

**Assemblierung metallbindender Proteine
im Intermembranraum und
in der Matrix von Mitochondrien**

Thomas Lutz

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

14. Oktober 2003

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Herrmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Scheer
Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 2003

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	vii
1 Einleitung	1
1.1 Proteinimport in Mitochondrien	2
1.1.1 Der TOM-Komplex	2
1.1.2 Proteintranslokation über Außen- und Innenmembran . . .	4
1.1.3 Proteinimport in den Intermembranraum	5
1.2 Biosynthese von Fe/S-Clustern	6
1.2.1 Fe/S-Proteine	6
1.2.2 Komponenten der ISC-Maschinerie	6
1.2.3 Biosynthese cytosolischer Fe/S-Cluster	9
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Molekularbiologische Methoden	11
2.1.1 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	11
2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	11
2.1.3 Klonierung von DNS-Fragmenten	12
2.1.3.1 Restriktionsverdau	12
2.1.3.2 Ligation	12
2.1.3.3 Zwischenklonierung	12
2.1.3.4 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	13
2.1.3.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	13
2.1.4 Reinigung und Analyse von DNS	13
2.1.4.1 Analytische und präparative Gelelektrophorese .	13
2.1.4.2 Konzentrationsbestimmung	13
2.1.5 Verwendete Plasmide	14
2.1.6 Klonierungsstrategien	15
2.2 Genetische Methoden	17
2.2.1 Verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	17
2.2.2 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	18
2.2.3 Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	18
2.3 Proteinchemische Methoden	18

2.3.1	Elektrophoretische Methoden	18
2.3.1.1	SDS-Gelelektrophorese	18
2.3.1.2	Harnstoff-Gelelektrophorese	19
2.3.1.3	Native Gelelektrophorese von Yah1	19
2.3.1.4	Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	19
2.3.1.5	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	19
2.3.2	Autoradiographie und Densitometrie	20
2.3.3	Synthese von ³⁵ S-markierten Proteinen <i>in vitro</i>	20
2.3.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	20
2.3.5	Fällung von Proteinen durch TCA	21
2.3.6	Überexpression und Reinigung von Proteinen	21
2.3.6.1	Reinigung von Ssq1 und Jac1	21
2.3.6.2	Reinigung von Tim13	22
2.3.6.3	Reinigung von Yah1 und Nfs1	22
2.3.7	Derivatisierung von Proteinen	22
2.3.7.1	Derivatisierung mit AMS	22
2.3.7.2	Derivatisierung mit NEM	23
2.3.8	Proteinfaltungsexperimente mit Tim13	23
2.4	Zellbiologische Methoden	23
2.4.1	Isolierung von Mitochondrien aus Hefe	23
2.4.2	Import von Proteinen in Mitochondrien	24
2.4.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten	25
2.4.3.1	Bestimmung der LDH-Aktivität	25
2.4.3.2	Bestimmung der MDH-Aktivität	25
2.4.3.3	Bestimmung der SDH-Aktivität	26
2.4.3.4	Bestimmung der Aconitase-Aktivität	26
2.5	Immunologische Methoden	26
2.5.1	Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen	26
2.5.2	Verwendete Antikörper	26
2.5.3	Reinigung von Antikörpern	27
2.5.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	28
2.5.5	Immunpräzipitations-Experimente	28
2.6	Puffer und Medien	29
2.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	29
2.8	Geräte	30
3	Ergebnisse	33
3.1	Import von Tim13	33
3.1.1	Tim13 wird über den TOM-Komplex importiert	33
3.1.2	Import von Tim13 ist unabhängig von ATP	34
3.1.3	Das Cysteinmotiv von Tim13 ist für den Import essentiell	36

3.1.4	Endogenes Tim13 liegt in reduzierter Form vor	38
3.1.5	Rekombinantes Tim13 bindet Zn^{2+}	39
3.1.6	Faltung von Tim13	39
3.1.6.1	Endogenes Tim13 besitzt eine gefaltete Domäne	39
3.1.6.2	Tim13 faltet sich während des <i>in vitro</i> -Imports	41
3.1.6.3	Die Faltung von Tim13 ist Zn^{2+} -stabilisiert	41
3.1.7	Translokation und Faltung von Tim13	42
3.1.7.1	Rekombinantes Tim13 ist importkompetent	42
3.1.7.2	Tim13 ist nur in ungefaltetem Zustand importkompetent	43
3.1.7.3	Zn^{2+} ist für den Import von Tim13 notwendig	43
3.1.7.4	Die Faltung von Tim13 ist für die Translokation notwendig	45
3.2	Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese	46
3.2.1	Ssq1 interagiert mit Mge1	46
3.2.2	Ssq1 interagiert nicht mit Tim44	48
3.2.3	Ssq1- und Jac1-Mutanten zeigen reduzierte SDH-Aktivität	48
3.2.4	Apo- und Holo-Yah1 können durch Nativgelelektrophorese getrennt werden	49
3.2.5	Kinetik der Fe/S-Cluster-Biosynthese	53
3.2.6	Ssq1 und Jac1 sind für die Assemblierung von Fe/S-Clustern notwendig	55
3.2.7	Yfh1 ist für die Assemblierung von Fe/S-Cluster notwendig	57
4	Diskussion	59
4.1	Import von Tim13 in den Intermembranraum	59
4.1.1	Translokation über den TOM-Komplex	59
4.1.2	Import in den Intermembranraum	60
4.1.3	Oxidationszustand, Zinkbindung und Faltung von Tim13	62
4.1.4	Kofaktorassemblierung und Proteinimport	63
4.2	Fe/S-Cluster Assemblierung in Mitochondrien	65
4.2.1	Ssq1, Jac1 und Mge1 als Hsp70-Chaperonsystem	65
4.2.2	<i>In vitro</i> -Assemblierung des Fe/S-Clusters von Yah1	65
4.2.3	Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese	66
4.2.4	Yfh1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese	68
5	Zusammenfassung	69
6	Literatur	70
	Veröffentlichungen	83
	Danksagung	85

Lebenslauf

87

Verwendete Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampère
AAC	<i>ATP/ADP carrier</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMS	4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
c	centi
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
Cam	Chloramphenicol
CCHL	Cytochrom c-Hämlyase
Ci	Curie
CK	Creatinkinase
CP	Creatinphosphat
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E...	Extinktion bei ... nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz
F	Faraday
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

G	Guanin
GST	Glutathion-Transferase
GSH	Glutathion
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschock-Protein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
IMP	<i>Inner membrane peptidase</i>
ISC oder <i>isc</i>	<i>iron sulfur cluster assembly</i>
k	kilo
KOH	Kalilauge
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
μ	micro
m	Meter
m	milli
M	Mol pro Liter
MBP	Maltose bindendes Protein
MDH	Malat-Dehydrogenase
MIP	<i>Mitochondrial intermediate peptidase</i>
MPP	<i>Mitochondrial processing peptidase</i>
min	Minute(n)
n	nano
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NEM	N-Ethylmaleimid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
OD...	Optische Dichte bei ... nm
o-Phe	o-Phenanthrolin
p	pico
PA	Protein A
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)

SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STI	<i>Soybean trypsin inhibitor</i>
T	Thymin
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIM	<i>Translocase inner membrane</i>
TOM	<i>Translocase outer membrane</i>
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethyldiamin
TRAP	Triethanolaminpuffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>Unit(s)</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
Ω	Ohm

Kapitel 1

Einleitung

Mitochondrien sind die Zellorganellen von Eukaryonten, in denen durch Atmung und oxidative Phosphorylierung Energie in Form von ATP gewonnen wird. Sie besitzen zwei Membranen, die Außen- und die Innenmembran. Die Außenmembran umschließt die Innenmembran und trennt so den Intermembranraum vom Cytosol ab. Die Innenmembran umschließt die Matrix.

Mitochondrien können sich teilen und werden bei der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben. Es findet so keine *de novo*-Synthese der Organellen statt. Da mitochondriale Proteine fast ausschließlich im Zellkern kodiert sind und ihre Translation folglich im Cytosol stattfindet, müssen die meisten Proteine für die Biogenese der Mitochondrien in die Organellen transportiert werden. Dieser für die Biogenese der Mitochondrien essentielle Importprozess wurde in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem Roten Brotschimmel *Neurospora crassa* untersucht [40, 79, 91]. Heute kennt man dort drei Membrankomplexe, die maßgeblich an der Translokation von Polypeptiden über oder in die Mitochondrienmembranen beteiligt sind, den TOM-Komplex in der Außenmembran und den TIM23- sowie TIM22-Komplex in der Innenmembran. Der TOM-Komplex ist sowohl für die Translokation von Proteinen über die Außenmembran verantwortlich als auch für die Insertion von Proteinen in diese Membran. Die Translokation von Polypeptiden vom Intermembranraum in die Matrix wird durch den TIM23-Komplex ermöglicht. Für die Insertion von Proteinen aus dem Intermembranraum in die Innenmembran sind beide TIM-Komplexe zuständig. Der Oxa1-Komplex ist eine weitere mitochondriale Translokationskomponente und inseriert Proteine von der Matrix in die Innenmembran.

Die Sortierung von Proteinen in Außen- oder Innenmembran, Intermembranraum oder Matrix ist nur einer von mehreren Schritten, die zu funktionsfähigen Proteinen in der mitochondrialen Biogenese führen. So werden Proteine nach dem Import in der Regel durch Peptidasen prozessiert und durch Chaperone in ihre aktive Konformation gebracht. Häufig müssen auch noch Kofaktoren in die Proteine eingebaut werden. Die Prozessierung importierter Vorstufenproteine in der Matrix geschieht vorwiegend durch die Metallopeptidase MPP. MIP in der Matrix

und IMP im Intermembranraum sind zwei weitere mitochondriale Peptidasen, die Vorstufenproteine prozessieren [32].

Da Proteine während der Translokation über die mitochondrialen Membranen in gestreckter Konformation vorliegen, ist nach der Importreaktion eine Faltung der Proteine notwendig. Dieser Prozess wird in der Matrix ATP-abhängig durch Chaperone katalysiert. In der Matrix sind zwei Systeme maßgeblich an der Faltung importierter Proteine beteiligt, das Hsp70- und das Hsp60-Hsp10-Chaperonsystem [72, 101, 114].

Die Biosynthesewege prosthetischer Gruppen unterscheiden sich je nach Art der Kofaktoren grundlegend. Einfache metallische Kofaktoren sind über Aminosäureseitenketten koordinativ gebundene Metallionen. Bisher ist wenig verstanden, wie diese Ionen in die aktiven Zentren mitochondrialer Proteine gelangen. Einige Ionen von Metallen wie Zink oder Kupfer kommen in der lebenden Zelle nicht in freier Form vor, sondern sind durch Metallochaperone gebunden. Metallochaperone halten Metallionen in bioverfügbarer Form und können sie an Apo-Proteine abgeben [84, 86]. Beispielsweise ist das Kupfer bindende Cox17 im Intermembranraum ein solches Metallochaperon. Mutationen in diesem Gen führen zu einer unvollständigen Assemblierung der Kupfer haltigen Cytochrom c-Oxidase [36]. Eine andere Gruppe metallischer Kofaktoren sind Fe/S-Cluster, in denen Eisen über Cystein- oder Histidinseitenketten und Sulfidbrücken gebunden vorliegt. Die Assemblierung der teilweise sehr komplex aufgebauten Fe/S-Zentren erfolgt in den Mitochondrien durch ein System, an dem mindestens acht verschiedene Proteine beteiligt sind. Dieser Prozess wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und heute nimmt man an, dass Mitochondrien ihre Fe/S-Cluster nicht nur selbst synthetisieren, sondern auch für die Biosynthese cytosolischer Fe/S-Zentren zuständig sind [68, 77].

1.1 Proteinimport in Mitochondrien

1.1.1 Der TOM-Komplex

Der TOM-Komplex in der Außenmembran von Mitochondrien setzt sich in *S. cerevisiae* aus mindestens acht unterschiedlichen Membranproteinen zusammen, die nach errechnetem Molekulargewicht Tom5, Tom6, Tom7, Tom20, Tom22, Tom40, Tom70 und Tom71 benannt wurden [92]. Diese Komponenten sind für die Erkennung von Vorstufenproteinen, deren Transfer über die Außenmembran und die Insertion von Außenmembranproteinen verantwortlich.

Tom20, Tom22 und Tom70 besitzen Rezeptorfunktion und binden Proteine, die zur Translokation in die Mitochondrien bestimmt sind. Tom20 und Tom70 sind N-terminal in der Außenmembran verankert und exponieren negativ geladene Domänen ins Cytosol. Tom22 hat eine cytosolische ungeladene und eine im Intermembranraum gelegene Domäne. Im Gegensatz zu den Rezeptorkomponenten ist Tom40 gegenüber Proteasen weitgehend resistent und scheint fast vollständig in

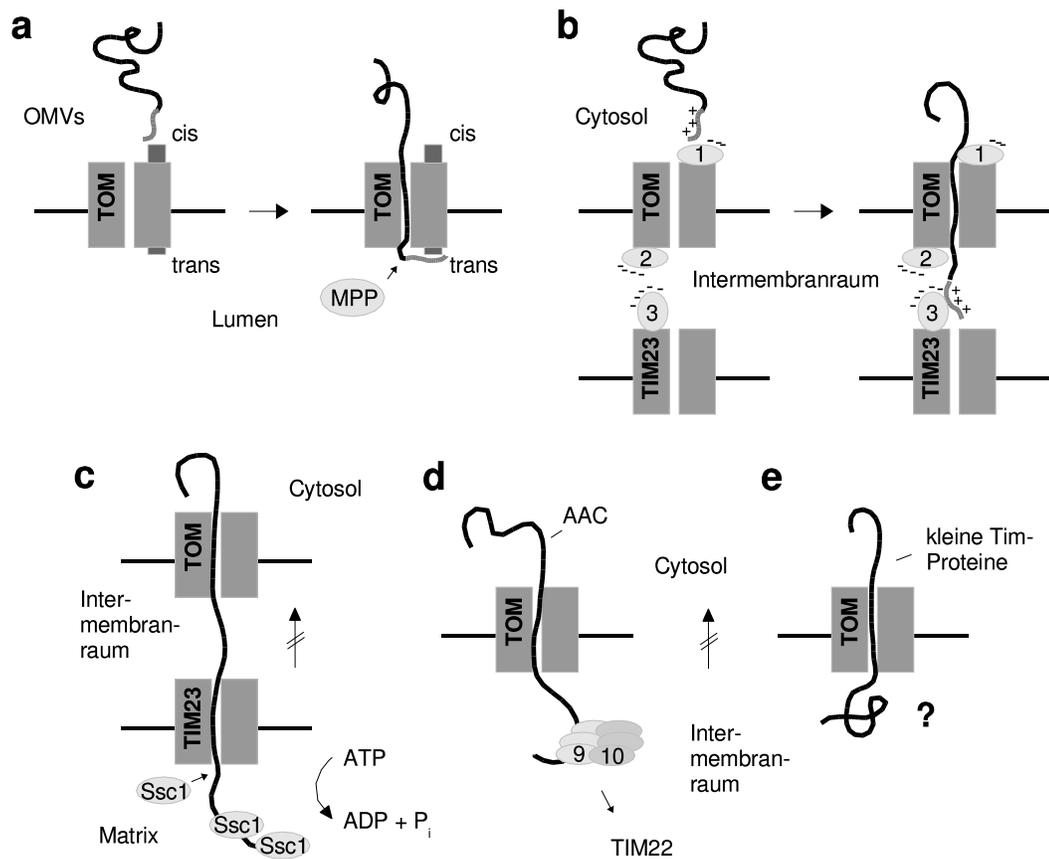


Abbildung 1.1 (a) Der TOM-Komplex genügt, um Präsequenzen (in Grau) von der *cis*- zur *trans*-Seite zu transferieren. Vorstufenproteine werden von in Außenmembranvesikeln (OMVs) eingeschlossener MPP prozessiert, falls TOM-Komplex in den Vesikeln rekonstituiert ist [75]. (b) *Acid chain*-Hypothese: positiv geladene Präsequenzen binden negativ geladene Rezeptorkomponenten. Die Affinität der Präsequenzen zu den Rezeptorkomponenten nimmt in Richtung Intermembranraum zu. 1 – Tom20 (cytosolischer Teil), 2 – Tom22 (Intermembranraumdomäne), 3 – Tim23 (Intermembranraumdomäne) [58]. (c) Erreichen Vorstufenproteine die Matrix werden sie ATP-abhängig von Ssc1-Molekülen gebunden, was ein Zurückgleiten der Polypeptidkette verhindert. Die Proteine werden nicht aktiv in die Matrix hineingezogen. Die Translokation verläuft passiv durch die Brownsche Molekularbewegung [85]. (d) Nach Überqueren der Außenmembran wird AAC vom löslichen Tim9/10-Komplex im Intermembranraum gebunden und auf TIM22 transferiert [57, 55, 1, 109, 110]. (e) Über den Import von Proteinen des Intermembranraums ist wenig bekannt [41].

der Außenmembran eingebettet zu sein [50, 6]. Die Isolierung und Charakterisierung des TOM-Komplexes aus *N. crassa* ermöglichten genaue Aussagen über dessen Struktur und die vom Komplex gebildeten Kanäle [59, 4]. Durch Abdissoziieren der weniger stark gebundenen Rezeptorkomponenten Tom20 und Tom70 vom isolierten Holo-Komplex wird der sogenannte *Core*-Komplex erhalten, der aus den Komponenten Tom40, Tom22, Tom7 und Tom5 besteht. Der Holo-Komplex hat ein Molekulargewicht von ca. 490 kDa und formt zwei durch Einzelpartikelanalyse sichtbare Poren mit ungefähren Durchmessern von je 20 nm. Diese Poren sind wahrscheinlich die Kanäle zur Proteintranslokation. Sie werden wohl maßgeblich von Tom40 geformt, da Tom40 alleine in der Lage ist Poren zu bilden. Tom40 ist außerdem die einzige essentielle Komponente des TOM-Komplexes [3].

1.1.2 Proteintranslokation über Außen- und Innenmembran

Die meisten der für den Import in Mitochondrien bestimmten Vorstufenproteine enthalten N-terminale Präsequenzen, die für die Translokation sowohl notwendig als auch hinreichend sind [43]. Diese Präsequenzen sind typischerweise zwischen 20 – 60 Aminosäurereste lang und bilden eine amphipathische α -Helix aus, die auf einer Seite positive und auf der anderen lipophile Aminosäureseitenketten trägt [121]. Nach dem Import werden die Präsequenzen in der Regel von MPP in der Matrix proteolytisch entfernt. Die Inkubation von Vorstufenproteinen mit Außenmembranvesikeln, in denen MPP eingeschlossen ist, führt zu einer Prozessierung der Proteine. Aus diesem Grund wird angenommen, dass der TOM-Komplex genügt, um Präsequenzen von der Rezeptorseite (*cis*-Seite) auf die dem Intermembranraum zugewandte Seite (*trans*-Seite) zu transferieren (s. Abbildung 1.1) [75]. Nach der so genannten *acid chain*-Hypothese binden die positiv geladenen Präsequenzen negativ geladene Rezeptorkomponenten der Importmaschine, wobei die Affinität der Sequenzen gegenüber den Komponenten von der *cis*- zur *trans*-Seite bzw. zum Intermembranraum hin zunimmt. So steigt die Affinität der Präsequenzen in Richtung Tom20 (cytosolischer Teil), Tom22 (Intermembranraumdomäne) und Tim23 (Intermembranraumdomäne) [58].

