helix zu dienen, die ein Cystein enthält und eine hydrophobe Seite aufweist. Da diese Voraussetzungen nicht sehr sequenzspezifisch sind, könnte es viele weitere Substrate des Disulfid-Relay-Systems geben, die bisher durch bloße Sequenzvergleiche noch nicht entdeckt worden sind. Die Sequenzen um die anderen Cysteine von Ccs1 zeigen hingegen kein ITS-Signal. Dennoch könnte auch eine Interaktion zwischen Mia40 und Ccs1 möglich zu sein, wenn beide Cysteine C27 und C64 aus Ccs1 entfernt wurden, was den sehr schwachen Import der Variante C27/64S und der Variante ohne Cysteine in Mitochondrien erklären würde. Dies könnte in den Mitochondrien mit der Ccs1-Variante C27/64S dadurch geschehen, dass Mia40 mit anderen Cysteinen von Ccs1 interagiert. In diesem Fall gibt es jedoch möglicherweise nicht genug des mutierten Proteins, um die Bildung einer geringen Menge des Intermediates über andere Cysteine in sichtbaren Mengen zu ermöglichen. Wahrscheinlich wäre aber auch, dass die hydrophoben AS von Ccs1, die trotz der Mutation der Cysteine immer noch rund um C64 und C27 erhalten geblieben sind, ausreichen, um die Bildung eines Intermediats zu erlauben, wie es auch für das Substrat Atp23 nach Entfernen all seiner Cysteine beobachtet werden konnte (Sideris *et al.*, 2009; Milenkovic *et al.*, 2009; Weckbecker *et al.*, 2012). Diese Interaktion, die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen würde, könnte man jedoch in einer SDS-PAGE nicht direkt sichtbar machen. Mia40 könnte dann als Faltungsplattform für Ccs1 dienen. Ein möglicherweise auf diese Weise erzeugter, geringer Restimport wird für Ccs1 beobachtet. Dadurch wäre aber nicht erklärt, warum nicht mehr der Cystein-freien Ccs1-Variante in den Mitochondrien gefunden wird, wenn mehr Mia40 anwesend ist, wie dies im Falle einer Hochregulation der Menge an Mia40 der Fall ist. Die Weise,

wie Ccs1 ganz ohne Cysteine Mia40-unabhängig in Mitochondrien importiert, ist mit dem momentanen Modell des Imports nicht zu erklären. Es wäre interessant, ob Ccs1 mit einem weiteren Faktor im IMR von Mitochondrien interagiert und so in die Mitochondrien importiert werden könnte.

IV - 1.3 Der Redoxzustand von Ccs1 in Mitochondrien

Es konnte gezeigt werden, dass Ccs1 in Mitochondrien eine stabile Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 trägt. Die Ergebnisse deuten sehr stark darauf hin, dass diese Disulfidbrücke von Mia40 in das Protein eingebaut wird. Damit unterscheidet es sich von den Substraten mit Zwillings-CX_nC-Motiv, die jeweils (mindestens) zwei Disulfidbrücken tragen (Allen *et al.*, 2003; Arnesano *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2006; Herrmann und Riemer, 2012). Das einzige bisher bekannte Substrat, in das Mia40 nur eine stabilisierende Disulfidbrücke einbaut, ist Erv1, das aber selbst Teil des Disulfid-Relay-Systems ist (Terziyska *et al.*, 2007; Ang und Lu, 2009; Kallergi *et al.*, 2012). Die stabile Disulfidbrücke in Ccs1 hat scheinbar nur eine strukturelle, aber keine funktionelle Aufgabe, da zytoplasmisches Ccs1 diese Brücke nicht trägt, es aber dennoch aktiv ist (Culotta *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sod1 in Mitochondrien mit der Ccs1-Variante C27/64S immer noch oxidiert und aktiviert vorliegt (diese Arbeit und Caroline Burgard, Groß *et al.*, 2011). In den Mitochondrien hat die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C27 und C64 jedoch einen großen Einfluss auf die stabile Faltung des Proteins (s. III - 1.6 und IV - 1.4). Die Formation dieser Disulfidbrücke führt zum Import von Ccs1 in den IMR von Mitochondrien und macht es damit abhängig vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System. Es ist nicht geklärt, ob die Faltung von Ccs1 schon durch die Interaktion mit Mia40 ausgelöst wird, oder erst nach der Oxidation der Cysteine C27 und C64 erfolgt.

IV - 1.4 Die stabile Faltung von Ccs1

Die Bildung der Disulfidbrücke in Ccs1 ist nicht nur wichtig für den Import von Ccs1, sondern auch für dessen stabile Faltung in Mitochondrien. Fehlen die Cysteine C27 und C64 in Ccs1, ist die Domäne I gegenüber einem Verdau durch Trypsin nicht geschützt.

Das deutet darauf hin, dass diese Domäne in mitochondrialem Ccs1 ohne die Bildung der Disulfidbrücke nicht richtig gefaltet ist. Im Zytosol findet sich jedoch kaum oxidiertes Ccs1 (diese Arbeit und Klöppel *et al.*, 2011). Da Ccs1 auch im Zytosol aktiv ist und Sod1 aktiviert (Culotta *et al.*, 1997), muss Ccs1 dort auch falten. Mia40 steht in diesem Zellkompartiment nicht zur Verfügung (Chacinska *et al.*, 2004; Naoé *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Eventuell gibt es ein spezifisches oder generelles Chaperon, das dafür sorgt, dass Ccs1 auch ohne Disulfidbrücke in der Domäne I zwischen den Cysteinen C27 und C64 im Zytosol faltet. Es ist denkbar, dass sich der native Faltungszustand von Ccs1 im Zytosol und in den Mitochondrien unterscheidet.