Nach Erreichen der Intermembranraumseite unterscheiden sich die Translokationswege in Abhängigkeit davon, ob die Polypeptide in die Matrix importiert oder in die Innenmembran inseriert werden. Matrixproteine interagieren im Intermembranraum mit Tim23, bevor sie dann in Abhängigkeit vom Membranpotential der Innenmembran und unter ATP-Hydrolyse vollständig über die Außen- und Innenmembran transferiert werden. Die strikte Abhängigkeit des Proteinimports in die Matrix vom Membranpotential ist nicht vollständig verstanden. Die Matrixseite der Innenmembran ist negativ und die der Intermembranraumseite positiv geladen. Zum einen mag dadurch ein elektrophoretischer Effekt die positiv geladenen Präsequenzen über die Innenmembran führen [74]. Das Membranpotential ist aber auch für die Dimerisierung von Tim23 notwendig, was wiederum für die

Erkennung der ankommenden Präsequenzen Voraussetzung ist [10].

Das ATP für die Translokation wird vom mitochondrialen Hsp70-Chaperon Ssc1 der Matrix benötigt, das die ankommende Polypeptidkette bindet und so ein Zurückgleiten des Proteins verhindert. Die Brownsche Molekularbewegung der Peptidkette und immer wieder erneute Bindung von Ssc1-Molekülen sind ausreichend, um das Protein in die Matrix zu transferieren. Die zu importierenden Proteine werden also nicht aktiv über die Translokationskomplexe in die Matrix gezogen [85, 80].

Im Intermembranraum ankommende Proteine der Innenmembran werden entweder auf den TIM23- oder TIM22-Komplex übertragen, um von dort in die Innenmembran inseriert zu werden. Proteine, die über den TIM22-Komplex in die Innenmembran inseriert werden, enthalten statt den typischen N-terminalen Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine interne Importsignale. Ein typischer Vertreter dieser Proteine ist der ATP/ADP-Transporter (AAC). Nach Erreichen des Intermembranraums wird der AAC vom löslichen 70 kDa-Komplex Tim9/10 gebunden und dann auf den TIM22-Komplex übertragen [57, 55, 1, 109, 110]. Wahrscheinlich schirmt der Tim9/10-Komplex bei diesem Prozess hydrophobe Transmembranregionen des Transporters vom wässrigen Milieu des Intermembranraums ab, um eine Aggregation des Proteins zu verhindern [117]. Dem ebenfalls löslichen und im Intermembranraum lokalisierten Tim8/13-Komplex wird eine ähnliche Bedeutung für den Import von Tim23 zugeschrieben [87].

1.1.3 Proteinimport in den Intermembranraum

Beim Proteinimport in die Matrix und in die Innenmembran wird die Polypeptidkette nach dem Erreichen der Intermembranraumseite auf dem TOM-Komplex folgende Translokationskomponenten übertragen. Die Translokation wird dann durch das Membranpotential und in den meisten Fällen durch die Hydrolyse von ATP angetrieben. Eine kleine Gruppe von Intermembranraumproteinen wird ebenfalls in Abhängigkeit vom Membranpotential und ATP importiert. Zu diesen Proteinen gehören Cytochrom b_2 , Cytochrom b_5 -Reduktase und Adenylat-Kinase. Beim Import von Cytochrom b_2 und Cytochrom b_5 -Reduktase werden im Intermembranraum die Präsequenzen der Vorstufenproteine proteolytisch abgespalten, wohingegen die Adenylat-Kinase nicht prozessiert wird [37, 20, 83].

Andere Proteine des Intermembranraums besitzen im Gegensatz zu den vorher genannten Beispielen keine für den Import charakteristischen Präsequenzen und sind relativ klein, typischerweise zwischen 7 und 16 kDa. Bisher ist nicht verstanden, was die treibende Kraft für die Translokation dieser Proteine ist. Beispiele in *S. cerevisiae* sind: Som1, Cox17, Cox19, Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, Tim13, Cyc1, Cyc7, Sod1 und Cytochrom c. Cytochrom c ist das einzige Protein dieser Klasse, dessen Import näher untersucht wurde. Es wird in seiner Apo-Form in den Intermembranraum importiert und dort durch kovalente Bindung zu Häm in seine Holo-Form überführt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Cytochrom c-

Hämlyase (CCHL) katalysiert. In Hefestämmen denen CCHL fehlt, wird eine Akkumulation von Apo-Cytochrom c im Cytosol beobachtet [25]. Cytochrom c, dem die Häm-Bindungsstelle fehlt, wird deutlich schlechter importiert als das korrespondierende Wildtypprotein [26]. Der Import von Cytochrom c in Außenmembranvesikel ist nur dann möglich, wenn im Lumen der Vesikel Antikörper gegen das Protein eingeschlossen sind [76]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass die Bindung von Apo-Cytochrom c zu CCHL für die Translokation notwendig ist und CCHL als Rezeptor der *trans*-Seite fungiert.

1.2 Biosynthese von Fe/S-Clustern

1.2.1 Fe/S-Proteine

Proteine, die Fe/S-Cluster als prosthetische Gruppe enthalten, kommen in allen lebenden Zellen vor und besitzen sehr unterschiedliche Funktionen. Man findet Fe/S-Proteine beispielsweise in Reaktionen des Elektronentransports, in Redox- und Isomerisationsreaktionen oder in der Funktion als Sensoren für Sauerstoff oder Eisen. Fe/S-Proteine finden sich in verschiedenen Zellkompartimenten. Beispiele für Fe/S-Proteine im Cytosol sind Leu1 (Isopropyl-Malat-Synthase) und Irp1 (Eisenregulatorisches Protein) und in den Mitochondrien Aco1 (Aconitase) und Bio2 (ein Protein in der Biotinsynthese). Die Strukturen und Stöchiometrien von Fe/S-Zentren sind vielfältig, wobei die Zusammensetzungen Fe_2S_2 , Fe_3S_4 und Fe_4S_4 am häufigsten sind [12]. Viele Fe/S-Cluster entstehen *in vitro* durch Inkubation von Fe/S-Proteinen in der Apo-Form mit Eisenionen und Sulfid spontan [48]. Die dazu notwendigen Ionenkonzentrationen entsprechend jedoch in keiner Weise einer *in vivo*-Situation, sodass es ein System geben muss, das die Assemblierung von Fe/S-Clustern katalysiert.

1.2.2 Komponenten der ISC-Maschinerie

Die zur Biosynthese von Fe/S-Clustern notwendigen Proteine wurden ursprünglich in Bakterien identifiziert und beschrieben. Die Gene des *iron sulfur cluster*-Operons (*isc*-Operon) von *Azotobacter vinelandii* bilden eine funktionelle Einheit zur Biosynthese von Fe/S-Zentren [128]. Die dem *isc*-Operon homologen Proteine Nfs1, Yah1, Ssq1, Jac1, Isa1/Isa2, Isu1/Isu2 und Nfu1 aus *S. cerevisiae* sind in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Diese Proteine sind für die Assemblierung von Fe/S-Clustern verantwortlich und werden ISC-Maschinerie genannt (s. Abbildung 1.2) [77].

Eine zentrale Rolle in der Fe/S-Cluster-Biosynthese nimmt Nfs1 ein, das ein Homolog zum bakteriellen NifS aus *A. vinelandii* ist. NifS ist ein Homodimer und besitzt Pyridoxalphosphat als prosthetische Gruppe. Es ist in der Lage Cystein zu desulfurieren, wobei Alanin und elementarer Schwefel entstehen [131]. Der Schwefel

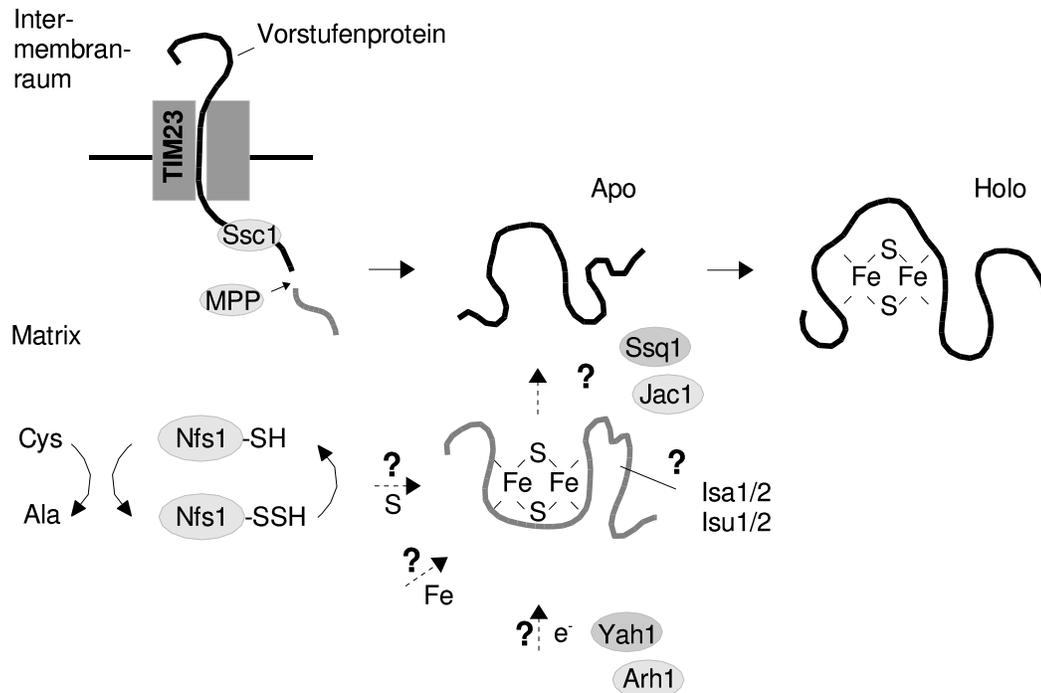


Abbildung 1.2 Import, Prozessierung und Fe/S-Insertion. Das Vorstufenprotein in der Apo-Form wird in die mitochondriale Matrix importiert und durch MPP prozessiert. Durch einen nicht vollständig verstandenen Prozess wird ein Fe/S-Cluster (hier ein Fe₂S₂-Cluster) in das Apo-Protein inseriert. Der Cluster könnte durch Isa1/2 oder Isu1/2 vorassembliert werden. Sowohl die homologen Proteine IscA und NifU aus Bakterien als auch Isu1 aus *S. pombe* sind in der Lage, einen Fe/S-Cluster zu assemblieren und auf Apo-Ferredoxin zu übertragen [21, 82, 126, 127]. Ob an der Assemblierung die beiden Chaperone Ssq1 und Jac1 beteiligt sind, ist nicht bekannt. Schwefel wird durch Desulfurierung von Cys gewonnen und in Form eines von Nfs1 gebundenen Persulfids für die Fe/S-Biosynthese zur Verfügung gestellt. Von welcher Komponente die zur Fe/S-Assemblierung notwendigen Eisenionen eingebracht werden ist nicht bekannt. Yah1 könnte zusammen mit Arh1 ein System bilden, das Elektronen zur Verfügung stellt [8, 64, 73].

wird dabei in Form eines Persulfids an eine Cysteinseitenkette von NifS gebunden und so für die Biosynthese von Fe/S-Clustern zur Verfügung gestellt [130]. *In vitro* können Apo-Proteine allein durch Inkubation mit NifS, Cystein und Eisen(II)ionen in ihre Holo-Form überführt werden [129]. Nfs1 aus *S. cerevisiae* ist in der mitochondrialen Matrix und in Spuren auch im Kern lokalisiert. In beiden Kompartimenten übt es eine essentielle Funktion aus. Die Depletion des Proteins *in vivo* führt zu stark verminderten Enzymaktivitäten von mitochondrialen und cytosolischen Fe/S-Proteinen [67, 53, 78].

Yah1 besitzt Homologie zu Adrenodoxin von Säugern. Adrenodoxine sind Fe/S-Proteine und fungieren als Elektronentransportproteine. In Säugern sind sie für die Biosynthese von Steroidhormonen notwendig. Yah1 ist essentiell und in der Matrix von Mitochondrien lokalisiert. Es gehört als kleines Fe/S-Protein zur Gruppe der Ferredoxine [8]. Yah1 ist sowohl an der Synthese von Häm als auch an der Assemblierung von Fe/S-Zentren beteiligt [9, 7]. Vermutlich stellt es dabei die zur Fe/S-Cluster-Biosynthese notwendigen Elektronen zur Verfügung [64]. Die Depletion von Yah1 führt zu stark verminderten Aktivitäten cytosolischer Fe/S-Proteine. Yah1 erhält die Elektronen wahrscheinlich von der Adrenodoxin-Reduktase Arh1, einer weiteren essentiellen Komponente der mitochondrialen Matrix.

Zwei weitere Komponenten der ISC-Maschinerie sind Ssq1 und Jac1. Ssq1 ist homolog zu Hsc66, einem Chaperon der Hsp70- oder DnaK-Familie und Jac1 ist homolog zu Hsc20, einem Chaperon der DnaJ-Familie. In den Mitochondrien von Hefe sind drei Proteine der Hsp70-Familie lokalisiert, Ssc1, Ecm10 und Ssq1. Ssc1 ist für den Import von Proteinen in die Matrix essentiell und an der Faltung sowie Degradation von Proteinen in diesem Kompartiment beteiligt [17, 46, 104, 123]. Über die Funktion von Ecm10 ist relativ wenig bekannt, es scheint in manchen Funktionen mit Ssc1 zu überlappen [11]. Ssq1 ist etwa um den Faktor 2000 weniger abundant als Ssc1 und ist auch bei Überexpression nicht in der Lage Funktionen von Ssc1 zu übernehmen [102, 120]. Im Gegensatz zu Ssq1 ist Jac1 essentiell. Hsc20 aus *E. coli* stimuliert die ATPase-Aktivität von Hsc66 und dient als Kochaperon, wie DnaJ für das bakterielle Chaperon DnaK und Hsp40 für das eukaryontische Hsp70 [118]. Da das Chaperonsystem Ssq1/Jac1 Teil der ISC-Maschinerie ist, könnte es für Proteinfaltungen während der Assemblierung von Fe/S-Clustern notwendig sein.

Isa1 und Isa2 sind zwei nicht essentielle Komponenten der ISC-Maschinerie. Die Deletion der Gene führt zu verminderten Enzymaktivitäten mitochondrialer und cytosolischer Fe/S-Proteine [47, 89, 44]. Das bakterielle IscA kann *in vitro* einen Fe/S-Cluster binden und auf Apo-Ferredoxin übertragen [21]. Die Isa-Proteine könnten so zur Präassemblierung von Fe/S-Zentren dienen.

Isu1 und Isu2 sind zur N-terminalen Domäne des bakteriellen NifU-Proteins homolog, Nfu1 zeigt Ähnlichkeiten zum C-terminalen Ende von NifU. Die Deletion beider ISU-Gene ist letal [103]. NifU und Isu1 aus *Schizosaccharomyces Pombe* sind in der Lage einen labilen Fe/S-Cluster zu assemblieren und auf Apo-

Ferredoxin zu übertragen. Die Proteine scheinen deshalb wie IscA an der Präassemblierung von Fe/S-Zentren beteiligt zu sein [82, 126, 127]. Über die Funktion von Nfu1 ist nur wenig bekannt [103].

1.2.3 Biosynthese cytosolischer Fe/S-Cluster

Die Komponenten Nfs1, Yah1, Isa1 und Isa2 der ISC-Maschinerie sind nicht nur für die Assemblierung mitochondrialer Fe/S-Zentren notwendig, sondern scheinen auch für die Bildung cytosolischer Fe/S-Proteine verantwortlich zu sein. Die Depletion der Komponenten *in vivo* resultiert in einer erniedrigten Aktivität des cytosolischen Fe/S-Proteins Leu1 und zu vermindertem Einbau von Eisen in dieses Enzym [53, 64, 47, 89]. Atm1 ist ein ABC-Transporter in der mitochondrialen Innenmembran von *S. cerevisiae* [52]. Die Deletion des ATM1-Gens führt, wie auch die Depletion von ISC-Komponenten der Matrix, zu einer erniedrigten Aktivität von Leu1 und einem verminderten Einbau von Eisen in das Enzym. Allerdings bleibt die Aktivität von Fe/S-Proteinen der Matrix durch die Deletion von ATM1 unberührt [53]. Erv1 ist ein essentielles Protein im Intermembranraum von Mitochondrien. Ein temperatursensitiver Stamm von Erv1 zeigt nach der Induktion des Phänotyps gleiche Defekte der cytosolischen Fe/S-Cluster-Biogenese wie der Deletionsstamm von Atm1 [65].

Die Notwendigkeit der ISC-Maschinerie, des Transporters Atm1 in der Innenmembran und des Proteins Erv1 im Intermembranraum von Mitochondrien für die Assemblierung cytosolischer Fe/S-Proteine legt den Schluss nahe, dass Mitochondrien eine Vorstufe – welcher Art auch immer – für die Assemblierung von Fe/S-Cluster im Cytosol zur Verfügung stellen.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Translokation mitochondrialer Intermembranraumproteine ohne N-terminale Importsequenz ist bisher wenig verstanden. Viele dieser Proteine sind klein und binden Kofaktoren. Beispiele für diese Proteingruppe sind Som1, Cox17, Cyc1, Sod1, Cytochrom c und die kleinen Tim-Proteine. Apo-Cytochrom c und die kleinen Tim-Proteine werden unabhängig von den Rezeptoren des TOM-Komplexes über die Außenmembran transferiert [76, 115, 25, 60]. Bisher ist kaum bekannt für welche Proteine dieser Gruppe der TOM-Komplex zur Translokation notwendig ist. Proteine mit N-terminalen Präsequenzen werden unter ATP-Verbrauch in die Mitochondrien importiert, außerdem ist für die Translokation ein Membranpotential notwendig. Die energetischen Voraussetzungen für den Import von Intermembranraumproteinen sind nicht bekannt. Tim13 ist ein kleines, nicht essentielles Protein und bildet zusammen mit Tim8 einen löslichen 70 kDa-Komplex im Intermembranraum. Es besitzt keine N-terminale Präsequenz und wird auch nicht prozessiert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Translokationskomponenten für den Import von Tim13 notwendig sind und was die treibende

Kraft für diesen Prozess ist.

Die beiden mitochondrialen Chaperone Ssq1 und Jac1 in *S. cerevisiae* sind homolog zu bakteriellen Proteinen, die durch das *isc*-Operon kodiert sind. Die Proteine dieses Operons besitzen vermutlich alle eine Funktion in der Fe/S-Cluster-Biosynthese. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob auch die beiden Chaperone Ssq1 und Jac1 an der Fe/S-Cluster-Assemblierung beteiligt sind.

Fast alle Daten über die Biosynthese von Fe/S-Proteinen in *S. cerevisiae* beruhen auf Aktivitätsmessungen von Fe/S-Enzymen und auf der *in vivo*-Inkorporation von ^{55}Fe in Fe/S-Proteine. Es gibt noch keine Versuchsanordnung, mit der sich die Fe/S-Cluster-Biosynthese *in organello* beobachten lässt. Mit einer solchen Anordnung könnten die zur Biosynthese von Fe/S-Proteinen notwendigen Faktoren und Bedingungen relativ einfach ermittelt werden. Es ließen sich außerdem kinetische Aussagen über die Assemblierung von Fe/S-Zentren machen. In dieser Arbeit soll ein System entwickelt werden, mit dessen Hilfe es möglich ist, die Fe/S-Cluster-Assemblierung in Mitochondrien zu messen.

Kapitel 2

Material und Methoden

Prozentuale Konzentrationsangaben sind für gelöste Feststoffe in Gewichts- und für gelöste Flüssigkeiten in Volumenprozent angegeben.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Kleine Mengen DNS wurden durch enzymatische und alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen gewonnen [13]. Dazu wurden 2 ml LB^{Amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1 ml der Kultur wurden für 20 s bei 7500 g (RT) präzipitiert und in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde für 5 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde 5 min bei 65°C alkalisch lysiert. Die Probe wurde dann mit 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat pH 4,5) neutralisiert und für 5 min auf Eis gekühlt. Ausgefällte Proteine und chromosomale DNS wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 35000 g (+4°C) abgetrennt. Zum Fällen der Plasmid-DNS wurde der Überstand mit 1 ml Ethanol versetzt und für 30 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert. Die Probe wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstands bei RT getrocknet. Die so erhaltene DNS wurde dann in 50 µl H₂O gelöst.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS wurde das Kit Jetstar (Midi-Säulen) verwendet. Ausgehend von 50 ml einer Übernachtskultur in LB^{Amp}, wurde die DNS nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet.

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* wurden als DNS-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert [99, 100]. Neben dem vom Hersteller

mitgelieferten Puffer enthielt ein typischer Reaktionsansatz von 50 μl : 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate, 1–100 ng Matrizen-DNS, 20 pmol von jedem Primer, 2,5 U *Pfu*-DNS-Polymerase und 0,25 U *Taq*-DNS-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde solange auf Eis belassen, bis der PCR-Block eine Temperatur von 94°C erreicht hatte. Die Proben wurden dann in die Maschine gestellt¹. Die PCR-Reaktionsfolge wurde 35x wiederholt und setzte sich wie folgt zusammen: Schmelzen der DNS bei 94°C für 30–60 s, Anlagerung der Oligonukleotide bei 40–65°C für 30–60 s und Synthese der DNS bei 72°C für 30–90 s. Meist wurden die ersten 5 Zyklen bei einer um 5°C niedrigeren Anlagerungstemperatur durchgeführt. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 10minütigen Nachinkubation die DNS-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNS-Fragmente wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert.

2.1.3 Klonierung von DNS-Fragmenten

2.1.3.1 Restriktionsverdau

DNS wurde durch Endonucleasen in den vom Hersteller mitgelieferten und empfohlenen Puffer geschnitten. Für 1 μg DNS wurden ca. 2 U Enzym eingesetzt, es wurde 90 min oder über Nacht bei 37°C verdaut. Die Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten wurde direkt im Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden der Reaktion ca. 0,2 U SAP pro μg DNS zugegeben.

2.1.3.2 Ligation

Zur Ligation eines DNS-Fragments mit einem linearisierten Vektor wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 benutzt. Die Ligationen wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Endvolumen von 20 μl durchgeführt. Dazu wurden 50–200 ng DNS des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNS-Fragment gemischt und mit 400 U T4-Ligase für 1 h bei RT inkubiert.

2.1.3.3 Zwischenklonierung

Um den vollständigen Verdau eines DNS-Fragments zu gewährleisten, wurde das durch PCR amplifizierte Fragment in den Vektor pCR-TOPO oder pGEM-T zwischenkloniert. Die Ligation des Fragments in den Vektor erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 α transformiert. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNS präpariert, aus der das DNS-Fragment mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten wurde.

¹Für Reaktionen mit zwei überlappenden DNS-Fragmenten als Matrize wurden vor Zugabe der Polymerasen 5 Reaktionszyklen ohne Enzym durchgeführt. Die Enzyme wurden dann in einer 94°C-Phase zugegeben.

2.1.3.4 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Um elektrokompente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 g (+4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen sukzessive in 400, 200 und 4 ml kaltem 10%igem Glycerol (mit bidestilliertem H₂O angesetzt) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe in 400 µl 10%iger Glycerollösung resuspendiert und in 45 µl-Portionen bei -80°C weggefroren.

2.1.3.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde durch Elektroporation durchgeführt [23]. Dazu wurde 1 µl Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45 µl kompetenten Zellen gemischt. Von diesem Ansatz wurden 40 µl in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann einem Stromstoß (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor sie dann auf einer LB-Platte ausgestrichen wurden.

2.1.4 Reinigung und Analyse von DNS

2.1.4.1 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Analyse von DNS wurden horizontale Agarosegele mit einem Bettvolumen von 30–100 ml und einem Taschenvolumen von 20–120 µl eingesetzt. Je nach Größe der DNS-Fragmente wurde eine 0,8–3%ige Agaroselösung in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,5) zum Gießen der Gele verwendet. Die Agaroselösung wurde vorher auf eine Ethidiumbromidkonzentration von ca. 0,5 µg/ml eingestellt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Auftragspuffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und aufgetragen. Falls die Proben störende Mengen an RNS enthielten, wurde ein 5x Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml RNase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 13 V/cm durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht.

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mit dem Kit QIAquick nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

2.1.4.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNS-Proben wurde durch Messung der Extinktion gegen H₂O bei 260 und 280 nm (E₂₆₀ und E₂₈₀) bestimmt. Eine Extinktionsänderung

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>
pCyb ₂ (1–167)DHFR [95]	Fusion aus <i>CYB2</i> (AS 1–167) und DHFR in pGEM-4
pET3a-NFS1(34–497)-His ₆	<i>NFS1</i> ohne N-Terminus (AS 34–497) mit C-terminalen Hexahistidinrest in pET-3a
pET3a-YAH1-His ₆	<i>YAH1</i> in pET-3a mit C-terminalen Hexahistidinrest
pETGEXCT-JAC1(120–184)	C-Terminus von <i>JAC1</i> (AS 121–184) in pETGEXCT
pETGEXCT-SSQ1(548–657)	C-Terminus von <i>SSQ1</i> (AS 549–657) in pETGEXCT
pGEM4-JAC1 [71]	<i>JAC1</i> in pGEM-4
pGEM4-TIM13 [M. Endres]	<i>TIM13</i> in pGEM-4
pGEM4-TIM13(CXS)	<i>TIM13</i> -Konstrukte in pGEM-4 mit Cys-zu-Ser-Mutationen in Positionen X=57,61,73,77; X=57,61; X=73,77; X=57 oder X=73
pGEM3-YAH1	<i>YAH1</i> in pGEM-3
pMALcRI-TIM13	<i>TIM13</i> in pMAL-cRI
pMALcRI-TIM13 (C57,61,73,77S)	<i>TIM13</i> in pMAL-cRI mit Cys-zu-Ser-Mutationen in Positionen 57, 61, 73, 77
pOXA1p [42]	<i>OXA1</i> in pGEM-3
pSu9(1-69)DHFR [93]	Fusion aus der Präsequenz von Untereinheit 9 der F ₀ -ATPase aus <i>N. crassa</i> (AS 1–69) und DHFR in pGEM-4

Tabelle 2.1 Verwendete Plasmide

von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger bzw. 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ einzelsträngiger DNS. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.5 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das entsprechende DNS-Fragment in den Vektor pGEM-3 oder pGEM-4 kloniert. Zur Expression von Proteinen in *E. coli* wurden folgende Vektoren verwendet: pETGEXCT für die Expression von N-terminalen GST-Fusionsproteinen [106], pMAL-cRI für die Konstruktionen von N-terminalen MBP-Fusionsproteinen und pET-3a. In Tabelle 2.1 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Kurzbeschreibungen aufgeführt. Die Klonierungsstrategien sind im Unterkapitel 2.1.6 beschrieben.

2.1.6 Klonierungsstrategien

Klonierung von pET3a-NFS1(34–497)-His₆ Das Fragment von Position 100–1494 der kodierenden Sequenz des *NFS1*-Gens wurde mittels PCR mit den Primern TOMP08 (5') und TOMP10 (3') aus genomischer DNS amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *BamHI* in den Vektor pET-3a kloniert. Der 3'-Primer enthielt außerdem die kodierende Sequenz für 6 C-terminale Histidine.

TOMP08 5'- GGG CAT ATG TAT TCC CCT CCT GCA GCA GG-3'

TOMP10 5'- GGG GGA TCC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC
TGA CCA TTT GAT G-3'

Klonierung von pET3a-YAH1-His₆ Die kodierende Sequenz von *YAH1* wurde mittels PCR mit den Primern TOMP04 (5') und TOMP05 (3') aus genomischer DNS amplifiziert und über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *BamHI* in den Vektor pET-3a kloniert. Der 3'-Primer enthielt außerdem die kodierende Sequenz für 6 C-terminale Histidine.

TOMP04 5'- GGG CAT ATG CTG AAA ATT GTT AC-3'

TOMP05 5'- GGG GGA TCC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CCA TGG
ACT AAA ATC GTT G-3'

Klonierung von pETGEXCT-JAC1(121–184) Das Fragment von Position 361–555 der kodierenden Sequenz des *JAC1*-Gens wurde mittels PCR mit den Primern TL04 (3') und TL05 (5') aus genomischer DNS amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *BglI* bzw. *BamHI* in den Vektor pETGEXCT kloniert.

TL04 5'- GAA GCT GGT GTG AAG C-3'

TL05 5'- GGG GGA TCC TTA GTG ATT CAT TTC C-3'

Klonierung von pETGEXCT-SSQ1(549–657) Das Fragment von Position 1645–1974 der kodierenden Sequenz des *SSQ1*-Gens wurde mittels PCR mit den Primern TL06 (3') und TL07 (5') aus genomischer DNS amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *BglI* bzw. *BamHI* in den Vektor pETGEXCT kloniert.

TL06 5'- GGG AGA TCT GCA AAA CTT ATT GAA G-3'

TL07 5'- GGG GGA TCC TTA TTT ACC TTG ATT C-3'

Klonierung von pGEM4-TIM13(CXS) Um Cys-zu-Ser-Punktmutationen in das *TIM13*-Gen einzuführen wurden Primer verwendet, die am entsprechenden Codon Basenaustausche trugen. Zuerst wurde das *TIM13*-Gen als zwei überlappende Fragmente amplifiziert, indem zwei PCR-Reaktionen auf pGEM4-TIM13 durchgeführt wurden. Dabei wurde für das 1. Fragment ein SP6-Primer als 5'-Primer verwendet und TOMP18, TOMP35 oder TOMP40 als 3'-Primer. Für das 2. Fragment wurde TOMP17, TOMP34 oder TOMP41 als 5'-Primer verwendet und ein T7-Primer als 3'-Primer. Die DNS-Fragmente wurden über ein präparatives Agarosegel gereinigt und in einer 3. PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt. Aus dieser PCR-Reaktion resultierte mit dem Primerpaar SP6/T7 das Volllängen-*TIM13* mit Cys-zu-Ser-Mutationen und *Bam*HI/*Hind*III-Schnittstellen aus der Plasmid-Matrize. Über diese Restriktionsschnittstellen wurde das DNS-Fragment in den Vektor pGEM-4 kloniert.

Für die einzelnen Konstrukte wurden für PCR-Reaktion 1 bzw. 2, neben SP6 bzw. T7, folgende Primer verwendet: TOMP18/17 für pGEM4-TIM13(C57,61,73,77S), TOMP18/34 für pGEM4-TIM13(C57,61S), TOMP35/17 für pGEM4-TIM13(C73,77S), TOMP40/43 für pGEM4-TIM13(C57S) und TOMP35/41 für pGEM4-Tim13(C73S).

TOMP17 5'- CTT CGC CAT ACG CTA CCA GAA ACG ATG CGT CCA TTG
ACC AGT CTT TGG CTA AAT ATA TGA G-3'

TOMP18 5'- CGC ATC GTT TCT GGT AGC GTA TGG CGA AGT TAA GGA
TTT TTC AAA GGA GTT CTC AGA AAT TTT GTT C-3'

TOMP34 5'- CTT CGC CAT ACG CTA CCA GAA ACG-3'

TOMP35 5'- CGC ATC GTT TCT GGT AGC GTA TGG-5'

TOMP40 5'- CGC ATC GTT TCT GGT AGC GTA TGG CGA AGT TAA GCA
TTT TTC AAA GGA GTT CTC AGA AAT TTT GTT C-3'

TOMP41 5'- CTT CGC CAT ACG CTA CCA GAA ACG ATG CGT CCA TTG
ACC AGT GTT TGG CTA AAT ATA TGA G-3'

Klonierung von pGEM3-YAH1 Die kodierende Sequenz von *YAH1* wurde mittels PCR mit den Primern TOMP01 (5') und TOMP02 (3') aus genomischer DNS amplifiziert und über die in das Primerpaar eingebauten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI bzw. *Eco*RI in den Vektor pGEM-3 kloniert.

TOMP01 5'- GGG GGA TCC ATG CTG AAA ATT GTT ACT CGG-3'

TOMP02 5'- GGG GAA TTC TTA ACT AAA ATC GTT GTT ATT AAC-3'

Klonierung von pMALcRI-TIM13 und pMALcRI-TIM13(C57,61,73,77S) Zur Klonierung von pMALcRI-TIM13 und pMALcRI-TIM13(C57,61,73,77S) wurden die entsprechenden DNS-Fragmente mit *Bam*HI und *Hind*III aus pGEM4-TIM13 bzw. pGEM-TIM13(C57,61,73,77S) herausgeschnitten und in den Vektor pMAL-cRI kloniert.

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
BY4742 (Δ <i>ssq1</i>) Δ <i>coxIV</i> [39]	α <i>his3D1 leu2D0 lys2D0 ura3D0 ssq1::kanMX4</i> α <i>ade2 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 coxIV::TRP1</i>
FKEN015-01A(AL) (Δ <i>yfh1</i>)	α <i>ura3-52 his3D200 leu2D1 LYS2 TRP1 yfh1::kanMX4</i>
GAL-NFS1 [53]	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
GAL-JAC1 [71]	α <i>ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
mdj1-5 [124]	<i>leu2 trp1 ade2 can1 his3 ura3 mdj1::HIS3</i>
PK83 (<i>ssc1-3</i>) [33]	α <i>his4-713 leu2-3,112 lys2 Δtrp1 ura3-52 ssc1-3(L_{EU2})</i>
Δ <i>tim8</i> / Δ <i>tim13</i> [87]	<i>MB2 tim8::HIS3 tim13::URA3</i>
W303-1A	a <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
YPH499 [107]	a <i>ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
YPH500 [107]	α <i>ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
YPH501 [107]	a / α <i>ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i> / <i>ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
YGS101 (Δ <i>yta10</i>) [5]	a <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 yta10::HIS3-MX6</i>

Tabelle 2.2 Verwendete Hefestämme

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Dieser Stamm ist für alle Vektoren auf der Basis von pUC oder pBR322 geeignet. Außerdem enthält er einen Φ *lac2* Δ M15-Marker der für Vektoren auf Basis von pUC eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht.

In die Vektoren pET-3a und pETGEXCT klonierte Gene wurden im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS exprimiert, für den Vektor pMAL-cRI wurden BL21-(DE3)-Zellen verwendet. Diese Stämme besitzen eine chromosomale Kopie des IPTG-induzierbaren T7RNS-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und sind deshalb zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors geeignet. Die Zellen sind außerdem in den *E. coli*-Proteasen *Lon* und *OmpT* defizient. Der BL21(DE3)pLysS-Stamm besitzt eine Cam-Resistenz.

2.2.2 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

In Tabelle 2.2 sind alle in der Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* mit Referenz und Genotypen aufgelistet.

2.2.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefe erfolgte unter Schütteln bei 30°C in Lactat- oder YPGal-Medium. Hefen aus einer Glycerol-Stammkultur wurden auf einer YPD-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach 2–3 Tagen wurden von dieser Platte 20 ml Medium² angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde durch Passagieren mindestens für 2 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 1,2 bis 1,8 geerntet.

Um Glycerol-Stammkulturen herzustellen, wurden mit einer Impföse Hefezellen von einer Agarplatte in 1 ml 15%iges Glycerol überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Elektrophoretische Methoden

2.3.1.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine mit einem Molekulargewicht über 15 kDa wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt [62]. Je nach Proteinmenge und Anforderung an die Auflösung wurden dazu Gelsysteme mit Laufstrecken zwischen 7 und 13 cm und Schichtdicken zwischen 0,75 und 1,0 mm verwendet. Die Volumina der Geltaschen lagen zwischen 20 und 50 μ l. Die Gelmischung enthielt folgende Endkonzentrationen für das Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,03 oder 0,1% Bisacrylamid, 0,1% SDS, 60 mM Tris/HCl pH 6,8 und für das Trenngel: 16% Acrylamid, 0,1 oder 0,3% Bisacrylamid, 400 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS. Die Polymerisation wurde mit Zugabe von Temed (0,1% Endkonzentration) und APS (0,05% Endkonzentration) gestartet. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25–35 mA mit 380 mM Glycin, 0,1% SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,3 als Laufpuffer durchgeführt. Zu jedem Lauf wurden Proteinstandardlösungen aufgetragen.

²Für das Animpfen von Hefekulturen wurde auch YPD-Medium verwendet, um ein schnelles Anwachsen der Zellen zu erreichen. Die Kultur wurde dann auf Lactat- oder YPGal-Medium passagiert.

2.3.1.2 Harnstoff-Gelelektrophorese

Um eine bessere Auflösung von kleinen Proteinen (unter 15 kDa) zu erreichen, wurden Proteine durch Harnstoff-Gelelektrophorese getrennt. Dabei wurden die gleichen Gelsysteme wie unter 2.3.1.1 verwendet. Die Gelmischung enthielt folgende Endkonzentrationen für das Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,06% Bisacrylamid, 33% Harnstoff, 0,1% SDS, 120 mM Tris/HCl pH 6,8 und für das Trenngel: 18% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid, 33% Harnstoff, 0,1% SDS, 700 mM Tris/HCl pH 8,8. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Temed (0,05% Endkonzentration) und APS (0,05 bzw. 0,1% Endkonzentration) gestartet. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS verwendet. Die Elektrophorese wurde sonst wie unter 2.3.1.1 beschrieben durchgeführt.

2.3.1.3 Native Gelelektrophorese von Yah1

Zur Auftrennung der Apo- und Holo-Form von Yah1 wurde die Gelelektrophorese wie folgt durchgeführt: Konzentrationen der Komponenten in Sammel- und Trenngel weitgehend wie unter 2.3.1.1. Allerdings wurden im Trenngel 20% Acrylamid und 0,17% Bisacrylamid verwendet. Den Gelen und dem Laufpuffer wurde kein SDS zugesetzt. Um eine Oxidation der Cysteine in Yah1 zu vermeiden, wurde der Kathodenpuffer auf 1 mM Thioglykolsäure eingestellt. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA und +4°C durchgeführt.

2.3.1.4 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel 30–90 min in Färbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie-Blau) geschwenkt, anschließend mit H₂O gespült und in 30% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt.

Das Gel wurde entweder zwischen zwei befeuchtete Zellophanfolien gespannt und bei RT getrocknet, oder auf ein befeuchtetes Whatman-Papier gelegt und im Geltrockner getrocknet. Um den nach nativer Gelelektrophorese ³⁵S-markierten Fe/S-Cluster in Holo-Yah1 zu detektieren, wurde das Gel nicht gefärbt, sondern für 30 min in 40% Methanol, 10 mM Tris/HCl pH 8,0 geschüttelt und dann im Geltrockner getrocknet.

2.3.1.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Halbtrocken-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert [61, 116]. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je zwei Whatman-Papiere in eine Blotkammer geklemmt wurde. Gel, Nitrozellulose-Membran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt (0,02% SDS, 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol). Der Transfer der Proteine erfolgte für 75 oder

90 min zwischen zwei 15 x 15 cm großen Graphitelektroden bei 200 mA. Die Proteine wurden dann durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau-Lösung (0,2% Ponceau in 3% TCA) und anschließendem Entfärben in H₂O visualisiert.

2.3.2 Autoradiographie und Densitometrie

Um radioaktiv markierte Proteine zu visualisieren und quantifizieren, wurde auf das getrocknete Gel oder die Nitrozellulose-Membran ein Röntgenfilm gelegt und exponiert. Die nach der Entwicklung des Films sichtbaren Banden wurden mit einem Flachbrettscanner eingelesen und densitometrisch mit dem Programm Tina bestimmt.