Die Faltung von Ccs1 ist besonders im Hinblick auf die Verteilung des Proteins zwischen Zytosol und IMR interessant, da die Verteilung von Ccs1 zwischen Zytosol und dem IMR der Mitochondrien direkt von dieser Faltung im Zytosol abhängt. Faltet sich Ccs1 im Zytosol schnell, dann kann es nicht mehr in die Mitochondrien gelangen, da nur ungefaltetes Ccs1 durch die TOM-Pore eindringen kann. Faltet sich Ccs1 aber in den Mitochondrien besonders schnell, da das Disulfid-Relay-System aktiver ist, dann wird mehr des Proteins im IMR lokalisiert. Die Lokalisation von Ccs1 bedingt wiederum direkt die Lokalisation von Sod1 (Field *et al.*, 2003; Reddehase *et al.*, 2009). Somit könnte die Menge an Sod1, die sich in Mitochondrien befindet, über die Kontrolle der Faltung von Ccs1 gesteuert werden.

IV - 1.5 Modell der Biogenese von Ccs1

Es konnte bestätigt werden, dass Ccs1 trotz seiner ungewöhnlichen Architektur ein vollwertiges Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems ist. Mia40 interagiert mit dem Cystein C64 und baut eine stabile Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C64 und C27 in das Protein ein. Dadurch wird die Faltung von Ccs1 in Mitochondrien stabilisiert und das Protein in den IMR importiert (s. Abb. 34). Nach dem Import von Ccs1 in den IMR kann dieses wiederum mit Sod1 interagieren und die Superoxid Dismutase aktivieren, die ebenfalls entfaltet und inaktiv als apo-Sod1 in die Mitochondrien eintreten muss (Field *et al.*, 2003).

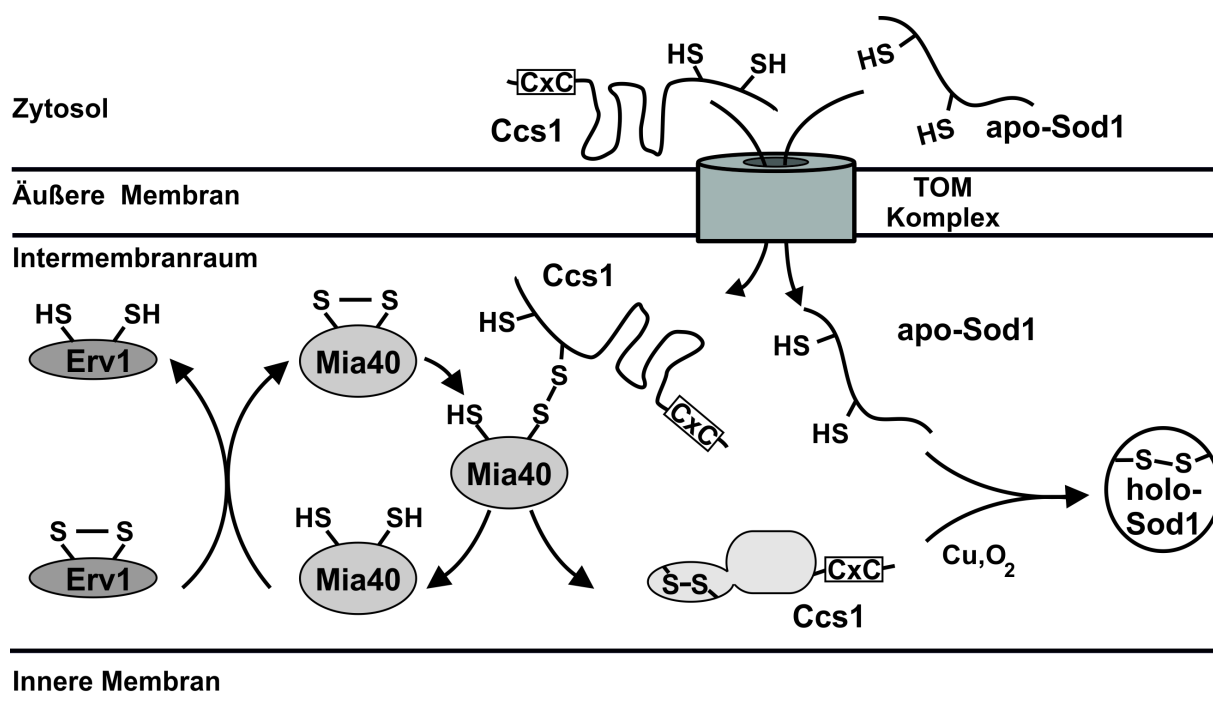


Abb. 34: Modell des Imports von Ccs1 in den IMR von Mitochondrien und die Bildung von aktivem holo-Sod1.

Im Zytosol trägt Ccs1 die stabile Disulfidbrücke nicht. Dennoch wird das Protein dort gefaltet und liegt vermutlich stabil vor (in Abb. 34 nicht dargestellt). Wie Ccs1 Sod1 genau aktiviert, ist nicht bekannt. Die beiden Cysteine C229 und C231 der Domäne III spielen dabei eine wichtige Rolle (Schmidt *et al.*, 1999). Ob diese Cysteine jedoch von Mia40 oxidiert werden müssen, um ihre Funktion zu erfüllen, ist nicht bekannt. Eine gemeinsame Struktur von Ccs1 und Sod1 zeigt eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen dem Cystein C229 des Ccs1 und dem Cystein C57 der Sod1 (Lamb *et al.*, 2001). Um abschließend klären zu können, ob Mia40 auch mit einem der Cysteine C229 und C231 des Ccs1 interagieren und an dieser Stelle eine Disulfidbrücke in das Protein einbauen kann, benötigt es weiterer Untersuchungen. Gänzlich unbekannt ist außerdem, wie Ccs1 das Kupfer erhält, das es für die Aktivierung von Sod1 sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien benötigt. Da Ccs1 entfaltet durch den TOM-Komplex in den IMR von Mitochondrien importiert, muss es vermutlich im IMR mit Kupfer beladen werden. Es ist möglich, dass sich das System dieser Beladung in Mitochondrien und im Zytosol unterscheidet.