2.3.3 Synthese von ³⁵S-markierten Proteinen *in vitro*

Um ³⁵S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM-3 oder pGEM-4 klonierte Gene mit Hilfe der SP6-RNS-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysate in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert [88]. Der Transkriptionsansatz enthielt folgende Endkonzentrationen: 4,5 mM Magnesiumacetat, 1,5 mM Spermidin, 75 µg/ml BSA, 7,5 mM DTT, 375 µM ATP, CTP und UTP, 75 µM GTP, 40 µM m⁷G(5')ppp(5')G, ca. 1,5 U/µl RNasin, 0,4 U/µl SP6-RNS-Polymerase, 30 mM Hepes/KOH pH 7,4. In einem 50 µl-Ansatz wurden 15 µl Plasmidlösung eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol, wurde die RNS für 15 min bei -20°C belassen und anschließend für 30 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des Überstands bei RT getrocknet. Die mRNS wurde dann in 30 µl H₂O mit ca. 0,75 U/µl RNasin aufgenommen.

Die Translation in Gegenwart von ³⁵S-Methionin wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysate mit der oben gewonnenen mRNS nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde auch simultane *in vitro*-Transkription/Translation in TNT-Lysate nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100000 g (+4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ weggefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte entweder nach der Methode von Bradford [14] mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers³ oder durch Messung der Extinktion bei 280 nm in 6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM Phosphat pH 6,5 [35]. Für letzteres wurden 500 µl Probe über Nacht bei RT

³Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit IgG erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei IgG-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml gemessen.

gegen 500 ml 6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM Phosphat pH 6,5 dialysiert und zur Messung eingesetzt. Der molare Extinktionskoeffizient des Proteins wurde nach folgender Formel berechnet: $\epsilon_{M,Gdn-HCl} = a\epsilon_{M,Tyr} + b\epsilon_{M,Trp} + c\epsilon_{M,Cys}$ mit a, b, c als der Anzahl von Tyr-, Trp- bzw. Cys-Resten und ϵ den entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten⁴. Der Extinktionskoeffizient wurde für MBP-Tim13 als $74730 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für MBP-Tim13(C57,61,73,77S) als $74250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet.

2.3.5 Fällung von Proteinen durch TCA

Um Proteine denaturierend zu fällen, wurde die Proteinlösung auf 12% TCA eingestellt. Die Probe wurde für 30 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und auf das Präzipitat 1 ml Aceton gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Aceton verworfen und das Präzipitat für 10 min bei RT getrocknet. Die Proteine wurden durch Zugabe von Laemmli-Puffer und kurzes Aufkochen gelöst.

2.3.6 Überexpression und Reinigung von Proteinen

Um Proteine im mg-Maßstab zu isolieren, wurden sie als GST- oder MBP-Fusionsproteine bzw. mit C-terminalen Hexahistidinrest rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe von GSH-Sepharose, Amylose bzw. Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Dazu wurde LB^{Amp} bzw. LB^{Amp/Cam}-Medium 1:200 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis auf eine OD₅₇₈ von 0,8 wachsen gelassen. Um die Überexpression zu induzieren, wurde die Kultur auf 0,5 mM IPTG eingestellt und für weitere 3 h inkubiert⁵. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 g (+4°C) geerntet und wie folgt aufgearbeitet.

2.3.6.1 Reinigung von Ssq1 und Jac1

Ssq1 (AS 549–657) und Jac1 (AS 121–184) wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine exprimiert und mit Hilfe von GSH-Sepharose gereinigt. Zellen aus 50 ml Kultur wurden in 1 ml STE resuspendiert und bei -20°C weggefroren. Zur Aufreinigung wurde die Suspension auf Eis aufgetaut und in 12 ml PBS mit 0,2 mg/ml Lysozym und 0,2 mg/ml DNase aufgenommen. Die Probe wurde 30 min bei +4°C getaumelt und dann für 20 min bei 30000 g (+4°C) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 80 μl 50%ige GSH-Sepharose (in Lysepuffer gewaschen) gegeben. Die Suspension wurde zur Proteinbindung 30 min bei +4°C getaumelt und dann für 2 min bei 1500 g (+4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die GSH-Sepharose 3x mit je 3 ml PBS gewaschen. Das Protein wurde durch

⁴ $\epsilon_{M,Tyr} = 1280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}, \epsilon_{M,Trp} = 5690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}, \epsilon_{M,Cys} = 120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

⁵Bei der Überexpression von Tim13 und Tim13(C57,61,73,77S) wurde die Kultur an dieser Stelle auf 100 μM Zinkacetat eingestellt.

kurzes Aufkochen der GSH-Sepharose in 200 μ l 1% SDS eluiert und bei -20°C gelagert.

2.3.6.2 Reinigung von Tim13

Tim13 und Tim13(C57,61,73,77S) wurden als C-terminale MBP-Fusionsproteine exprimiert und mit Hilfe von Amylose gereinigt. Zellen aus 100 ml Kultur wurden in 2,5 ml Bindungspuffer (200 mM Natriumchlorid, 10 mM β -Mercaptoethanol, 200 μ M Zinkacetat optional, 20 mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert und bei -20°C weggefroren. Zur Aufreinigung wurde die Suspension auf Eis aufgetaut, in 15 ml Bindungspuffer mit 0,2 mg/ml Lysozym und 0,2 mg/ml DNase aufgenommen und für 40 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ getaumelt. Das Lysat wurde für 20 min bei 30000 g ($+4^{\circ}\text{C}$) zentrifugiert, zum Überstand wurden dann 2 ml 50%ige Amylose gegeben. Zur Proteinbindung wurde die Suspension 3 h getaumelt und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde 6x mit je 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Das Protein wurde mit 2x je 1,5 ml Bindungspuffer mit 10 mM Maltose eluiert, in flüssigem N_2 weggefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.6.3 Reinigung von Yah1 und Nfs1

Yah1 und Nfs1 (AS 34–497) wurden mit C-terminalen Hexahistidinrest exprimiert und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Zellen aus 200 ml Kultur wurden bei -20°C weggefroren. Zur Aufreinigung wurden *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, in 20 ml Lysepuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M Natriumphosphat, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,01 M Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und für 30 min bei RT getaumelt. Das Lysat wurde für 20 min bei 30000 g (RT) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 3 ml 50%ige Ni-NTA-Agarose (in Lysepuffer gewaschen) gegeben. Die Suspension wurde zur Proteinbindung für 30 min bei RT getaumelt und dann in eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde 2x mit je 8 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M Natriumphosphat, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,01 M Tris/HCl pH 6,3 gewaschen, bevor 3x mit je 1 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M Natriumphosphat, 10 mM β -Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol, 0,01 M Tris/HCl pH 6,3 eluiert wurde. Die Proteinlösung wurde bei -20°C weggefroren und gelagert.

2.3.7 Derivatisierung von Proteinen

2.3.7.1 Derivatisierung mit AMS

Um das Gesamtprotein von Hefezellen mit AMS zu derivatisieren, wurden wie unter 2.4.1 beschrieben Sphäroplasten isoliert. Die Sphäroplasten wurden in 1 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 resuspendiert, in flüssigem N_2 weggefroren und bei -80°C gelagert. Zur Modifizierung wurden Sphäroplasten auf Eis aufgetaut, 100 μ g wurden dann in 70 μ l Derivatisierungspuffer (30 mM AMS, 0,1% TX100, 60 mM Hepes/KOH pH 7.4) gegeben. Die Proben wurden für 2 min in ein

Ultraschallbad gehalten und für 2 h in Dunkelheit bei RT belassen. Die Proteine wurden dann TCA-gefällt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Um die Reaktion unter Ausschluss von O₂ durchzuführen, wurde der Derivatisierungspuffer für 10 min mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast und dann 2 min mit N₂ durchblasen. Dieser Vorgang wurde 3x durchgeführt, bevor die Sphäroplastraten zugegeben wurde. Die Derivatisierung erfolgte wie oben beschrieben, jedoch unter einer N₂-Atmosphäre.

2.3.7.2 Derivatisierung mit NEM

Um durch *in vitro*-Transkription/Translation gewonnene Proteine mit NEM zu derivatisieren wurden 1–3 μ l Retikulozytenlysat in 2 mM NEM, 40 mM Hepes/KOH pH 7,4 (Endvolumen 20 μ l) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis belassen und dann auf 20 mM DTT eingestellt, um die Reaktion zu stoppen.

2.3.8 Proteinfaltungsexperimente mit Tim13

Um proteaseresistente gefaltete Domänen in Tim13 aufzuzeigen, wurde endogenes und rekombinantes Tim13 mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen behandelt. Für ein Experiment mit endogenem Tim13 wurden 5 μ l (50 μ g) Mitochondrien 1:10 verdünnt, um folgende Endkonzentrationen zu erhalten: 2 mM DTT, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4. Die Mitochondrien wurden für 30 min auf Eis belassen und anschließend 10 min bei 35000 g (+4°C) zentrifugiert, um die Mitoplasten abzutrennen. Der Überstand wurde mit dem obigen Puffer 1:6 verdünnt, auf die angegebenen Trypsinkonzentrationen eingestellt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden dann mit TCA gefällt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zur Proteasebehandlung von MBP-Tim13 oder MBP-Tim13(C57,61,73,77S) wurden 0,2 μ g des Proteins in 20 μ l 10 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM o-Phe (optional), 0,5 mM TPEN (optional), 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 und den angegebenen Trypsinkonzentrationen 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 μ g STI gestoppt. Die Proteine wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode [34]. Durch Zentrifugation für 5 min bei 2800 g (RT) wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurden sie in H₂O gewaschen, in 2 ml pro g Feuchtgewicht 100 mM Tris, 10 mM DTT resuspendiert und für 10 min

bei 30°C in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 2000 g, +4°C), die Zellen wurden in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g Feuchtgewicht in 6,7 ml 1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase, 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Zum Verdau der Zellwand wurde die Suspension 40–55 min bei 30°C in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 1100 g (+4°C) geerntet und pro g Feuchtgewicht in 6,7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen wurden durch 10 Stöße aufgebrochen. Der Zellaufschluss wurde nochmal mit 6,7 ml Homogenisierungspuffer pro g Feuchtgewicht versetzt und dann für 5 min bei 2000 g (+4°C) zentrifugiert, um noch intakte Zellen, Zellkerne und Membranen abzutrennen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor die Suspension für 12 min bei 17000 g (+4°C) zentrifugiert wurde, um die Mitochondrien abzutrennen. Das Präzipitat wurde in 10 ml SEH (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 80 mM Hepes/KOH pH 7,4) resuspendiert und für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation des Überstands für 12 min bei 17000 g (+4°C) präzipitiert und in 0,5–1,5 ml SEH aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Anschließend wurde mit SEH eingestellt, um eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml zu erhalten. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ weggefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.2 Import von Proteinen in Mitochondrien

Importexperimente von Proteinen in Mitochondrien wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 3% BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM Manganchlorid, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4. Bei Experimenten mit Tim13 wurde ein Importpuffer ohne Magnesiumacetat, EDTA und Manganchlorid verwendet. Alle Importreaktionen wurden in Anwesenheit von 2 mM ATP und NADH durchgeführt. Für eine typische Importreaktion wurden 25–75 µg Mitochondrien mit 0,5–1,5 µl Retikulozytenlysat bei 25°C für 10–30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1:10-Verdünnung in kaltem SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) gestoppt. Zum Öffnen der äußeren Mitochondrienmembran durch hypotonisches Schwellen wurde der Reaktionsansatz in 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 1:10 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um zugängliche Proteine zu verdauen, wurde die Protease PK oder Trypsin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Der Verdau wurde 20–30 min durchgeführt und mit Zugabe von PMSF bzw. STI gestoppt. Die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 25000 g (+4°C) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mitochondrien in SH/KCl (0,6 M Sorbitol, 80 mM Kaliumchlorid, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) resuspendiert und erneut präzipitiert. Die Mitochondrien wurden dann in

Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels Gelelektrophorese getrennt.

Zur Auftrennung der Apo- und Holo-Form von Yah1 wurden die Mitochondrien nicht in Laemmli-Puffer sondern in 0,5% TX100, 10% Glycerol, 5 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8 aufgenommen und für 10 min bei +4°C geschüttelt. Die Probe wurde 20 min bei 100000 g (+4°C) zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt.

Für den Import von rekombinant gewonnenem Yah1 oder pSu9(1-69)-DHFR in isolierte Mitochondrien wurde ein ATP-regenerierendes System angewandt. Dazu wurden der Importansatz auf 2,5 mM Malat, 2,5 mM Succinat, 5 mM CP und 35 U/ml CK eingestellt und vor der Importreaktion 5 min bei 25°C inkubiert. Um rekombinantes Tim13 zu importieren, wurde gereinigtes MBP-Tim13 mit Faktor Xa geschnitten (nach Angaben des Herstellers) und gegen 6 M Guanidiniumchlorid, 10 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Phosphat pH 6,5 dialysiert. Das so denaturierte Protein wurde für die Importreaktion eingesetzt.

Um Mitochondrien in ATP zu depletieren, wurden die Mitochondrien vor Zugabe der Proteine für 10 min bei 25°C mit 25 U/ml Apyrase inkubiert, anschließend 5 min auf Eis gestellt und für die Importreaktion verwendet.

2.4.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Um Enzymaktivitäten zu messen, wurden Ansätze gewählt, in denen der Substratumsatz photometrisch bestimmt werden konnte. Zur Bestimmung wurden Mitochondrien in 0,5% TX100, 50 mM Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert und für 5 min bei +4°C geschüttelt. Von diesem Lysat wurde in den Messungen ein solches Volumen eingesetzt, um Extinktionsänderungen von 0,015–0,060 pro min zu erhalten. Anhand dieser Extinktionsänderungen wurden mit dem Lambert-Beerschem Gesetz die Enzymaktivitäten berechnet.

2.4.3.1 Bestimmung der LDH-Aktivität

Die LDH-Aktivität wurde durch die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat bestimmt. Bei dieser Reaktion wird NADH zu NAD^+ umgesetzt, was photometrisch bei 340 nm bestimmt werden kann. Die Messung wurde bei 25°C in einem Volumen von 1000 μl und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 0,33 mM Pyruvat, 0,17 mM NADH, 100 mM TRAP pH 7,6. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3.2 Bestimmung der MDH-Aktivität

MDH katalysiert die Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Bei der Umsetzung fungiert NAD^+ als Elektronenakzeptor, wodurch NADH entsteht. Das NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden [29]. Die Messung wurde bei 30°C in einem Volumen von 1000 μl und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt:

85 mM Malat, 2,44 mM NAD^+ , Glycin/NaOH pH 10,0. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3.3 Bestimmung der SDH-Aktivität

SDH katalysiert die Umsetzung von Succinat zu Fumarat. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden *in vivo* auf FAD übertragen. In einem *in vitro*-System können die Elektronen auch über PMS auf den Farbstoff DCPIP übertragen werden. Da DCPIP in seiner reduzierten Form nicht mehr absorbiert, kann so die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bestimmt werden [96]. Die Messung wurde bei 23°C in einem Volumen von 1000 μl und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 20 mM Succinat, 70 μM DCPIP, 0,39 mM PMS, 1 mM Natriumcyanid, 0,1 mM EDTA, 0,1% TX100, Tris/ H_2SO_4 pH 7,4. Der Extinktionskoeffizient von DCPIP bei 600 nm beträgt $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3.4 Bestimmung der Aconitase-Aktivität

Aconitase katalysiert die Umsetzung von Aconitat zu Isocitrat, was photometrisch bei 240 nm erfasst werden kann. Die Bestimmung wurde bei 24°C in einem Volumen von 500 μl und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 2 mM cis-Aconitat, 100 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris/HCl pH 7,4. Der Extinktionskoeffizient von Aconitat bei 240 nm beträgt $4,88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung von Antiserum wurde ein Kaninchen mit rekombinant gewonnenem Protein immunisiert. Aus dem Kaninchenblut wurde dann das Serum gewonnen. Für die Erstinjektion wurden 200 μg Protein in einem Volumen von 250 μl 1:1 mit TiterMax versetzt und 3 min auf dem Vortex gemischt. Die Emulsion wurde in 3 Portionen subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen folgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax Freundesches Adjuvans verwendet wurde. 10–12 Tage nach jeder Injektion, außer der Erstinjektion, wurde dem Kaninchen 10–30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation gewonnen (5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 20000 g). Anschließend wurde der Überstand 20 min auf 56°C erhitzt, bei -20°C weggefroren und gelagert.

2.5.2 Verwendete Antikörper

Alle gegen Proteine von *S. cerevisiae* verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der His₆-Antikörper wurde bezogen. In

<i>Antikörper</i>	<i>Beschreibung</i>
α His ₆	gegen Hexahistidinrest
α Jac1	gegen GST-Jac1 (AS 120–184)
α Nfs1	gegen Nfs1-His ₆ (AS 34–497)
α Ssq1	gegen GST-Ssq1 (AS 548–657)
α Tim13 [87]	gegen CSRIQNASASGEI (C-Terminus AS 94–105), gekoppelt an Ovalbumin
α Yah1	gegen Yah1-His ₆

Tabelle 2.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.3 sind alle in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgeführt. Die polyklonalen Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

2.5.3 Reinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus Serum aufgereinigt. Zuerst wurde das Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden 0,24 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 10 min bei RT getaumelt und 3x in je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. 1,5 mg des gereinigten Proteins in einem Volumen von 3 ml wurden bei folgenden Endkonzentrationen mit dem aktivierten Säulenmaterial versetzt: 0,25% SDS, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3. Die Suspension wurde für 1,5 h bei RT getaumelt und das Säulenmaterial wurde 3x mit je 3 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert, für 2 h bei RT belassen und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde mit je 5 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumacetat pH 4,0 und 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen (mit einer Laufgeschwindigkeit von 3 ml/min). Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt, bevor die Säule dann mit 5 ml 10 mM Natriumazid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und gelagert (bei +4°C) wurde.

Um die Antikörper an die Sepharose zu binden, wurde die Säule mit je 10 ml der folgenden Puffer gewaschen: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat pH 11,5; 10 mM Tris/HCl pH 7,5. Zu 4 ml Serum wurden 16 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gegeben und die Lösung wurde auf folgende Konzentrationen eingestellt: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM o-Phe, 1 μ g/ml Leupeptin. Das Serum wurde 3x mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben und dann mit 20 ml Tris/HCl pH 7,5 und 20 ml 500 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen.

Die Elution wurde in 1 ml-Schritten mit folgenden Puffern durchgeführt: 10 ml Citrat pH 4,0; 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8 (wurde verworfen); 10 ml Natriumphosphat pH 11,5; 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 (wurde verworfen). Die Fraktionen wurden mit 1 M Tris bzw. 1 M Glycin pH 2,2 neutralisiert, bei -20°C weggefroren und gelagert. Die Anwesenheit von Antikörpern in den einzelnen Fraktionen wurde durch Gelelektrophorese und anschließender Coomassieblau-Färbung kontrolliert.

2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (3% Milchpulver oder BSA in TBS) geschwenkt. Anschließend folgte die Immundekoration mit Antiserum oder gereinigtem Antikörper (in 3% Milchpulver oder BSA in TBS) für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht. Antiseren wurden in Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 und affinitätsgereinigte Antikörper in Verdünnungen von 1:150 bis 1:600 eingesetzt. Die erste Dekoration wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Danach wurde die Nitrozellulose gewaschen (2x 5 min in TBS, 1x 5 min in TBS, 0,05% TX100) und für 30–60 min mit einem Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:20000 in 3% Milchpulver oder BSA in TBS). Die Membran wurde erneut gewaschen (2x 5 min in TBS, 1x 5 min in TBS, 0,05% TX100) und für 2 min mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H_2O_2 , 100 mM Tris/HCl pH 8,5) durchtränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulose zwischen zwei Folien gelegt und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

2.5.5 Immunpräzipitations-Experimente

Um Interaktionen mitochondrialer Proteine nachzuweisen, wurden typischerweise 50 μg Mitochondrien in Lysepuffer (0,1% TX100, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4; optional: 1 mM ATP oder 5 U/ml Apyrase, 10 mM EDTA) resuspendiert und für 15 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ getaumelt. Das Lysat wurde für 30 min bei 47000 g ($+4^{\circ}\text{C}$) zentrifugiert und der Überstand wurde für die Immunpräzipitations-Experimente eingesetzt.

Für die Immunfällung wurden 40 μl 50%ige PA-Sepharose (in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen) in 100 μl Lysepuffer gegeben und mit 5–10 μl Serum oder 20–40 μl gereinigte Antikörper versetzt. Die Suspension wurde für 1 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ getaumelt. Die PA-Sepharose wurde dann in Lysepuffer gewaschen.

Das oben gewonnene Lysat wurde mit der antikörperbeladenen PA-Sepharose versetzt und 30 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ getaumelt. Die PA-Sepharose wurde 3x in Lysepuffer gewaschen, bevor die Proteine durch Zugabe von 30 μl Laemmli-Puffer und kurzes

Aufkochen abgelöst wurden.

2.6 Puffer und Medien

Lactat-Medium:	3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Galactose, 1 g/l Kaliumphosphat 1 g/l Ammoniumchlorid, 0,5 g/l Calciumchlorid 0,5 g Natriumchlorid, 0,6 g/l Magnesiumsulfat, 0,3 ml/l Eisen(III)chlorid (1%), 2% Lactat, pH 5,5 mit KOH
Laemmli-Puffer:	2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid
LB ^{Amp} -Medium:	LB-Medium mit 100 μ g/ml Amp
LB ^{Amp/Cam} -Medium:	LB ^{Amp} -Medium mit 34 μ g/ml Cam
LB-Platten:	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar
LB ^{Amp} -Platten:	LB-Platten mit 100 μ g/ml Amp
LB ^{Amp/Cam} -Platten:	LB ^{Amp} -Platten mit 34 μ g/ml Cam
PBS:	16 mM Natriumhydrogenphosphat, 4 mM Kalium- dihydrogenphosphat, 115 mM Natriumchlorid
SEH:	0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 80 mM Hepes/KOH pH 7,4
SOB-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l Natriumchlorid, 0,19 g/l Kaliumchlorid
SOC-Medium:	SOB-Medium auf 20 mM Glucose, 10 mM Magnesiumchlorid
TBS-Puffer:	150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
YP-Medium:	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl
YPD-Platten:	2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Glucose 2% Agar, pH 5,5 mit HCl
YPGal-Medium:	YP-Medium mit 2% Galactose

2.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Amersham Pharmacia,

Amersham, Großbritannien: m7G(5')ppp(5')G, PA-Sepharose,
CNBr-aktivierte Sepharose

Behring-Werke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans

Bio-Rad, Hercules, USA: Bio-Rad-Proteinassay, Anti-Kaninchen-IgG-
gekoppelte Meerrettich-Peroxidase

CyrRX, Norcross, USA: TiterMax

Difco, Detroit, USA: Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton,

	Hefeextrakt
Finnzyme , Espoo, Finnland:	<i>Taq</i> -DNS-Polymerase mit Puffer (DyNAzyme II, aus <i>Thermus brockianus</i> , rekombinant)
Genomed , Bad Oeynhausen:	Jetstar-Kit
ICN , Costa Mesa, USA:	³⁵ S-Methionin und ³⁵ S-Cystein
Invitrogen , Karlsruhe:	<i>E. coli</i> DH5 α , pCR-TOPO
Kodak , Rochester, USA:	Biomax MR-1 Filme
Molecular Probes , Eugene, USA:	AMS
New England Bio- labs , Beverly, USA:	Restriktionsenzyme mit Puffer, T4-Ligase
Novagen , Madison, USA:	<i>E. coli</i> BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS
Promega , Madison, USA:	<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase (aus <i>Pyrococcus furiosus</i>), SP6-RNS-Polymerase, SP6- und T7-Primer, RNasin (<i>Ribonuclease Inhibitor</i>) pGEM-Vektoren, Retikulozytenlysat
Qiagen , Hilden:	Kit QIAquick, Ni-NTA-Agarose
Roche Diagnostics , Mannheim:	SAP, CK, PK
Schleicher & Schuell , Dassel:	Nitrozellulose-Membranen
Seikagaku Kogyo , Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Sigma , München:	Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), STI, BSA (fettsäurefrei), Leupeptin
Sigma-ARK , Darmstadt:	Oligonukleotide
Serva , Heidelberg:	Lysozym

Feinchemikalien wurden je nach Verwendungszweck in den Qualitäten „reinst“, „zur Analyse“ oder „für biochemische Zwecke“ nach der Spezifikation von Merck, Darmstadt bezogen.

2.8 Geräte

Bio-Rad , Hercules, USA:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Elma , Singen:	Ultraschallbad Transsonic 310
Hewlett-Packard , Palo Alto, USA:	Scanner ScanJet 4c
Kontron Instruments , Watford, Großbritannien:	Spektrophotometer Uvikon 930
MWG Biotech , Ebersberg:	PCR-Maschine Primus

raytest, Straubenhardt: Quantifizierungsprogramm TINA 2.09 g
Vacuubrand, Wertheim: Vakuumpumpe PC 2001 Vario
Varian, Palo Alto, USA: ICP-AE-Spektrometer VARIAN-VISTA

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Import von Tim13

Bisher ist kaum verstanden, wie Intermembranraumproteine ohne N-terminale Signalsequenz über die mitochondriale Außenmembran gelangen. Es ist nicht bekannt, ob der TOM-Komplex für den Import dieser Proteine notwendig ist. Außerdem sind die energetischen Voraussetzungen für den Translokationsprozess unklar. Wird für den Prozess Energie in Form von ATP verbraucht? Gibt es für diese Gruppe von Intermembranraumproteinen einen Rezeptor auf der *trans*-Seite, der die ankommende Polypeptidkette bindet? In dieser Arbeit wurde der Import des Tim13 in *S. cerevisiae* untersucht, einem kleinen löslichen Protein im Intermembranraum von Mitochondrien.

3.1.1 Tim13 wird über den TOM-Komplex importiert

Eine wichtige Grundlage zur Untersuchung der Proteintranslokation in Mitochondrien sind *in vitro*-Importexperimente. Typischerweise werden dabei ^{35}S -markierte Proteine in einem isoosmotischen Puffer mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Importierte Proteine sind gegen externe Protease resistent und können durch Reisolierung der Mitochondrien, anschließender SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie detektiert werden. Um die Translokation von Tim13 in den Intermembranraum zu untersuchen, wurde ein solches *in vitro*-Importexperiment durchgeführt. Dazu wurde radioaktiv markiertes Tim13 durch *in vitro*-Translation in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert. Das so erhaltene Protein wurde für 15 min mit isolierten Mitochondrien aus Bäckerhefe inkubiert. Ein Teil der Probe wurde mit der Protease Proteinase K (PK) behandelt, ein anderer Teil blieb unbehandelt. Wie Abbildung 3.1a zeigt, wurde nach Trennung der Proteine durch Gelelektrophorese ein proteaseresistentes Signal von Tim13 erhalten, das 15% des im Versuch eingesetzten Proteins ausmachte. Nach Öffnen der Außenmembran durch hypoosmotische Schwellung wurde das Protein proteasezugänglich und vollständig abgebaut. Um sicherzustellen, dass sich

durch die Schwellung spezifisch die Außenmembran öffnete, die Innenmembran aber intakt blieb, wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen Tim13 und Yah1 durchgeführt. Tim13 ist im Intermembranraum und Yah1 in der Matrix lokalisiert [87, 8]. Durch die Schwellung wurde endogenes Tim13 vollständig abgebaut, Yah1 in der Matrix blieb dagegen proteaseresistent. Demnach reflektierte das proteasegeschützte Signal von ^{35}S -markiertem Tim13 den *in vitro*-Import des Proteins in den Intermembranraum isolierter Mitochondrien.

Wie die meisten Proteine des Intermembranraums besitzt Tim13 keine abspaltbare Präsequenz. Um zu testen, ob Tim13 auf einem gemeinsamen Weg mit Präproteinen mit typischen mitochondrialen Präsequenzen über die Außenmembran transportiert wird, wurde ein Konkurrenzexperiment mit pSu9-DHFR durchgeführt. pSu9-DHFR ist ein Konstrukt aus den ersten 69 N-terminalen Aminosäureresten der Untereinheit 9 der ATP-Synthase aus *N. crassa* und Dehydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus. Dieses Konstrukt wird über den TOM- und TIM23-Komplex in die Matrix von Mitochondrien importiert [93]. Falls Tim13 über den TOM-Komplex importiert würde, sollte bei gleichzeitigem Import von pSu9-DHFR ein Wettbewerb um Translokationskomponenten stattfinden. Aus diesem Grund wurde ^{35}S -markiertes Tim13 in Gegenwart verschiedener Mengen pSu9-DHFR mit Mitochondrien inkubiert (s. Abbildung 3.1b). Steigende Mengen von pSu9-DHFR im Reaktionsansatz führten zu verminderten Importraten von Tim13. Die Zugabe von pSu9-DHFR verringerte die Importeffizienz von Oxa1 gleichermaßen wie die von Tim13. Oxa1 ist ein Protein mit typischer N-terminaler Präsequenz [42]. Tim13 und pSu9-DHFR besitzen demnach einen zumindest teilweise identischen Importweg und werden beide durch den TOM-Komplex über die Außenmembran transferiert.

3.1.2 Import von Tim13 ist unabhängig von ATP

Der Import von Vorstufenproteinen in die Matrix ist an die Anwesenheit von ATP gebunden. ATP wird von Ssc1 benötigt, das in die Matrix ankommende Polypeptidketten bindet. Bisher ist nicht bekannt, ob es für Tim13 oder andere Proteine des Intermembranraums Importfaktoren gibt, die ATP benötigen. Abbildung 3.1c zeigt den Import von pSu9-DHFR in Mitoplasten im Vergleich zu Tim13 in Mitochondrien. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von ATP, Apyrase oder Valinomycin durchgeführt. Apyrase ist ein Enzym, das ATP hydrolysiert. Die Inkubation mit Apyrase führt zur Depletion von Nukleotridtriphosphaten in Mitoplasten bzw. Mitochondrien und im Reaktionsansatz. Valinomycin transportiert selektiv K^+ -Ionen durch Membranen und zerstört dadurch das mitochondriale Membranpotential. Nach der Apyrasebehandlung war die Importeffizienz von pSu9-DHFR auf unter 20% der Kontrolle mit ATP reduziert. Ohne Membranpotential fand überhaupt kein Import von pSu9-DHFR statt. pSu9-DHFR zeigte mit diesem Versuchsaufbau das typische Verhalten eines Matrix-Vorstufenproteins. Im Gegensatz dazu war der Import von Tim13 weder an die Anwesenheit von ATP

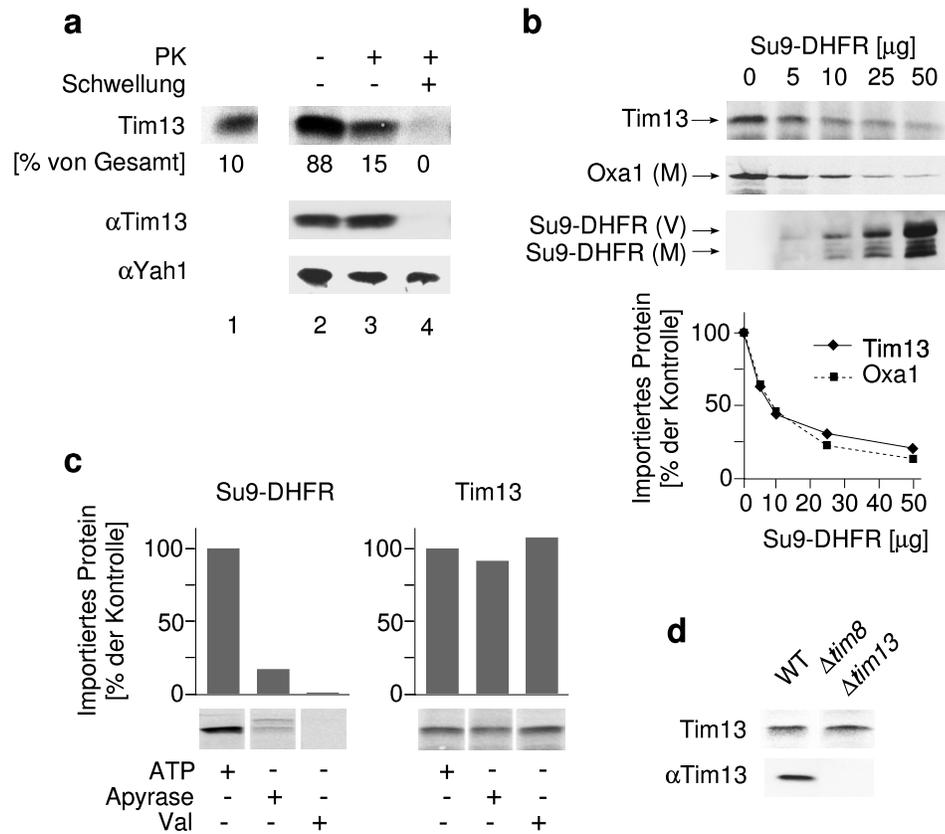


Abbildung 3.1 Tim13 wird über den TOM-Komplex importiert. Die Translokation ist unabhängig von ATP, Membranpotential und der Anwesenheit des Tim8/13-Komplexes. **(a)** ^{35}S -markiertes Tim13 wurde für 15 min mit isolierten Mitochondrien ($50\ \mu\text{g}/\text{Reaktion}$) inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und in isoosmotischen Puffer ohne bzw. mit PK (Bahn 2 bzw. 3) oder in hypoosmotischen Puffer mit PK (Bahn 4) aufgenommen. Der Proteaseverdau wurde für 30 min auf Eis durchgeführt. Mitochondriale Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert. **(b)** ^{35}S -markiertes Tim13 und Oxa1 wurden mit den angegebenen Mengen rekombinant gewonnenem pSu9-DHFR gemischt und für 10 min mit Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit PK behandelt. Die Proteine wurden durch Autoradiographie (Tim13 und Oxa1) oder Westernblot (Su9-DHFR) analysiert. (M) – maturiertes Protein, (V) – Vorstufenprotein. **(c)** Mitoplasten (Su9-DHFR) oder Mitochondrien (Tim13) wurden in Gegenwart von entweder 2 mM ATP, 25 mU Apyrase/ μl oder 5 μM Valinomycin (ATP +, Apyrase + oder Valinomycin +) für 10 min bei 25°C inkubiert. Danach wurden pSu9-DHFR bzw. Tim13 wie unter (b) importiert und analysiert. **(d)** Tim13 wurde wie unter (b) in Mitochondrien aus dem $\Delta\text{tim8}/\Delta\text{tim13}$ - oder Wildtyp-Stamm importiert und analysiert.

noch an die des Membranpotentials gebunden.

Wenn der Import von Tim13 weder ATP noch Membranpotential benötigt, was ist dann die treibende Kraft, die zur Translokation des Proteins führt? Der Import von Apo-Cytochrom c in den mitochondrialen Intermembranraum ist an die Anwesenheit von CCHL geknüpft. CCHL fungiert als Rezeptor der *trans*-Seite. Es bindet Apo-Cytochrom c und verhindert so ein Zurückgleiten des Proteins [76]. Endogenes Tim13 ist zusammen mit Tim8 in einem löslichen, heterooligomeren Komplex gebunden, dem Tim8/13-Komplex [56, 87]. Dieser Komplex, oder auch eine nicht vollständig assemblierte Form davon, könnte für Tim13 als Rezeptor der *trans*-Seite dienen. Aus diesem Grund wurde Tim13 in Wildtyp-Mitochondrien und Mitochondrien aus einem $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Stamm importiert. Wie Abbildung 3.1d zeigt, waren die Importraten für beide Mitochondrien gleich. Die Translokation von Tim13 ist also nicht an die Anwesenheit des Tim8/13-Komplexes gebunden.

3.1.3 Das Cysteinmotiv von Tim13 ist für den Import essentiell

Wenn der Tim13-Import von ATP und dem Membranpotential unabhängig ist und außerdem keine Komponente bekannt ist, die als Rezeptor der *trans*-Seite fungiert, was ist dann die zur Translokation notwendige Kraft? Möglicherweise treibt die Faltung auf der Intermembranraumseite den Import von Tim13 an oder verhindert zumindest ein Zurückgleiten des Proteins. Ein solcher Prozess sollte von den Thiolresten des Cysteinmotivs in Tim13 (CX₃CX₁₁CX₃C) abhängig sein. In vorigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieses CX₃CX_nCX₃C-Motiv (mit n=9-16) in allen kleinen Tim-Proteinen vorkommt und Metallionen binden oder Disulfidbrücken bilden kann [110, 1, 18, 19]. Die Faltung von Proteinen wird oft durch Bindung von Metallen oder Disulfidbrücken stabilisiert [16]. Um zu prüfen, ob für die Translokation von Tim13 reduzierte Thiolgruppen notwendig sind, wurde ein Importexperiment durchgeführt, bei dem zuvor die Cysteine von Tim13 mit N-Ethylmaleimid (NEM) modifiziert wurden. Wie in Abbildung 3.2a gezeigt, blieb der Import des Kontrollproteins pSu9-DHFR von der Modifikation durch NEM unbeeinflusst. Die Maskierung der Cysteine von Tim13 führte jedoch zu einer Reduktion der importierten Spezies auf nur noch ca. 20% des Kontrollwerts ohne NEM.

Um einen möglichen durch NEM verursachten Sekundäreffekt auszuschließen, wurden Cystein-zu-Serin-Punktmutationen in Tim13 eingeführt. Insgesamt wurden fünf verschiedene Konstrukte mit folgenden Mutationen kloniert:

C57,61,73,77S (Tim13^{SSSS}), C57,61S (Tim13^{SSCC}), C73,77S (Tim13^{CCSS}),
C57S (Tim13^{SCCC}), C73S (Tim13^{SSCS}).