IV - 2 Pet191

IV - 2.1 Der Import von Pet191 in Mitochondrien

Pet191 ist ein kleines IMR-Protein mit Zwillings-CX₉C-Motiv. Es wurde bisher nicht als Substrat des Disulfid-Relay-Systems bestätigt. Khalimonchuk und Kollegen zeigten 2008, dass der Import von Pet191 in Mitochondrien unabhängig von Erv1 ist (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Unabhängigkeit des Imports von Pet191 von Erv1 und damit vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems nicht bestätigt werden. Die vormals beobachtete Unabhängigkeit der mitochondrialen Pet191 Mengen von Erv1 könnte durch den in der damaligen Studie verwendeten Myc-Anhang an Pet191 bedingt sein. In dieser Arbeit hingegen wurde Pet191 nur ohne Anhang für die Untersuchungen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mengen an Pet191 in Mitochondrien stark sowohl von Mia40 als auch von Erv1 abhängen. Zusätzlich ist auch der *in vitro* Import von Pet191 in isolierte Mitochondrien direkt von den Mengen an Mia40 und von der Funktionalität von Erv1 abhängig. Dies belegt, dass diese beiden Proteine für die Lokalisierung von Pet191 im IMR von Mitochondrien eine große Rolle spielen. Weiterhin zeigt Pet191 eine für Mia40-Substrate typische Unabhängigkeit von zusätzlichem ATP und NADH für seinen Import (Lutz *et al.*, 2003). Sein Import ist jedoch abhängig von der Konzentration an DTT. Dies spricht dafür, dass Pet191 ungefaltet und reduziert an oxidiertes Mia40 bindet, dann Disulfide von Mia40 eingeführt werden und das gefaltete und für eine Passage der TOM-Pore nun zu große Protein im IMR lokalisiert bleibt. Dass Mia40 und Erv1 zusätzlich Einfluss auf die Stabilität von Pet191 haben, kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist hingegen sehr wahrscheinlich, dass das Protein ohne das Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System im IMR reduziert, entfaltet und nicht-funktionell bleibt. Dadurch diffundiert Pet191 durch die TOM-Pore zurück in das Zytosol oder wird von im IMR residierenden Proteasen erkannt und degradiert. Der Import von Pet191 hängt also direkt vom Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-System ab. Damit ist Pet191 ein weiteres Substrat von Mia40 mit Zwillings-CX₉C-Motiv.

IV - 2.2 Der Redoxzustand von Pet191 in Mitochondrien

Wie andere Substrate von Mia40 besitzt natives Pet191 in Mitochondrien Disulfidbrücken. Diese Disulfide sind stabil und werden durch DTT erst während einer Inkubation bei 95 °C geöffnet. Von Mia40 selbst ist bekannt, dass die Cysteine seines Zwillings-CX₉C-Motivs zwei stabile Disulfidbrücken formen, die erst bei 95 °C von DTT reduziert werden (Grumbt *et al.*, 2007; Terziyska *et al.*, 2009). Auch Cox17, ein anderes Substrat von Mia40 mit einem Zwillings-CX₉C-Motiv, bildet zwei stabile Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen dieses Motivs (Palumaa *et al.*, 2004; Arnesano *et al.*, 2005). Da Pet191, wie gezeigt, ein Imports substrat von Mia40 ist und von rekombinantem Mia40C oxidiert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass die Cysteine des Zwillings-CX₉C-Motivs, C5, C15, C46 und C56, wie in anderen Mia40 Substraten mit diesem Motiv, oxidiert vorliegen und zwei strukturelle, stabile Disulfidbrücken bilden.

Die Frage bleibt, wie der Redoxzustand der restlichen drei Cysteine in Pet191 ist. Nach der Behandlung des nativen Proteins mit AMS kam es zu einer Verringerung der Laufgeschwindigkeit in einer SDS-PAGE. Das zeigt, dass mindestens ein Cysteinrest von Pet191 reduziert vorliegt und damit zugänglich für AMS ist. Aus der Änderung der Laufgeschwindigkeitsänderung lässt sich jedoch nicht direkt schließen, wie viele AMS-Moleküle pro Protein gebunden haben, also wie viele Cysteine reduziert vorlagen, da die Laufeigenschaften der Proteine während einer SDS-PAGE nicht immer genau ihrer Größe entsprechen. Sicher ist, dass bei einer ungeraden Anzahl von Cysteinen eines von ihnen von intramolekularen Disulfidbrücken ausgeschlossen bleibt. Wahrscheinlich liegt das nicht-konservierte Cystein C86 im nicht-konservierten C-term. Ende von Pet191 reduziert vor. Intermolekulare Disulfidbrücken konnten bei Pet191 in Hefemitochondrien nicht beobachtet werden. Interessanterweise ist der Abstand zwischen den beiden Cysteinen C21 und C32, die zwischen den inneren Cysteinen des Zwillings-CX₉C-Motivs liegen, ebenfalls von Hefe bis Mensch über das Tier- und Pflanzenreich konserviert. Zwischen C15 und C21 liegen 5 AS, zwischen C21 und C32 10 (bzw. selten 9) AS. Dies deutet darauf hin, dass diese Cysteine eine Funktion in Pet191 erfüllen, obwohl sie kein Teil des Zwillings-CX₉C-Motivs sind. Tests mit überexprimierten und Anhänge tragenden Cystein-zu-Alanin-Mutanten von Pet191 zeigten, dass die Mutante C32A auf Glycerin einen

Wachstumsdefekt aufweist (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Bei der Mutante C21A wurde nur ein leichter Wachstumsdefekt auf Glycerin bei 30 °C, jedoch ein stärkerer bei 37 °C beobachtet (Khalimonchuk *et al.*, 2008). Nach den vorliegenden Daten könnten die beiden Cysteine C21 und C32 ebenfalls eine Disulfidbrücke bilden. Ebenso ist es möglich, dass sie funktionsabhängig mit anderen Cysteinen von Pet191 oder mit Cysteinen anderer Interaktionspartnern interagieren.

Eine TCA-Fällung änderte nichts an der Modifizierbarkeit der Cysteine von Pet191 mit AMS. Nach der Fällung konnte jedoch mindestens eine der Disulfidbrücken durch DTT schon bei 25 °C reduziert werden, die im nativen Protein nach Inkubation mit DTT bei 25 °C stabil war. Die Verringerung der Stabilität gegenüber DTT muss auf die komplette oder teilweise Entfaltung von Pet191 zurückzuführen sein. Dadurch ändert sich die Umgebung der Disulfidbrücke(n), die Stabilität der Brücke nimmt ab und die Cysteine werden durch DTT schon bei 25 °C reduziert und durch AMS modifiziert.

Die Identifikation der genauen Cysteinpaare, die in diese Vorgänge involviert sind, ist durch die mit dem Wildtypprotein durchgeführten Experimente nicht möglich. Um die Zahl und Natur der Disulfidbrücken in Pet191 eindeutig zu analysieren, ist es unabdingbar, verschiedene Cystein-zu-Serin-Varianten zu erzeugen. Mit diesen kann durch AMS-Experimente festgestellt werden, welche Cysteine in Pet191 Disulfidbrücken bilden.

IV - 2.3 Die Interaktion von Pet191 mit Mia40

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Pet191 mit Mia40 während eines *in vitro* Imports interagiert und dass dieser Import und die Interaktion der Proteine von der Konzentration an DTT bzw. β ME abhängig sind. Dies beweist, dass Pet191 ein Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems ist. Eine klare ITS (CXX[Hy][Hy]XX[Ar]XXC; Sideris *et al.*, 2009; ebenfalls MISS-Signal: Milenkovic *et al.*, 2009) existiert in *S. cerevisiae* Pet191 jedoch nicht. Es bleibt also fraglich, mit welchem Cystein von Pet191 Mia40 interagiert. Die in Pet191 von *H. sapiens* in der zweiten α -Helix mit CX₉C-Motiv vermutete ITS (C47-L50-K51-F54; Huigsloot *et al.*, 2011) findet sich in *S. cerevisiae* so nicht (C46-Q49-M50-F53). In dem Bereich des vermuteten ITS wurde bei einem Menschen mit Störung der Assemblierung des Komplexes IV die rezessive Mutation von *PET191*

A53P beschrieben. Diese Mutation könnte die oxidative Faltung des Proteins stören, entweder durch Zerstörung des ITS oder durch Störung der Bildung der α -Helix (Huigsloot *et al.*, 2011).

Mit welchem Cystein des Hefe-Pet191 Mia40 interagiert, könnte durch Cystein-zu-Serin-Mutanten von Pet191 bestimmt werden. Dadurch wäre es möglich, die genaue Sequenz um das interagierende Cysteine zu ermitteln und möglicherweise ein leicht abgewandeltes ITS zu bestätigen oder ein neues Motiv zu entdecken, das auch in noch unbekanntem Substraten auftreten könnte.

Pet191 und Mia40 bilden auch außerhalb einer Importreaktion in isolierten Mitochondrien ein Intermediat. Dies könnte darauf hinweisen, dass Mia40 nicht nur während des Imports, sondern auch später für das bereits gefaltete Pet191 eine Rolle spielt. Vielleicht ist diese Interaktion wichtig für die noch unbekannt Funktion dieses Proteins. Es wäre denkbar, dass Pet191 im Laufe seiner Funktion reduziert wird und dann von Mia40 erneut oxidiert werden muss, um seine Funktionalität zu behalten, wie es auch von Mia40 selbst bekannt ist, das von Erv1 reoxidiert wird. Möglicherweise spielen in Pet191 in diesem Fall die beiden ebenfalls stark konservierten Cysteine C21 und C32 außerhalb des Zwilling-CX₉C-Motivs eine Rolle.

Interessant wäre ebenfalls eine Untersuchung auf eine mögliche Interaktion von Pet191 mit Erv1. Das Rekonstitutionsexperiment hat zwar gezeigt, dass Erv1 nicht in der Lage ist, in Abwesenheit von Mia40 Pet191 *in vitro* zu oxidieren. Dennoch ist es möglich, dass Erv1 *in vivo* eine direkte Rolle in der Oxidation dieses Proteins spielt, wie es für das Substrat Cmc1 *in vitro* gezeigt wurde (Bourens *et al.*, 2012). Cmc1 trägt wie Pet191 eine ungerade Anzahl an Cysteinen. Denkbar wäre eine Rolle von Erv1 in der Entstehung einer möglichen dritten Disulfidbrücke in Pet191.

IV - 2.4 Erkenntnisse zur Biogenese von Pet191

Die Ergebnisse dieser Studie charakterisieren Pet191 als vollwertiges Substrat des Mia40-Erv1-Disulfid-Relay-Systems. Der Import in Mitochondrien ist von diesem System abhängig und, wie bei anderen Substraten, redoxsensitiv. Dies lässt den Schluss zu, dass Pet191 reduziert in den IMR der Mitochondrien eindringt und dort von Mia40 oxidiert

wird. Darauf weist ebenfalls der Nachweis von stabilen Disulfidbrücken im Protein als auch die Oxidation von rekombinantem, reduziertem Pet191 *in vitro* durch rekombinantes Mia40 hin. Die Frage bleibt, ob Pet191 zwei Disulfidbrücken trägt, wie andere Vertreter der Gruppe der Proteine mit Zwillings-CX₉C-Motiv, oder ob die beiden stark konservierten AS C21 und C32 ebenfalls eine Disulfidbrücke bilden. Solange die Funktion von Pet191 und die Anzahl seiner Disulfidbrücken nicht geklärt sind, kann keine klare Aussage über die mögliche Ursache des Intermediats getroffen werden, das sich möglicherweise auch außerhalb der typischen Importreaktion zwischen Pet191 und Mia40 bildet. Vorstellbar wäre, dass die Cysteine von Pet191 im Rahmen seiner Funktion reduziert werden. Das Protein muss deshalb immer wieder von Mia40 oxidiert werden, um seine Funktion wiederzuerlangen.