Abbildung 3.2b zeigt Importreaktionen von Tim13 und den Tim13-Mutanten. Die Inkubation von Wildtyp-Tim13 mit Mitochondrien führte zu einem typischen pro-

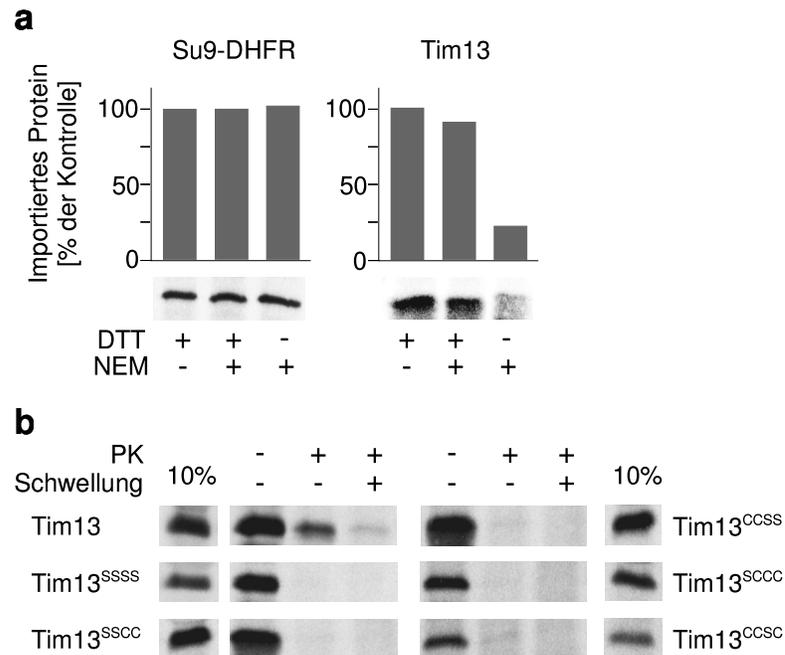


Abbildung 3.2 Das Cysteinmotiv von Tim13 ist für den Import notwendig. Tim13 ist *in vivo* vollständig reduziert. **(a)** ³⁵S-markiertes pSu9-DHFR und Tim13 wurden für 30 min in Gegenwart von DTT und/oder NEM auf Eis inkubiert. Überschüssiges NEM wurde mit DTT gequencht. Anschließend wurde eine Importreaktion für 10 min bei 25°C durchgeführt (50 µg Mitochondrien/Reaktion). Die Mitochondrien wurden für 30 min mit PK behandelt und reisoliert. Die Proteine wurden mit SDS-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie analysiert. **(b)** Verschiedene Tim13-Konstrukte mit Cys-zu-Ser-Punktmutationen wurden wie unter (a) in Mitochondrien importiert. Es wurde entweder keine Behandlung mit Protease (PK -), Behandlung mit PK (PK +) in isoosmotischem oder hypoosmotischem Puffer (PK +, Schwellung +) durchgeführt.

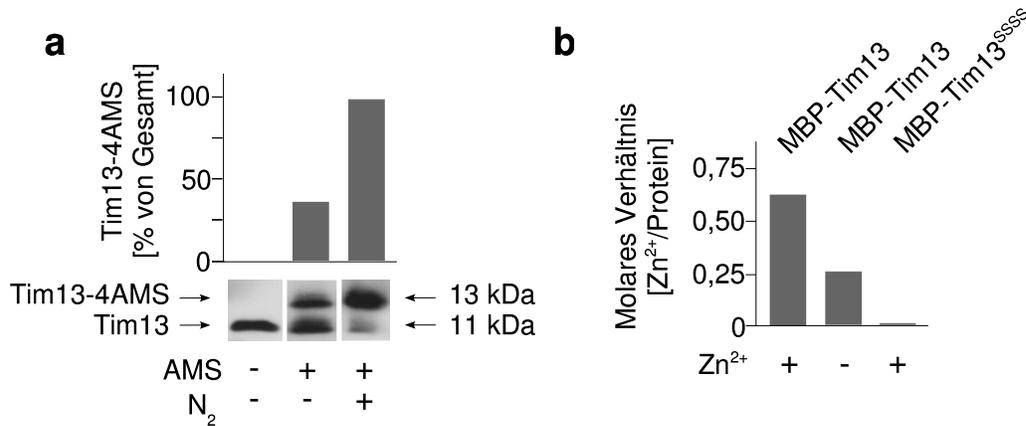


Abbildung 3.3 Tim13 ist *in vivo* vollständig reduziert. MBP-Tim13 bindet Zn²⁺.

(a) Isolierte Sphäroplasten wurden in einem Puffer ohne oder mit AMS resuspendiert und nach kurzer Beschallung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktion unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt (N₂ +).

(b) Wildtyp-Tim13 und Tim13^{SSSS} wurden als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert (mit 100 μM Zn²⁺ im Medium). Die Zellen wurden in Gegenwart von 200 μM Zinkacetat (Zn²⁺ +) oder ohne Zusatz von Zinkacetat (Zn²⁺ -) aufgeschlossen. Die Proteine wurden über eine Amylosesäule gereinigt. Die Menge der gebundenen Zinkionen wurde mittels Atomemissionsspektroskopie ermittelt.

teaseresistenten Signal. Im Gegensatz dazu wurde keines der Konstrukte mit den eingeführten Punktmutationen importiert. Schon ein einzelner Cystein-zu-Serin-Austausch resultierte in einer vollständigen Hemmung des Imports von Tim13. Demnach scheinen alle vier Thiolgruppen des CX₃CX₁₁CX₃C-Motivs von Tim13 für dessen Importierbarkeit in den Intermembranraum notwendig zu sein.

3.1.4 Endogenes Tim13 liegt in reduzierter Form vor

Bisher ist unklar, in welchem Oxidationszustand das Cysteinmotiv der kleinen Tim-Proteine in Mitochondrien vorliegt. Auf der einen Seite können rekombinant exprimierte kleine Tim-Proteine Zinkionen binden [110, 1]. Für eine koordinative Bindung von Metallionen müssen die Cysteine in ihrer reduzierten Form vorliegen. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die kleinen Tim-Proteine einer Intermembranraumfraktion oxidiert vorliegen [18, 19]. Eine Faltung von Tim13 im Intermembranraum könnte so entweder durch Bindung von Zn²⁺ oder durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Um den *in vivo*-Oxidationszustand der Cysteinreste von Tim13 zu ermitteln, wurden Sphäroplasten durch Beschallung geöffnet und mit 4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure (AMS) inkubiert. Die Maleimidyl-Gruppe von AMS reagiert spezifisch mit den Thiolgruppen der Cysteinseitenketten. AMS ist durch zwei Sulfonsäurereste stark negativ geladen. Dadurch wird die Lauffhöhe eines derivatisierten Proteins hin zu

höherem Molekulargewicht verschoben (ca. 0,5 kDa pro Cysteinrest). Sphäroplasten wurden verwendet, um eine Oxidation der Tim-Proteine während der Isolierung von Mitochondrien zu vermeiden. Um auch während des Versuchs ein Oxidation auszuschließen, wurde die Reaktion zusätzlich unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Abbildung 3.3a zeigt, dass die Reaktion unter Stickstoff zu einer vollständigen Modifikation des endogenen Tim13 führte. Ohne Ausschluss von Sauerstoff wurden lediglich ca. 30% des eingesetzten Proteins derivatisiert. Endogenes Tim13 liegt folglich in vollständig reduzierter Form vor und bildet keine Disulfidbrücken. Gleichzeitig ist Tim13 aber sensitiv gegenüber Sauerstoff und wird nach Öffnung der Zellen leicht oxidiert.

3.1.5 Rekombinantes Tim13 bindet Zn^{2+}

Um zu prüfen, ob Tim13 Zinkionen binden kann, wurde ein Fusionsprotein aus Tim13 und dem Maltosebindepotein (MBP) in *E. coli* exprimiert, gereinigt und auf die Anwesenheit von Zink geprüft. Zur Kontrolle wurde ein Fusionsprotein mit Tim13^{SSSS}, in dem alle vier Cysteine zu Serine ausgetauscht worden waren, exprimiert und aufgereinigt. Zur Expression wurden die *E. coli*-Kulturen für drei Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in einem Puffer mit oder ohne Zusatz von Zinkacetat lysiert und die Fusionsproteine auf einer Amylosesäule gereinigt. Das in den isolierten Fusionsproteinen gebundene Zink wurde mittels Atomemissionsspektroskopie quantifiziert. War kein Zn^{2+} im Lysepuffer vorhanden, enthielt das gereinigte MBP-Tim13 Zink in einem molaren Verhältnis (Zink/Protein) von ca. 0,25 (s. Abbildung 3.3b). Dieses Verhältnis stieg auf ca. 0,6, wenn Zn^{2+} im Lysepuffer vorhanden war. Mit MBP-Tim13^{SSSS} konnte kein Zink nachgewiesen werden. Tim13 ist demnach in der Lage Zinkionen zu binden. Für die Bindung von Zn^{2+} ist das Cysteinmotiv notwendig.

3.1.6 Faltung von Tim13

3.1.6.1 Endogenes Tim13 besitzt eine gefaltete Domäne

Das Cysteinmotiv ist für den Import von Tim13 essentiell. Vielleicht ist für die Translokation von Tim13 eine Faltung des Proteins auf der Intermembranraumseite notwendig. Dann sollte endogenes Tim13 in einer gefalteten Konformation vorliegen. Gefaltete Domänen sind gegenüber Proteasen oft resistent, da die Polypeptidketten nur schwer zugänglich sind. Um herauszufinden, ob endogenes Tim13 eine proteaseresistente Domäne besitzt, wurde eine mitochondriale Intermembranraumfraktion mit steigenden Mengen an Trypsin versetzt. Nach der Inkubation wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Dekoration mit einem für den C-Terminus von Tim13 spezifischen Antikörper konnten C-terminale Fragmente des Proteins sichtbar gemacht werden. Abbildung 3.4b zeigt ein Fragment von ca. 8,0 kDa, das sich bei

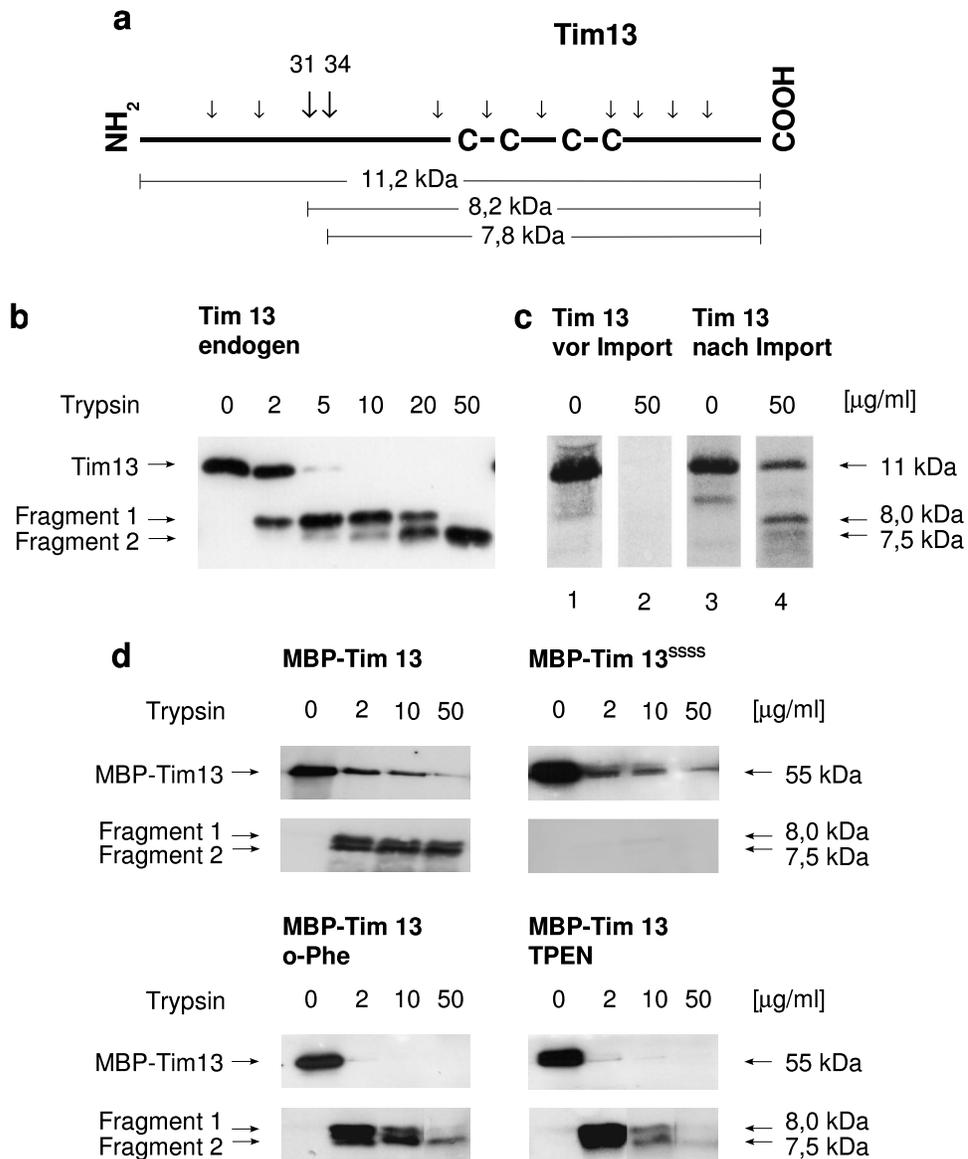


Abbildung 3.4 (a) Die Pfeile zeigen auf Trypsinschnittstellen im Tim13-Molekül.

(b) Endogenes Tim13 besitzt eine proteaseresistente Domäne.

Intermembranraumfraktionen aus Wildtyp-Mitochondrien wurden 20 min auf Eis mit den angegebenen Konzentrationen an Trypsin behandelt. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und durch SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot analysiert. **(c)** Tim13 wird während dem Import gefaltet. ³⁵S-markiertes Tim13 wurde entweder direkt oder nach Inkubation mit Mitochondrien und Öffnen der Außenmembran wie unter (b) mit Trypsin behandelt. Die Analyse der Proteine erfolgt durch Autoradiographie. **(d)** Die proteaseresistente Domäne von Tim13 wird durch Metallbindung stabilisiert. MBP-Tim13 bzw. MBP-Tim13^{SSSS} wurden ohne Chelatoren oder mit 10 mM EDTA und 2 mM o-Phe bzw. 0,5 mM TPEN inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie unter (b) mit Trypsin behandelt und analysiert.

geringen Proteasekonzentrationen (2–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bildete. Mit steigenden Trypsinkonzentrationen wurde auch ein Fragment von ca. 7,5 kDa gebildet. Bei 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde Tim13 vollständig in das kleinere Fragment überführt.

Die durch den Proteaseverdau gebildeten Fragmente entsprechen vermutlich C-terminalen Polypeptiden von Tim13, die durch Schnitte des Proteins an Aminosäurepositionen 31 bzw. 34 entstanden (s. Abbildung 3.4a). N-terminale Fragmente konnten nicht detektiert werden, da der Antikörper für den C-Terminus spezifisch war. Tim13 besitzt somit eine proteaseunzugängliche Domäne, die das konservierte Cysteinmotiv beinhaltet.

3.1.6.2 Tim13 faltet sich während des *in vitro*-Imports

Proteine überqueren den TOM-Komplex in gestreckter Konformation. Faltet sich Tim13 während der Importreaktion bzw. beim Erreichen des Intermembranraums? Um diese Frage zu beantworten wurde der Faltungszustand von ^{35}S -markiertem Tim13 vor und nach dem Import ermittelt. Dazu wurde Tim13 mit Wildtyp-Mitochondrien inkubiert. Nach dem Import wurde die Außenmembran durch hypoosmotische Schwellung geöffnet und die Probe mit Trypsin versetzt. Zum Vergleich wurde nicht importiertes Tim13 Protease verdaut. Wie Abbildung 3.4c zeigt, war Tim13 vor dem Import ungefaltet, da die Trypsinbehandlung zum Abbau des Proteins führte. Nach dem Import waren die für die Faltung spezifischen Fragmente von 7,5 und 8,0 kDa sichtbar. Tim13 erhielt seine gefaltete Konformation folglich während der *in vitro*-Importreaktion.

3.1.6.3 Die Faltung von Tim13 ist Zn^{2+} -stabilisiert

Die gefaltete Domäne von Tim13 beinhaltet das Cysteinmotiv, liegt *in vivo* in reduzierter Form vor und ist außerdem in der Lage Zinkionen zu binden. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Faltung von Tim13 durch Zn^{2+} stabilisiert wird (s. Abbildung 3.4d). Tim13 und Tim13^{SSSS} wurden wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben als MBP-Fusionsproteine exprimiert, isoliert und dann mit den angegebenen Konzentrationen an Trypsin behandelt. Das rekombinante MBP-Tim13 bildete wie das endogene Tim13 zwei Fragmente von ca. 8,0 und 7,5 kDa, die im Bereich von 2 bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin stabil waren. Mit Tim13^{SSSS}, in dem alle Cysteine durch Serine ausgetauscht waren, wurden diese Fragmente nicht erhalten. Das Cysteinmotiv ist also für die Faltung von Tim13 notwendig.

Rekombinant gewonnenes MBP-Tim13 bindet Zink. Um zu untersuchen, ob die gebundenen Zinkionen die Proteinfaltung stabilisieren, wurde MBP-Tim13 vor der Trypsinbehandlung mit den für Zn^{2+} -spezifischen Chelatoren o-Phenanthrolin (o-Phe) oder N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylendiamin (TPEN) inkubiert. Die Inkubation von MBP-Tim13 mit den Chelatoren führte zum Verlust der stabilen Faltung des Proteins. Im Gegensatz zu unbehandeltem Protein, waren die Fragmente bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin nicht mehr stabil und

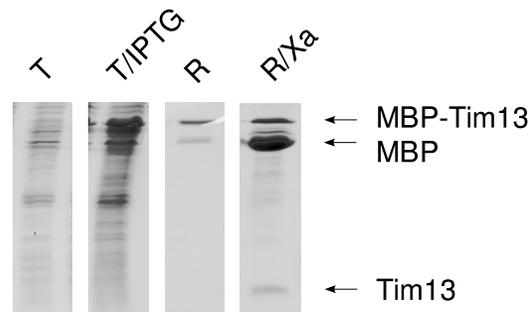


Abbildung 3.5 Tim13 kann durch Expression als MBP-Fusionsprotein und anschließendes Schneiden mit Faktor Xa gewonnen werden. Gesamtzellextrakt vor Induktion (T), Gesamtzellextrakt nach der Induktion mit IPTG (T/IPTG), MBP-Tim13 nach der Reinigung an einer Amylosesäule (R), Tim13 nach Verdau mit Faktor Xa (R/Xa).

wurden durch die Protease vollständig verdaut (s. Abbildung 3.4d). Die Faltung von Tim13 wird demnach durch Bindung von Zn^{2+} stabilisiert.