Referenzen

- Abajian C., Yatsunyk LA., Ramirez BE., Rosenzweig AC.** (2004). *Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding.* J Biol Chem.. 279(51): 53584-92.
- Adam A., Endres M., Sirrenberg C., Lottspeich F., Neupert W., Brunner M.** (1999). *Tim 9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria* EMBO J.. 18(2): 313-19.
- Allen S., Lu H., Thornton D., Tokatlidis K.** (2003). *Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10.* J Biol Chem.. 278: 38505-13.
- Ang SK., Lu H.** (2009). *Deciphering structural and functional roles of individual disulfide bonds of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p.* J Biol Chem.. 284(42): 28754-61.
- Arnesano F., Balatri E., Banci L., Bertini I., Winge DR.** (2005). *Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding.* Structure. 13(5): 713-22.
- Baker MJ., Webb CT., Stroud DA., Palmer CS., Frazier AE., Guiard B., Chacinska A., Gulbis JM., Ryan MT.** (2009). *Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import.* Mol Biol Cell.. 20(3): 769-79.
- Banci L., Bertini I., Cefaro C., Cenacchi L., Ciofi-Baffoni S., Felli IC., Gallo A., Gonnelli L., Luchinat E., Sideris D., Tokatlidis K.** (2010). *Molecular chaperone function of Mia40 triggers consecutive induced folding steps of the substrate in mitochondrial protein import.* Proc Natl Acad Sci USA.. 107(47): 20190-5.
- Banci L., Bertini I., Cefaro C., Ciofi-Baffoni S., Gallo A., Martinelli M., Sideris DP., Katrakili N., Tokatlidis K.** (2009). *MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria.* Nat Struct Mol Biol.. 16(2): 198-206.
- Barros MH., Johnson A., Tzagoloff A.** (2004). *COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly.* J Biol Chem.. 279(30): 31943-7.
- Bien M., Longen S., Wagener N., Chwalla I., Herrmann JM., Riemer J.** (2010). *Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione.* Mol Cell.. 37(4): 516-28.
- Bihlmaier K., Mesecke N., Terziyska N., Bien M., Hell K., Herrmann JM.** (2007). *The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain.* J Cell Biol.. 179(3): 389-95.
- Blom J., Kübrich M., Rassow J., Voos W., Dekker PJ., Maarse AC., Meijer M., Pfanner N.** (1993). *The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane* Mol Cell Biol.. 13(12): 7364-71.
- Bohnert M., Rehling P., Guiard B., Herrmann JM., Pfanner N., van der Laan M.** (2010). *Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport* Curr Biol.. 20(13): 1227-32.

- Bömer U., Meijer M., Guiard B., Dietmeier K., Pfanner N., Rassow J.** (1997b). *The sorting route of cytochrome b2 branches from the general mitochondrial import pathway at the preprotein translocase of the inner membrane.* J Biol Chem.. 272(48): 30439-46.
- Bömer U., Meijer M., Maarse AC., Hönlinger A., Dekker PJ., Pfanner N., Rassow J.** (1997a). *Multiple interactions of components mediating preprotein translocation across the inner mitochondrial membrane.* EMBO J.. 16(9): 2205-16.
- Böttlinger L., Gornicka A., Czerwik T., Bragoszewski P., Loniewska-Lwowska A., Schulze-Specking A., Truscott KN., 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(20): 3957-69.
- Bourens M., Dabir DV., Tienson HL., Sorokina I., Koehler CM., Barrientos A.** (2012). *Role of twin Cys-Xaa9-Cys motif cysteines in mitochondrial import of the cytochrome C oxidase biogenesis factor Cmc1* J Biol Chem.. 287(37): 31258-69.
- Bradford MM.** (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.
- Carr HS., Winge DR.** (2003). *Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion.* Acc Chem Res.. 36(5): 309-16.
- Chacinska A., Guiard B., Müller JM., 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(44): 29723-29.
- Chacinska A., Pfannschmidt S., Wiedemann N., Kozjak V., Sanjuán Szklarz LK., Schulze-Specking A., Truscott KN., Guiard B., Meisinger C., Pfanner N.** (2004). *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins.* EMBO J.. 23(19): 3735-46.
- Coppock DL., Thorpe C.** (2006). *Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases.* Antioxid Redox Signal. 8(3-4): 300-11.
- Culotta VC., Klomp LW., Strain J., Casareno RL., Krems B., Gitlin JD.** (1997). *The copper chaperone for superoxid dismutase.* J Biol Chem.. 272: 23469-72.
- Curran SP., Leuenberger D., Leverich EP., Hwang DK., Beverly KN., Koehler CM.** (2004). *The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway* J Biol Chem.. 279(42): 43744-51.
- Curran SP., Leuenberger D., Oppliger W., Koehler CM.** (2002). *The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier* EMBO J.. 21(5): 942-53.
- Dabir DV., Leverich EP., Kim SK., Tsai FD., Hirasawa M., Knaff DB., Koehler CM.** (2007). *A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1.* EMBO J.. 26(23): 4801-11.