3.1.7 Translokation und Faltung von Tim13

3.1.7.1 Rekombinantes Tim13 ist importkompetent

Die Konzentrationen von *in vitro* synthetisierten Proteinen in Retikulozytenlysat sind sehr niedrig, in der Regel im femtomolaren Bereich. Aus diesem Grund liegen in typischen *in vitro*-Importexperimenten die Translokationskomponenten gegenüber dem Präprotein deutlich im Überschuss vor. Die Translokationsmaschinerie ist in solchen Fällen nicht gesättigt. Ein weiterer Nachteil des Systems ist, dass sich über die Konformation des generierten Proteins und seine Bindung zu Faktoren des Translationsystems nur schwer Aussagen machen lassen. So ist nach einer *in vitro*-Translation nicht bekannt, ob das synthetisierte Protein mit Chaperonen assoziiert vorliegt, in seiner aktiven Konformation ist oder ein Kofaktor assembliert wurde. Folgend wird ein System beschrieben, das den Import großer Mengen von Tim13 ermöglichte, die durch Westernblotanalyse nachweisbar waren. Abbildung 3.5 zeigt die Aufreinigung von Tim13 als MBP-Fusionsprotein. Isoliertes MBP-Tim13 wurde mit der Protease Faktor Xa geschnitten, woraus Tim13 ohne MBP-Anhang resultierte. Um das so erhaltene Tim13 zu entfalten, wurde es gegen einen denaturierenden Guanidiniumchloridpuffer dialysiert und für Importexperimente eingesetzt. Abbildung 3.6a zeigt ein typisches Importexperiment. Gereinigtes Tim13 wurde mit Mitochondrien inkubiert. Dabei wurden Mitochondrien des $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Stamms verwendet, da das endogene Tim13 in Wildtyp-Mitochondrien die Westernblotanalyse stören würde. Nicht importiertes Material wurde durch Proteaseverdau entfernt. Tim13 wurde anschließend

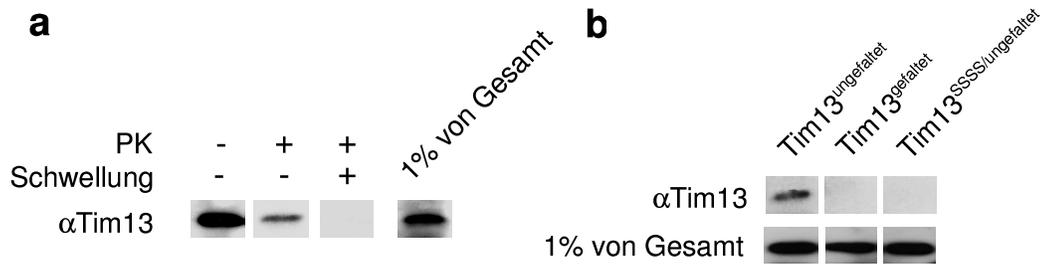


Abbildung 3.6 (a) Gereinigtes Tim13 kann importiert und durch Westernblotanalyse detektiert werden. 1 μ g denaturiertes Tim13 wurde für 20 min bei 25°C mit 50 μ g $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden in isoosmotischem Puffer ohne bzw. mit PK oder in hypoosmotischem Puffer mit PK verdünnt, für 30 min auf Eis reinkubiert und dann reisoliert. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. (b) Tim13 ist nur in ungefalteten Zustand importkompetent. 0,1 μ g denaturiertes Tim13 (Tim13_{ungefaltet}), natives Tim13 (Tim13_{gefaltet}) bzw. denaturiertes Tim13 mit vier Cys-zu-Ser-Mutationen (Tim13^{SSSS}/_{ungefaltet}) wurden wie unter (b) inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und wie unter (a) in isoosmotischem Puffer mit PK behandelt und analysiert.

mittels Westernblot nachgewiesen. Importiertes Tim13 war gegenüber proteasegeschützt und wurde nach dem Öffnen der Außenmembran zugänglich. Mit diesem Versuchsaufbau war es möglich etwa 0,1% der eingesetzten Proteinmenge in den Intermembranraum von Mitochondrien zu importieren.

3.1.7.2 Tim13 ist nur in ungefaltetem Zustand importkompetent

Um die Abhängigkeit des Imports von Tim13 vom Faltungszustand des Proteins zu untersuchen, wurde Tim13 in ent- und gefaltetem Zustand mit Mitochondrien inkubiert (s. Abbildung 3.6b). Tim13 wurde nur im denaturierten Zustand importiert. Für gefaltetes Tim13 wurde kein proteasegeschütztes Signal erhalten. Demnach muss Tim13 für die Translokation über den TOM-Komplex in einem entfalteten Zustand vorliegen. Im gleichen Experiment wurde auch denaturiertes Tim13^{SSSS} für eine Importreaktion eingesetzt, das ebenfalls nicht importiert wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit vorigen Experimenten, in denen ³⁵S-markiertes Tim13^{SSSS} in Retikulozytenlysat ebenfalls nicht importiert wurde. Die Cystein-zu-Serin-Mutationen führen also unabhängig vom verwendeten Importsystem zu importinkompetentem Tim13.

3.1.7.3 Zn²⁺ ist für den Import von Tim13 notwendig

Das Cysteinmotiv von Tim13 ist für die Translokation des Proteins in den Intermembranraum notwendig. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Protein durch *in vitro*-Translation oder rekombinant gewonnen wurde. Die Cysteine liegen *in vivo* in reduzierter Form vor und sind in der Lage Zinkionen zu binden, wodurch die

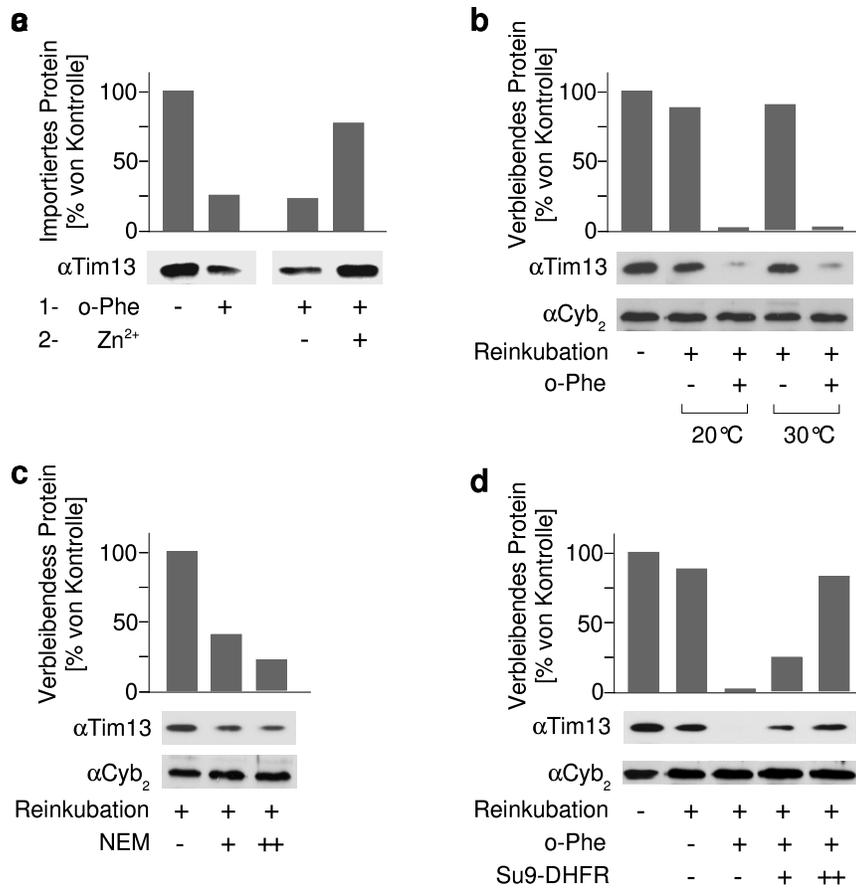


Abbildung 3.7 Zn^{2+} ist für den Import von Tim13 notwendig. Aufgrund der durch Zn^{2+} stabilisierten Faltung kann Tim13 nicht mehr aus dem Intermembranraum austreten. **(a)** Mitochondrien wurden für 50 min auf Eis in Importpuffer (o-Phe -) oder in Puffer mit 10 mM EDTA und 2 mM o-Phe inkubiert (o-Phe +). Die Mitochondrien wurden dann durch 0,6 M Saccharose, 20 mM Hepes entweder mit 10 mM EDTA (Zn^{2+} -) oder mit 10 μ M Zinkacetat (Zn^{2+} +) zentrifugiert, resuspendiert und für den Import verwendet. Dazu wurde 0,1 μ g denaturiertes Tim13 für 20 min bei 25°C mit 50 μ g $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden in isoosmotischem Puffer mit PK verdünnt, für 30 min auf Eis inkubiert und dann reisoliert. Die Proteine wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. **(b)** Tim13 wurde wie unter (a) mit Mitochondrien inkubiert. Nicht importiertes Tim13 wurden mit Trypsin verdaut (50 μ g/ml, 20 min auf Eis). Die Mitochondrien wurden bei 20°C oder 30°C für 30 min reinkubiert (ohne oder mit Zusatz von 10 mM EDTA/2 mM o-Phe [o-Phe - oder o-Phe +]), reisoliert und wie unter (a) mit PK behandelt und analysiert. **(c)** Import und Reinkubation (bei 25°C) wurden wie unter (d) durchgeführt. An Stelle von o-Phe wurden 0 (NEM -), 1 (NEM +) oder 5 mM (NEM ++) NEM zur Reinkubation gegeben. **(d)** Import und Reinkubation (bei 25°C) wurden wie unter (d) durchgeführt. Zusätzlich wurden 0 (Su9-DHFR -), 5 (Su9-DHFR +) oder 20 (Su9-DHFR ++) μ g pSu9-DHFR zur Reinkubation gegeben.

Faltung von Tim13 stabilisiert wird. Tim13 ist nur dann importkompetent, wenn es in gestreckter denaturierter Konformation vorliegt. Nach der Importreaktion ist Tim13 dagegen gefaltet. Alle diese Beobachtung legen den Schluss nahe, dass die Faltung auf der Intermembranraumseite für die Translokationsreaktion notwendig ist und dieser Prozess mit der Bindung von Zinkionen durch Tim13 einhergeht. Mitochondrien, aus denen Zinkionen entfernt sind, sollten so nicht mehr in der Lage sein Tim13 zu importieren. Aus diesem Grund wurden Mitochondrien vor dem Import mit o-Phe behandelt oder ohne Chelator vorinkubiert. Wie Abbildung 3.7a zeigt, führte die Depletion von Zinkionen zu einer Abnahme von importiertem Tim13 um ca. 75%. Der Import konnte fast quantitativ wiederhergestellt (ca. 75% des Ausgangswerts), wenn den Mitochondrien nach der Behandlung mit Chelatoren wieder Zn^{2+} zugefügt wurde. Der Import von Tim13 ist demnach an die Anwesenheit von Zinkionen gebunden.

3.1.7.4 Die Faltung von Tim13 ist für die Translokation notwendig

Warum sind für den Tim13-Import Zinkionen notwendig? In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zinkionen die Faltung von Tim13 stabilisieren. Führt die Assemblierung des Kofaktors Zn^{2+} in Tim13 zu einer Faltung im Intermembranraum, die ein Zurückgleiten oder Wiederaustreten des Proteins ins Cytosol unmöglich macht, da Proteine den TOM-Komplex in gestreckter Konformation überqueren? Um diese Frage beantworten, wurde rekombinant gewonnenes Tim13 in Mitochondrien importiert (s. Abbildung 3.7b). Nicht importiertes Material wurde durch Behandlung mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die Mitochondrien mit oder ohne o-Phe reinkubiert. Nach erneuter Proteasebehandlung mit PK wurden die Mitochondrien reisoliert und die Proteine mittels Westernblot gegen Tim13 analysiert. In Abwesenheit von Chelatoren blieb das Signal von Tim13 während der Reinkubation stabil. In Anwesenheit des Chelators o-Phe dagegen verschwand das Tim13-Signal fast vollständig. Durch vorige Experimente ist bekannt, dass die Faltung von Tim13 durch Zinkionen stabilisiert wird und außerdem die Translokation des Proteins Zink abhängig ist. Vermutlich ist in diesem Experiment importiertes Tim13 durch Maskierung der Zinkionen entfaltet und exportiert worden, weshalb es proteasezugänglich wurde.

Um zu bestätigen, dass Tim13 in Abhängigkeit seiner durch Zn^{2+} -stabilisierten Faltung im Intermembranraum gehalten wird, wurde die Nachinkubation nicht in Anwesenheit von Chelatoren sondern von NEM durchgeführt (s. Abbildung 3.7c). Auch unter diesen Bedingungen verschwand das Signal von Tim13 durch die Reinkubation. NEM hatte vermutlich mit den Thiolgruppen von Tim13 reagiert, wodurch das Protein kein Zn^{2+} mehr koordinieren konnte.

Wird unter den oben genannten Bedingungen Tim13 exportiert? Und verlässt Tim13 den Intermembranraum durch den TOM-Komplex? Um den TOM-Komplex während der Reinkubation zu blockieren, wurden dem Reaktionsansatz verschiedene Mengen an pSu9-DHFR zugesetzt (s. Abbildung 3.7d). Steigende Men-

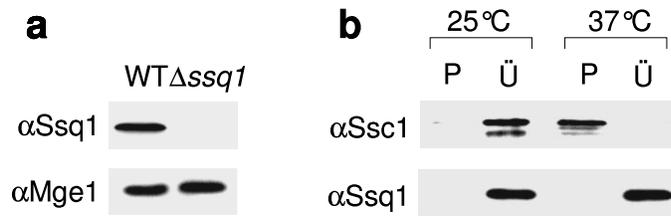


Abbildung 3.8 Das Ssq1-Antiserum zeigt keine Kreuzreaktion mit Ssc1.

(a) Westernblots von 50 μg Wildtyp-Mitochondrien oder Mitochondrien aus dem Δssq1 -Stamm wurden mit Antiseren gegen Ssq1 oder Mge1 dekoriert. **(b)** 50 μg Mitochondrien aus dem temperatursensitiven ssc1-3 -Stamm wurden für 10 min bei 25°C oder 37°C inkubiert, dann reisoliert und in 0,1% TX100, 150 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris/HCl pH 7,4 lysiert. Die Proben wurden für 10 min bei 30000 g zentrifugiert. Das Präzipitat (P) und der Überstand (Ü) wurden mittels Westernblot analysiert.

gen an pSu9-DHFR führten zu einem stabilen Signal von Tim13, obwohl die Mitochondrien während der Reinkubation mit α -Phe behandelt wurden. Demnach wird Tim13 durch den Zusatz von Chelatoren entfaltet und kann so den Inter-membranraum durch den TOM-Komplex verlassen.

3.2 Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese

Ssq1 und Jac1 aus *S. cerevisiae* sind Homologe der Proteine HscA und HscB aus dem Prokaryonten *A. vinelandii*. HscA ist ein Chaperon vom DnaK-Typ, HscB ist ein J-Typ Chaperon. Beide Proteine sind durch Gene des *isc*-Operons kodiert und spielen eine Rolle in der Assemblierung von Fe/S-Clustern. Eine direkte Beteiligung von Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese wurde bisher noch nicht gezeigt. Außerdem gibt es noch keinen Versuchsaufbau, mit dem es möglich ist die *in vitro*-Assemblierung von Fe/S-Clustern zu verfolgen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Chaperone Ssq1 und Jac1 eine Rolle in der Fe/S-Cluster-Biosynthese spielen.

3.2.1 Ssq1 interagiert mit Mge1

Das Hsp70-Chaperon Ssc1 ist für den Import und die Faltung von Matrixproteinen notwendig. Dabei wird die Bindung von ATP zu Ssc1 durch das GrpE-Homolog Mge1 reguliert, das als Nukleotid-Austauschfaktor fungiert [122, 63, 125, 105]. Um zu untersuchen, ob auch das mitochondriale Hsp70-Chaperon Ssq1 mit Mge1 interagiert, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Antikörper gegen die C-terminale Domäne von Ssq1 erzeugt, die nur geringe Sequenzhomologie zu Ssc1 zeigt. Um trotzdem Kreuzreaktionen mit dem Homolo-

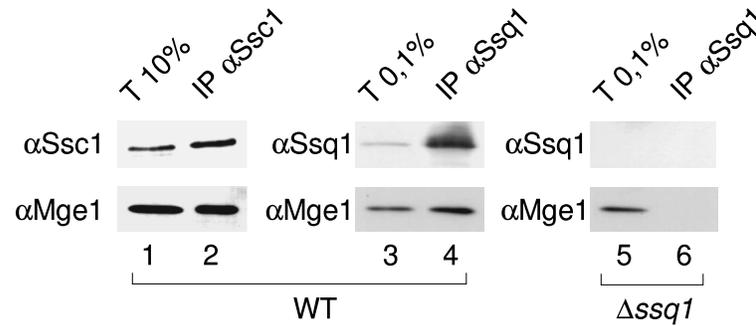


Abbildung 3.9 Ssq1 interagiert mit Mge1. Wildtyp- (1–4) oder Δ ssq1-Mitochondrien (5–6) wurden für 10 min bei 25°C mit 40 U/ml Apyrase inkubiert, um ATP zu depletieren. Die Mitochondrien wurden reisoliert, lysiert und dann für Koimmunpräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen Ssc1 bzw. Ssq1 eingesetzt. Zum Vergleich wurden 2,5 μ g Mitochondrien (10% bzw. 0,1% der eingesetzten Proteinmenge – T 10% bzw. T 0,1%) aufgetragen. Die Fällungen wurden durch Westernblots mit Antiseren gegen Ssc1, Ssq1 und Mge1 analysiert.

gen Ssc1 auszuschließen, wurde die Spezifität des generierten Antiserums für Ssq1 geprüft (s. Abbildung 3.8a/b). In Wildtyp-Mitochondrien wurde mit dem Serum gegen Ssq1 eine Bande bei ca. 70 kDa erhalten, die in Δ ssq1-Mitochondrien abwesend war. Als weitere Kontrolle wurden Mitochondrien aus dem temperatursensitiven Stamm *ssc1- β* bei 25°C oder 37°C inkubiert. In dieser Mutante aggregiert das Ssc1-Protein bei einer Temperatur von 37°C. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien lysiert und aggregierte Proteine durch Zentrifugation sedimentiert. Ssc1 aggregierte bei 37°C vollständig und war nur noch im Präzipitat nachweisbar. Ssq1 dagegen blieb vollständig im Überstand. Das Antiserum für Ssq1 war also spezifisch und reagierte nicht mit dem Ssc1-Homolog.

In Abbildung 3.9 sind Koimmunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Ssc1 und Ssq1 gezeigt. Dazu wurden Mitochondrien in einem Puffer mit Triton lysiert. Die Lyse wurde in Anwesenheit von Apyrase durchgeführt, um in den Mitochondrien vorhandenes ATP zu hydrolysieren. Das so erhaltene Lysat wurde für die Koimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt. Mge1 konnte sowohl mit Antiserum gegen Ssc1 als auch mit Serum gegen Ssq1 gefällt werden. Ca. 10% des gesamten Mge1 waren mit Ssc1 und ca. 0,3% mit Ssq1 assoziiert. Die Immunfällung war für die Interaktion zwischen Ssq1 und Mge1 spezifisch, da es bei der Verwendung von Mitochondrien aus dem Δ ssq1-Stamm nicht möglich war Mge1 zu fällen. Die kleine Menge an mit Ssq1 assoziiertem Mge1 ist wohl auf die geringe Abundanz von Ssq1 gegenüber Ssc1 zurückzuführen [120].

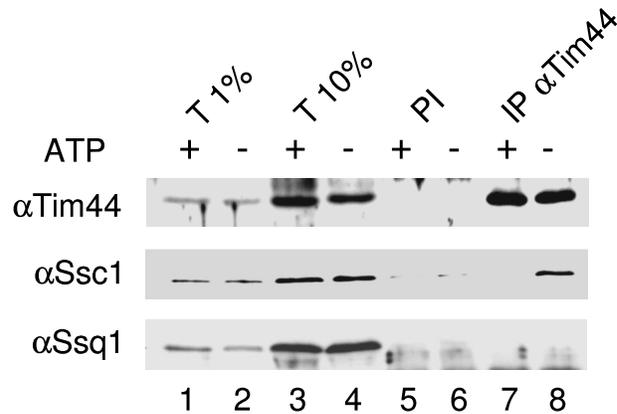


Abbildung 3.10 Ssq1 interagiert nicht mit Tim44. Wildtyp-Mitochondrien wurden für 10 min mit 40 U/ml Apyrase behandelt (ATP -) oder in Anwesenheit von 2 mM ATP inkubiert (ATP +). Die Mitochondrien wurden reisoliert und lysiert. Mit dem so erhaltenen Lysat wurden Fällungsreaktionen mit Antiserum gegen Tim44 (IP α Tim44) oder mit Präimmunserum (PI) durchgeführt. Zum Vergleich wurden 1% bzw. 10% der eingesetzten Menge an Mitochondrien (T 1% bzw. T 10%) aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch Westernblots gegen Tim44, Ssc1 und Ssq1.

3.2.2 Ssq1 interagiert nicht mit Tim44

Die Interaktion zwischen Ssc1 und Tim44 der TIM23-Translokase ist für den Import notwendig, damit Ssc1 die in die Matrix ankommenden Polypeptidketten binden kann [104]. Falls Ssq1 ähnliche Funktionen wie das Chaperon Ssc1 hat und am Import beteiligt ist, sollte es auch mit Tim44 interagieren. Um eine solche Wechselwirkung zu prüfen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Tim44 durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien in Anwesenheit von ATP oder Apyrase lysiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass Ssc1 mit einem Antiserum gegen Tim44 gefällt werden konnte. Die Interaktion zwischen Ssc1 und Tim44 war nur stabil, wenn ATP durch Apyrase hydrolysiert wurde. In Anwesenheit von ATP konnte kein Ssc1 gefällt werden. Im gleichen Experiment war es nicht möglich eine Interaktion zwischen Tim44 und Ssq1 nachzuweisen. Ssq1 scheint demnach keine Funktion im Proteinimport zu besitzen. Dies erklärt, warum Ssq1 auch nach Überexpression *SSQ1*-Mutanten nicht supprimieren kann [120].

3.2.3 Ssq1- und Jac1-Mutanten zeigen reduzierte SDH-Aktivität

Ssq1 ist homolog zu Proteinen, die eine Rolle in der bakteriellen Fe/S-Cluster-Biosynthese spielen. Vermutlich hat Ssq1 keine Funktion im Proteinimport, da es nicht mit Tim44 interagiert. In Deletionsmutanten von *SSQ1* wurden erniedrigte Enzymaktivitäten von Fe/S-Proteinen gemessen [113, 103]. Führt auch die

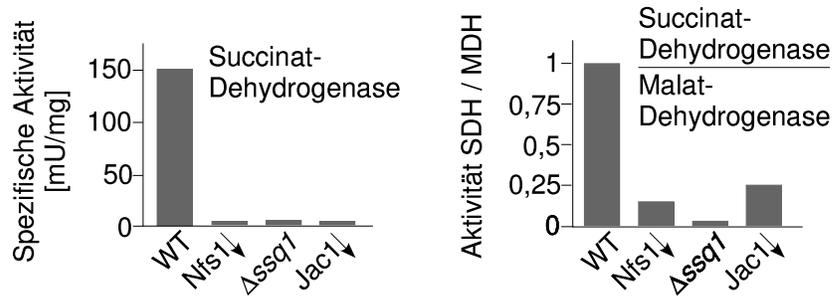


Abbildung 3.11 Deletion von *SSQ1* oder Depletion von *Jac1* führen zu verminderten Aktivitäten des mitochondrialen Fe/S-Enzyms SDH. Die Aktivitäten von SDH und MDH wurden in Wildtypmitochondrien (wt), von *Nfs1* depletierten Mitochondrien (*Nfs1*↓), Δ *ssq1*-Mitochondrien und von *Jac1* depletierten Mitochondrien (*Jac1*↓) bestimmt.

Depletion von *Jac1* zu erniedrigten Aktivitäten von Fe/S-Proteinen?

Um diese Frage zu beantworten, wurden in einem Δ *ssq1*-Stamm und in einem von *Jac1* depletierten Stamm¹ (*Jac1*↓-Stamm) die Enzymaktivitäten des Fe/S-Enzyms Succinat-Dehydrogenase (SDH) gemessen (s. Abbildung 3.11). Zum Vergleich wurden auch Messungen in Wildtyp-Mitochondrien durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden von *Nfs1* depletierte Mitochondrien (*Nfs1*↓-Mitochondrien) verwendet. *Nfs1* ist ein essentieller Faktor der Fe/S-Cluster-Biosynthese [53, 67]. Während die spezifische Aktivität in Wildtyp-Mitochondrien ca. 150 mU/mg betrug, war die Aktivität in allen drei Mutantenstämmen stark reduziert, unter 10 mU/mg. Auch das Verhältnis von SDH zu Malatdehydrogenase (MDH) – einem Enzym der mitochondrialen Matrix ohne Fe/S-Cluster – zeigte stark reduzierte Werte, maximal wurden 25% des Wildtypwerts erreicht. *Jac1* könnte demnach ebenfalls eine Rolle in der Fe/S-Cluster-Biosynthese spielen.

3.2.4 Apo- und Holo-Yah1 können durch Nativgelelektrophorese getrennt werden

Die Enzymaktivitäten von Fe/S-Proteinen lassen keine Aussagen über die Kinetik der Assemblierung von Fe/S-Clustern zu. Die beobachteten, reduzierten Enzymaktivitäten könnten auf einen Defekt der *SSQ1*- und *JAC1*-Mutanten in der Biosynthese von Fe/S-Clustern zurückzuführen sein. Fe/S-Proteine sind aber auch sehr sensitiv gegenüber oxidativem Stress. Die in vielen ISC-Mutanten beobachtete Akkumulation von Eisen in Mitochondrien kann, durch die Fentonreaktion

¹Da *JAC1* essentiell ist, war es nicht möglich einen Deletionsstamm zu generieren. Stattdessen wurde der endogene Promotor des Gens durch einen GAL10-Promotor ersetzt. Der GAL10-Promotor führt bei Anwesenheit von Galactose zur Expression des Gens. Bei Anzucht der Hefen in einem Medium mit Glucose, findet eine Repression des Gens statt und die Zellen können von *Jac1* depletiert werden.

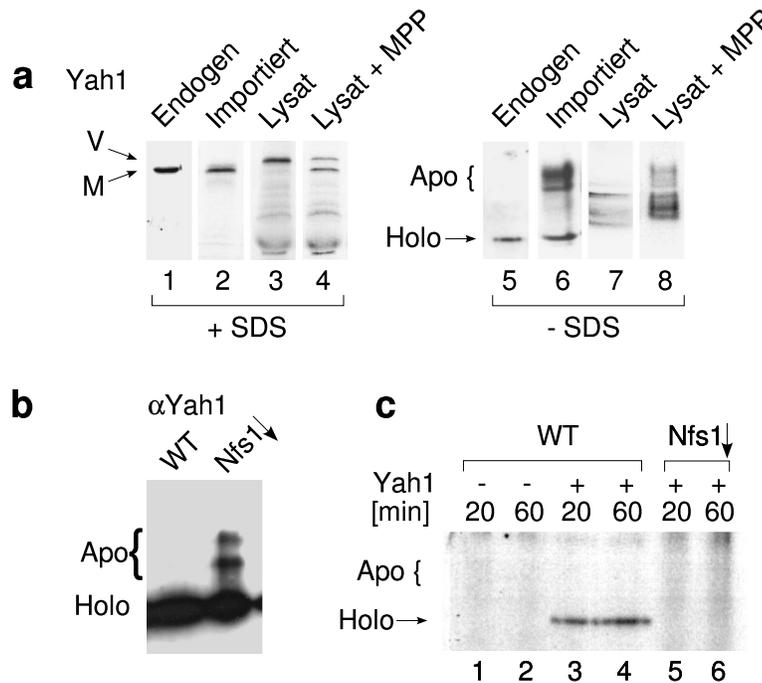


Abbildung 3.12 (a) Apo- und Holo-Form von Yah1 können durch ein Nativgelsystem getrennt werden. Laufverhalten von Yah1 im SDS-Gelsystem (1–4) oder Nativgelsystem ohne SDS (5–8). **Endogen:** 50 μg Mitochondrien wurden lysiert. Endogenes Yah1 wurde durch Westernblotanalyse nachgewiesen (1 und 5). **Importiert:** ^{35}S -markiertes Yah1 wurde in Mitochondrien importiert. Nach PK-Behandlung und Reisolierung der Mitochondrien wurden die Proteine durch Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert (2 und 6). **Lysat:** ^{35}S -markiertes Yah1 wurde direkt nach *in vitro*-Translation in Retikulozytenlysat aufgetrennt (3 und 7). **Lysat + MPP:** In Retikulozytenlysat synthetisiertes Yah1 wurde für 10 min bei 20°C mit isolierter MPP (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert (4 und 8). V – Vorstufen-Yah1, M – maturiertes Yah1, Apo – Apo-Yah1, Holo – Holo-Yah1. (b) In von Nfs1 depletierten Mitochondrien ist die Apo-Form von Yah1 nachweisbar. 50 μg Wildtyp-Mitochondrien (wt) oder von Nfs1 depletierten Mitochondrien (Nfs1↓) wurden mit Hilfe des Nativgelsystems aufgetrennt. Endogenes Yah1 wurde mittels Westernblot nachgewiesen. (d) Isolierte Mitochondrien können einen $\text{Fe}/^{35}\text{S}$ -Cluster in Yah1 assemblieren. 50 μg Wildtyp-Mitochondrien oder Nfs1↓-Mitochondrien wurden mit 20 μCi ^{35}S -Cystein versetzt und mit 0,15 nmol Yah1-Vorstufenprotein (1–2) oder ohne Protein (3–6) für 20 oder 60 min inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, lysiert und die Proteine mittels Nativgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet, die Proteine mit Hilfe von Autoradiographie analysiert.

katalysiert, zu erhöhtem oxidativen Stress führen. Durch die Fentonreaktion werden ausgehend von Superoxid Hydroxyradikale generiert [49]. Die erniedrigten Enzymaktivitäten in *SSQ1*- und *JAC1*-Mutanten mögen so auf eine durch oxidativen Stress verursachte Instabilität der Fe/S-Cluster zurückzuführen sein. Wie in Abschnitt 1.3 erläutert gibt es bisher keinen Versuchsaufbau, mit dem sich die Assemblierung von Fe/S-Clustern *in organello* beobachten lässt. Manche Ferredoxine lassen sich mit Hilfe eines Nativgelsystems in Apo- und Holo-Form auftrennen. Um eine Methode zu entwickeln, mit der sich die mitochondriale Assemblierung von Fe/S-Clustern beobachten lässt, wurde die Trennung der Apo- und Holo-Form von Yah1 durch ein Nativgelsystem untersucht. Yah1 ist ein Ferredoxin in der mitochondrialen Matrix.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Proben von Yah1 mit einem SDS- und einem Nativgel getrennt, wie in Abbildung 3.12 dargestellt. Zuerst wurden mitochondriale Proteine aufgetrennt und durch Westernblot gegen Yah1 analysiert. Das endogene Yah1 zeigte in beiden Gelsystemen eine diskrete Bande. Mitochondriales Yah1 sollte prozessiert sein und außerdem in der Holo-Form vorliegen. Als nächstes wurde durch *in vitro*-Translation generiertes und in Mitochondrien importiertes Yah1 aufgetragen. Im SDS-Gel resultierte das Protein ebenfalls in nur einer Bande, mit gleicher Laufhöhe wie das endogene Protein. Demnach wurde Yah1 im Importexperiment prozessiert. Im Gegensatz dazu waren im Nativgel drei Banden sichtbar: eine diskrete Bande gleicher Laufhöhe wie zuvor das endogene Yah1 und zwei diffusen, nahe beieinanderliegenden Banden geringerer Mobilität. Dieses Verhalten ist auch für bakterielles Ferredoxin bekannt: die Holo-Form läuft weiter als die Apo-Form und liegt außerdem als diskrete Bande vor. Durch Kofaktorbindung ist das Holo-Protein gefaltet, weshalb es schneller durch die Maschen des Polyacrylamidgels migriert als die nicht gefaltete Apo-Form. Die Apo-Form des bakteriellen Ferredoxins bildet unscharfe Banden [66]. Aus diesem Grund entsprach vermutlich auch die diskrete Bande des Yah1 der Holo-Form des Proteins. Die zwei diffusen Banden des importierten Yah1 entsprachen wohl prozessiertem Protein, das noch keinen Fe/S-Cluster erhielt. Als dritte Probe wurde Vorstufen-Yah1 auf die Gelsysteme aufgetragen. Im SDS-Gel wurde dadurch eine Bande erhalten, die einem höherem Molekulargewicht entsprach als dem endogenem bzw. importiertem Yah1. Die unterschiedlichen Laufhöhen sind durch den Größenunterschied zwischen Vorstufenprotein und maturierter Form erklärbar. Im Nativgelsystem wurde mit dem Vorstufenprotein keine der drei bisher sichtbaren Banden erhalten. Das Protein lief nicht in das Nativgel ein, vermutlich wegen des höheren pI-Werts im Vergleich zum prozessierten Protein. Zum Vergleich wurde prozessiertes Yah1 aufgetragen. Das prozessierte Protein war zuvor *in vitro* durch Inkubation von Vorstufen-Yah1 mit isolierter MPP erzeugt worden. Im SDS-Gel war die Bande niedrigen Molekulargewichts sichtbar, die von der Laufhöhe dem maturierten Protein entsprach. Im Nativgel waren nur die beiden diffusen Banden des Apo-Proteins sichtbar. Mit dem Nativgelsystem konnte demnach die Apo- und Holo-Form von Yah1 unterschieden werden.

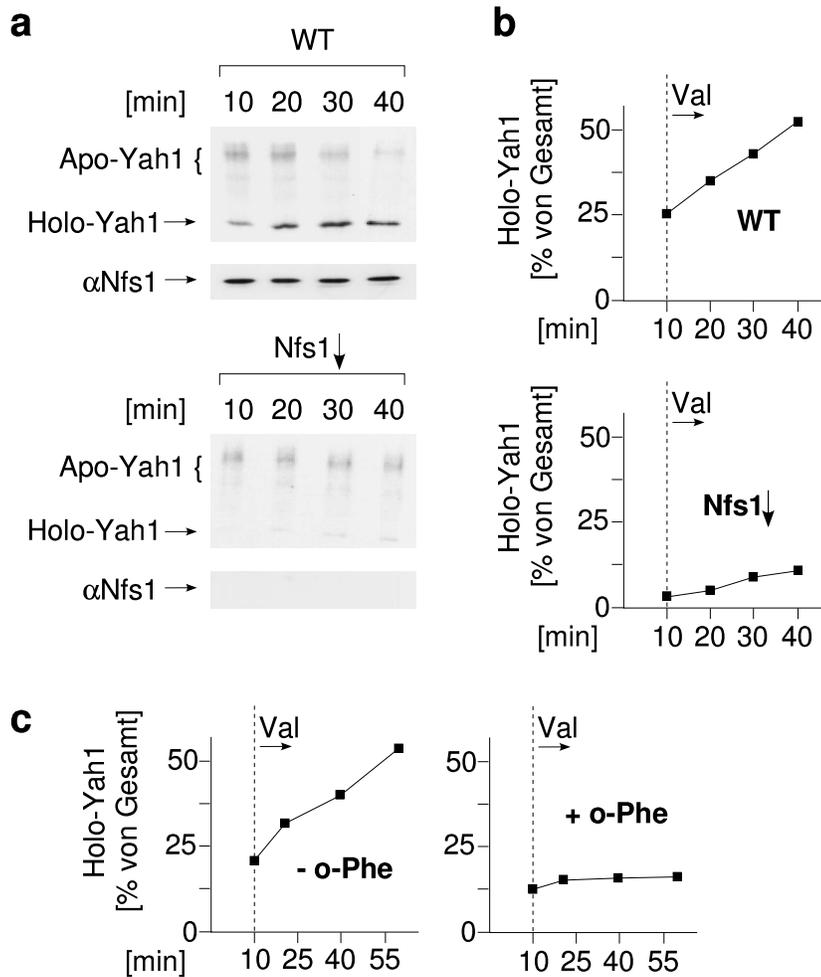


Abbildung 3.13 Kinetik der Fe/S-Cluster-Biosynthese **(a)** Vorstufen-Yah1 wurde für 10 min bei 20°C mit 50 μ g Mitochondrien (Wildtyp – wt bzw. in Nfs1 depletiert – Nfs1↓) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Valinomycin (Val) gestoppt. Die Mitochondrien wurden für die angegebenen Zeiten reinkubiert und dann reisoliert. Die Proteine wurden mittels Nativgelelektrophorese analysiert. Die An- bzw. Abwesenheit von Nfs1 wurde mit Westernblot geprüft. **(b)** Die durch Autoradiographie erhaltenen Banden unter (a) wurden quantifiziert. Die Verhältnisse von Holo-Yah1 zu importierten Protein wurden gegen die Zeit aufgetragen. **(c)** Yah1 wurde wie unter (a) importiert. Nach der Zugabe von Valinomycin wurden die Proben aufgeteilt. Ein Teil der Proben wurde auf 2 mM o-Phe eingestellt (+ o-Phe), der andere Teil blieb unbehandelt (- o-Phe).

Nfs1 ist für die Synthese von Fe/S-Clustern in Mitochondrien essentiell. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Depletion *in vivo* von Nfs1 zu einer Akkumulation von Apo-Yah1 führt, da dadurch kein Fe/S-Cluster in das Protein assembliert werden kann. Dazu wurden Proteine von Nfs1↓-Mitochondrien mit dem Nativgelsystem getrennt und mittels Westernblot gegen Yah1 analysiert. Durch Depletion von Nfs1 wurde auch das endogene Yah1 in drei Banden aufgetrennt, die der Apo- und Holo-Form des Proteins entsprachen (s. Abbildung 3.12c). Wildtyp-Mitochondrien zeigten wie erwartet nur die Bande der Holo-Form.

Import von Yah1 sollte in Anwesenheit von ^{35}S -Cystein zu einem radioaktiv markierten Fe/S-Cluster führen, da Nfs1 den für die Fe/S-Cluster-Biosynthese notwendigen Schwefel aus Cystein erhält. Falls die diskrete Bande des Nativgels wirklich der Holo-Form entspricht, sollte der Fe/ ^{35}S -Cluster durch Autoradiographie detektierbar sein. Zu diesem Zweck wurde nicht markiertes Yah1 in Anwesenheit von ^{35}S -Cystein in Mitochondrien importiert und anschließend mittels Nativgelelektrophorese analysiert. Abbildung 3.12d zeigt, dass bei Anwesenheit von Yah1 und ^{35}S -Cystein durch Autoradiographie eine Bande erhalten wurde. Die Laufhöhe dieser Bande entsprach der Laufhöhe von Holo-Yah1. Bei Abwesenheit von Yah1 oder bei Verwendung von Nfs1↓-Mitochondrien wurde kein Signal erhalten. Demzufolge wurde mit diesem Versuchsaufbau Yah1 importiert und durch MPP prozessiert. Anschließend wurde *in organello* ein Fe/S-Cluster in Yah1 assembliert.

3.2.5 Kinetik der Fe/S-Cluster-Biosynthese

Mit der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Technik ist es möglich Apo-Yah1 von Holo-Yah1 zu trennen. Nach einer typischen Importreaktion liegt Yah1 teilweise in Apo- und teilweise Holo-Form vor. Vermutlich liegt das daran, dass während des Experiments immer wieder neues Vorstufenprotein importiert wurde. Um kinetische Aussagen über die Konversion von Apo- zu Holo-Yah1 machen zu können, muss folglich die Importreaktion gestoppt werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein eine Abnahme der Apo- und eine Zunahme der Holo-Form zu beobachten. Aus diesem Grund wurde ein Versuchsaufbau gewählt, in dem Yah1 importiert und die Importreaktion dann durch Zugabe von Valinomycin gestoppt wurde. Danach wurden die Mitochondrien für verschiedene Zeiten reinkubiert und der Zustand des importierten Yah1-Proteins mittels Nativgel analysiert. In Abbildung 3.13a ist ein typisches Autoradiogramm gezeigt, in dem die Konversion von Apo- zu Holo-Yah1 zu sehen ist. Die Apo-Form nahm mit der Zeit ab, und immer mehr Holo-Protein wurde gebildet. Das gleiche Experiment wurde mit von Nfs1 depletierten Mitochondrien wiederholt. In diesem Versuch wurden nur Spuren von Holo-Yah1 gebildet. Nfs1 war im Westernblot nicht mehr nachweisbar.

In Abbildung 3.13b sind Diagramme mit dem Verhältnis von Holo- zu Gesamt-Ferredoxin gezeigt, das gegen die Zeit aufgetragen wurde. Nach 10 min, das war der Zeitpunkt an dem die Importreaktion abgebrochen wurde, lagen in den Wild-