- Deponte M., Hell K.** (2009). *Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria* J Biochem.. 146(5): 599-608.
- Diekert K., Kispal G., Guiard B., Lill R.** (1999). *An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space.* Proc Natl Acad Sci USA.. 96(21): 11752-7.
- Dimmer KS., Papic D., Schumann B., Sperl D., Krumpe K., Walther DM., Rapaport D.** (2012). *A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins* J Cell Sci.. 125(Pt 14): 3464-73.
- Dumont ME., Cardillo TS., Hayes MK., Sherman F.** (1991). *Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in Saccharomyces cerevisiae* Mol Cell Biol.. 11(11): 5487-96.
- Dumont ME., Ernst JF., Sherman F.** (1988). *Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase deficient mitochondria and altered apocytochromes c* J Biol Chem.. 263(31): 15928-37.
- Durigon R., Wang Q., Pavia EC., Grant CM., Lu H.** (2012). *Cytosolic thioredoxin system facilitates the import of the mitochondrial small Tim proteins* EMBO Rep.. 13(10): 916-22.
- Eckers E., Petrungraro C., Groß D., Riemer J., Hell K., Deponte M.** (2013). *Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl:cytochrome c oxidoreductase Erv in opisthokonts and parasitic protists* J Biol Chem.. 288(4): 2676-88.
- Farrell SR., Thorpe C.** (2005). *Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity.* Biochemistry. 44(5): 1532-41.
- Fass D.** (2008). *The Erv family of sulfhydryl oxidases.* Biochim Biophys Acta. 1783(4): 557-66.
- Field LS., Furukawa Y., O'Halloran TV., Culotta VC.** (2003). *Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria* J Biol Chem.. 278: 28052-59.
- Furukawa Y., Torres AS., O'Halloran TV.** (2004). *Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS.* EMBO J.. 23(14): 2872-81.
- Gabriel K., Milenkovic D., Chacinska A., Müller J., Guiard B., Pfanner N., Meisinger C.** (2007). *Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway.* J Mol Biol.. 365(3): 612-20.
- Glaser SM., Miller BR., Cumsy MG.** (1990). *Removal of a hydrophobic domain within the mature portion of a mitochondrial inner membrane protein causes its mislocalization to the matrix.* Mol Cell Biol.. 10(5): 1873-81.
- Glerum DM., Shtanko A., Tzagoloff A.** (1996). *Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase.* J Biol Chem.. 271(24): 14504-9.
- Glick BS.** (1991). *Protein import into isolated yeast mitochondria.* Methods Cell Biol.. 34: 389-99.

- Glick BS., Brandt A., Cunningham K., Müller S., Hallberg RL., Schatz G.** (1992). *Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism.* Cell. 69(5): 809-22.
- Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R.** (2010). *A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI.* Nucleic Acids Res. 38: 695-9.
- Groß, DP., Burgard CA., Reddehase S., Leitch JM., Culotta VC., 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(20): 3758-67.
- Grumbt B., Stroobant V., Terziyska N., Israel L., Hell K.** (2007). *Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space.* J Biol Chem.. 282(52): 37461-70.
- Guo PC., Ma JD., Jiang YL., Wang SJ., Bao ZZ., Yu XJ., Chen Y., Zhou CZ.** (2012). *Structure of yeast sulfhydryl oxidase erv1 reveals electron transfer of the disulfid relay system in the mitochondrial intermembrane space* J Biol Chem.. 287(42): 34961-9.
- Hahne K., Haucke V., Ramage L., Schatz G.** (1994). *Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments.* Cell. 79(5): 829-39.
- Hell K., Herrmann JM., Pratje E., Neupert W., Stuart RA.** (1998). *Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria.* Proc Natl Acad Sci USA.. 95(5): 2250-5.
- Hell K., Neupert W., Stuart RA.** (2001). *Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA* EMBO J.. 20(6): 1281-8.
- Herrmann JM., Hell K.** (2005). *Chopped, trapped or tacked - protein translocation into the IMS of mitochondria* Trends Biochem Sci.. 30(4): 205-11.
- Herrmann JM., Riemer J.** (2012). *Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space.* J Biol Chem.. 287(7): 4426-33.
- Hines V., Brandt A., Griffiths G., Horstmann H., Brüttsch H., Schatz G.** (1990). *Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70* EMBO J.. 9(10): 3191-200.
- Hofmann S., Rothbauer U., Mühlenbein N., Baiker K., Hell K., Bauer MF.** (2005). *Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space* J Mol Biol.. 353(3): 517-28.
- Hoppins SC, Nargang FE.** (2004). *The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes.* J Biol Chem.. 279(13): 12396-405.

- Huigsloot M., Nijtmans LG., Szklarczyk R., Baars MJ., van den Brand MA., Hendriksfranssen MG., van den Heuvel LP., Smeitink JA., Huynen MA., Rodenburg RJ.** (2011). *A mutation in C2orf64 causes impaired cytochrome c oxidase assembly and mitochondrial cardiomyopathy.* Am J Hum Genet.. 88(4): 488-93.
- Jan PS., Esser K., Pratje E., Michaelis G.** (2000). *Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2.* Mol Gen Genet.. 263(3): 483-91.
- Johnston M., Davis RW.** (1984). *Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol.. 4(8): 1440-8.
- Jonsson PA., Graffmo KS., Andersen PM., Brännström T., Lindberg M., Oliveberg M., Marklund SL.** (2006). *Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models* Brain. 129(Pt 2): 451-64.
- Káldi K., Bauer MF., Sirrenberg C., Neupert W., Brunner M.** (1998). *Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins* EMBO J.. 17(6): 1569-76.
- Kallergi E., Andreadaki M., Kritsiligkou P., Katrakili N., Pozidis C., Tokatlidis K., Banci L., Bertini I., Cefaro C., Ciofi-Baffoni S., Gajda K., Peruzzini R.** (2012). *Targeting and maturation of Erv1/ALR in the mitochondrial intermembrane space.* ACS Chem Biol.. 7(4): 707-14.
- Kawamata H., Manfredi G.** (2008). *Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria.* Hum Mol Genet.. 17(21): 3303-17.
- Kawano S., Yamano K., Naoé 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 USA.. 106(34): 14403-7.
- Khalimonchuk O., Rigby K., Bestwick M., Pierrel F., Cobine PA., Winge DR.** (2008). *Pet191 is a cytochrome c oxidase assembly factor in Saccharomyces cerevisiae.* Eukaryot Cell.. 7(8): 1427-31.
- Klöppel C., Suzuki Y., Kojer K., Petrunaro 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(20): 3749-57.
- Koehler CM., Leuenberger D., Merchant S., Renold A., Junne T., Schatz G.** (1999a). *Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease* Proc Natl Acad Sci USA.. 96(5): 2141-46.
- Koehler CM., Merchant S., Oppliger W., Schmid K., Jarosch E., Dolfini L., Junne T., Schatz G., Tokatlidis K.** (1998). *Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins.* EMBO J.. 17(22): 6477-86.

- Koehler CM., Merchant S., Schatz G.** (1999b). *How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space* Trends Biochem Sci.. 24(11): 428-32.
- Kyhse-Andersen J.** (1984). *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. J Biochem Biophys Methods. 10(3-4): 203-9.
- Laemmli UK.** (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227(5259): 680-5.
- Lamb AL., Torres AS., O'Halloran TV., Rosenzweig AC.** (2001). *Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone*. Nat Struct Biol.. 8(9): 751-5.
- Lamb AL., Torres AS., O'Halloran TV., Rosenzweig AC.** (2000). *Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone*. Biochemistry. 39(48): 14720-7.
- Lamb AL., Wernimont AK., Pufahl RA., Culotta VC., O'Halloran TV., Rosenzweig AC.** (1999). *Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase*. Nat Struct Biol.. 6: 724-9.
- Lange H., Lisowsky T., Gerber J., Mühlenhoff 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(8): 715-20.
- Lee J., Hofhaus G., Lisowsky T.** (2000). *Erv1p from Saccharomyces cerevisiae is a FAD-linked sulfhydryl oxidase*. FEBS Lett.. 477(1-2): 62-6.
- Leitch JM., Yick PJ, Culotta VC.** (2009). *The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase*. J Biol Chem.. 284(37): 24679-83.
- Leuenberger D., Bally NA., Schatz G., Koehler CM.** (1999). *Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins* EMBO J.. 18(17): 4816-22.
- Lionaki E., Aivaliotis M., Pozidis C., Tokatlidi K.** (2010). *The N-terminal shuttle domain of Erv1 determines the affinity for Mia40 and mediates electron transfer to the catalytic Erv1 core in yeast mitochondria*. Antioxid Redox Signal. 13(9): 1327-39.
- Lisowsky T.** (1992). *Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast*. Mol Gen Genet.. 232(1): 58-64.
- Longen S., Bien M., Bihlmaier K., Kloeppel C., Kauff F., Hammermeister M., Westermann B., Herrmann JM., Riemer J.** (2009). *Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family*. J Mol Biol.. 393(2): 356-68.
- Lu H., Allen S., Wardleworth L., Savory P., Tokatlidis K.** (2004). *Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo*. J Biol Chem.. 279(18): 18952-8.

- Lu H., Woodburn J.** (2005). *Zinc binding stabilizes mitochondrial Tim10 in a reduced and import-competent state kinetically.* J Mol Biol. 353(4): 897-910.
- Lutz T., Neupert W., Herrmann JM.** (2003). *Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space.* EMBO J.. 22(17): 4400-8.
- McEwen JE., Hong KH., Park S., Preciado GT.** (1993). *Sequence and chromosomal localization of two PET genes required for cytochrome c oxidase assembly in Saccharomyces cerevisiae.* Curr Genet.. 23(1): 9-14.
- Mesecke N., Bihlmaier K., Grumbt B., Longen S., Terziyska N., Hell K., Herrmann JM.** (2008). *The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40* EMBO Rep.. 9(11): 1107-13.
- Mesecke N., Terziyska N., Kozany C., Baumann F., Neupert W., Hell K., Herrmann JM.** (2005). *A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import.* Cell. 121(7): 1059-69.
- 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(31): 22472-80.
- Milenkovic D., Ramming T., Müller JM., Wenz LS., Gebert N., Schulze-Specking A., Stojanovski D., Rospert S., Chacinska A.** (2009). *Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria.* Mol Biol Cell.. 20(10): 2530-9.
- Morgan B., Ang SK., Yan G., Lu H.** (2009). *Zinc Can Play Chaperone-like and Inhibitor Roles during Import of Mitochondrial Small Tim Proteins* J Biol Chem.. 284(11): 6818-25.
- Morgan B., Lu H.** (2008). *Oxidative folding competes with mitochondrial import of the small Tim proteins.* Biochem J.. 411(1): 115-22.
- 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.
- Naoé 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(46): 47815-21.
- Neupert W., Brunner M.** (2002). *The protein import motor of mitochondria.* Nat Rev Mol Cell Biol.. 3(8): 555-65.
- Neupert W., Herrmann JM.** (2007). *Translocation of proteins into mitochondria* Annu Rev Biochem.. 76: 723-49.

- Nobrega MP., Bandeira SC., Beers J., Tzagoloff A.** (2002). *Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase.* J Biol Chem.. 277(43): 40206-11.
- Palumaa P., Kangur L., Voronova A., Sillard R.** (2004). *Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase.* Biochem J.. 382(Pt 1): 307-14.
- 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(17): 2888-98.
- Pufahl RA., Singer CP., Peariso KL., Lin SJ., Schmidt PJ., Fahrni CJ., Culotta VC., Penner-Hahn JE., O'Halloran TV.** (1997). *Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1.* Science. 278(5339): 853-6.
- Rae TD., Torres AS., Pufahl RA., O'Halloran TV.** (2001). *Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS.* J Biol Chem.. 276(7): 5166-76.
- 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(2): 331-8.
- Reinders J., Zahedi RP., Pfanner N., Meisinger C., Sickmann A.** (2006). *Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics.* J Proteome Res.. 5(7): 1543-54.
- Rigby K., Zhang L., Cobine PA., George GN., Winge D.** (2007). *Characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem.. 282(14): 10233-42.
- Roe JA., Butler A., Scholler DM., Valentine JS., Marky L., Breslauer KJ.** (1988). *Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives.* Biochemistry. 27(3): 950-8.
- Sagar AJ., Pandit MW.** (1983). *Denaturation studies on bovine pancreatic ribonuclease. Effect of trichloroacetic acid.* Biochim Biophys Acta. 743(3): 303-9.
- Schmidt PJ., Rae TD., Pufahl RA., Hamma T., Strain J., O'Halloran TV., Culotta VC.** (1999). *Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase* J Biol Chem.. 274: 23719-25.
- Schwaiger M., Herzog V., Neupert W.** (1987). *Characterization of Translocation Contact Sites Involved in the Import of Mitochondrial Proteins* J Cell Biol.. 105: 235-46.
- Sideris DP., Petrakis N., Katrakili N., Mikropoulou D., Gallo A., Ciofi-Baffoni S., Banci L., Bertini I., Tokatlidis K.** (2009). *A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding.* J Cell Biol.. 187(7): 1007-22.
- Sideris DP., Tokatlidis K.** (2007). *Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space* Mol Microbiol.. 65(5): 1360-73.

- Sievers F., Wilm A., Dineen DG., Gibson TJ., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson JD., Higgins D.** (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega* Mol Syst Biol.. 7: 539.
- Sikorski RS., Hieter P.** (1989). *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 122(1): 19-27.
- Sirrenberg C., Bauer MF., Guiard B., Neupert W., Brunner M.** (1996). *Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22* Nature. 384(6609): 582-5.
- Sirrenberg C., Endres M., Fölsch H., Stuart RA., Neupert W., Brunner M.** (1998). *Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5*. Nature.. 391(6670): 912-5.
- Sivaraman T., Kumar TK., Jayaraman G., Yu C.** (1997). *The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation*. J Protein Chem.. 16(4): 291-7.
- 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(39): 22842-9.
- Stojanovski D., Milenkovic D., Müller JM., Gabriel K., Schulze-Specking A., Baker MJ., Ryan MT., Guiard B., Pfanner N., Chacinska A.** (2008). *Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase* J Cell Biol.. 183(2): 195-202.
- Studier FW, Moffat BA** (1986). *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol.. 189(1): 113-30.
- Sturtz LA., Diekert K., Jensen LT., Lill R., Culotta VC.** (2001). *A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria* J Biol Chem.. 276(41): 38084-9.
- Sztolsztener ME., Brewinska A., Guiard B., Chacinska A.** (2013). *Disulfide Bond Formation: Sulfhydryl Oxidase ALR Controls Mitochondrial Biogenesis of Human MIA40* Traffic. 14: 309-20.
- Tamura Y., Endo T., Iijima M., Sesaki H.** (2009). *Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria*. J Cell Biol.. 185(6): 1029-45.
- Tay SK., Nesti C., Mancuso M., Schon EA., Shanske S., Bonilla E., Davidson MM., Dimauro S.** (2004). *Studies of COX16, COX19, and PET191 in human cytochrome-c oxidase deficiency*. Arch Neurol.. 61(12): 1935-7.
- Terziyska N., Grumbt B., Bien M., Neupert W., Herrmann JM., Hell K.** (2007). *The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway*. FEBS Lett.. 581(6): 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(3): 1353-63.

- Terziyska N., Lutz T., Kozany C., Mokranjac D., Mesecke N., Neupert W., Herrmann JM., Hell K.** (2005). *Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions.* FEBS Lett.. 579(1): 179-84.
- van der Laan M., Rissler M., Rehling P.** (2006). *Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines.* FEMS Yeasts Res.. 6(6): 849-61.
- van Loon AP., Brändli AW., Schatz G.** (1986). *The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting.* Cell. 44(5): 801-12.
- Webb CT., Gorman MA., Lazarou M., Ryan MT., Gulbis JM.** (2006). *Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller.* Mol Cell.. 21: 123-33.
- Weckbecker D., Longen S., Riemer J., Herrmann JM.** (2012). *Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria* EMBO J.. 31(22): 4348-58.
- Wiedemann N., Truscott KN., Pfannschmidt S., Guiard B., Meisinger C., Pfanner N.** (2004). *Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway.* J Biol Chem.. 279(18): 18188-94.
- Woods RA., Gietz RD.** (2001). *High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast.* Methods Mol Biol.. 177: 85-97.

Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Groß DP., Burgard CA., Reddehase S., Leitch JM., Culotta VC., 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(20), 3758-67.

Eckers E., Petrungaro C., Groß D., Riemer J., Hell K., Deponete M. (2013). *Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl:cytochrome c oxidoreductase Erv in opisthokonts and parasitic protists.* J Biol Chem. 288(4), 2676-88.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Neupert und Herrn Prof. Dr. Ladurner für die Möglichkeit in ihrem Institut meine Dissertation zu erarbeiten.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Soll für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie der LMU und Begutachtung meiner Doktorarbeit. Auch Herrn Prof. Dr. Jung danke ich für die Prüfung meiner Arbeit als Zweitgutachter.

Weiterhin danke ich allen meinen Prüfern, die sich die Mühe machten, meine Arbeit zu beurteilen.

Besonderer Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Kai Hell, der mir immer mit Rat zur Seite stand und meine Laborarbeit maßgeblich unterstützt hat.

Danke auch an alle Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre.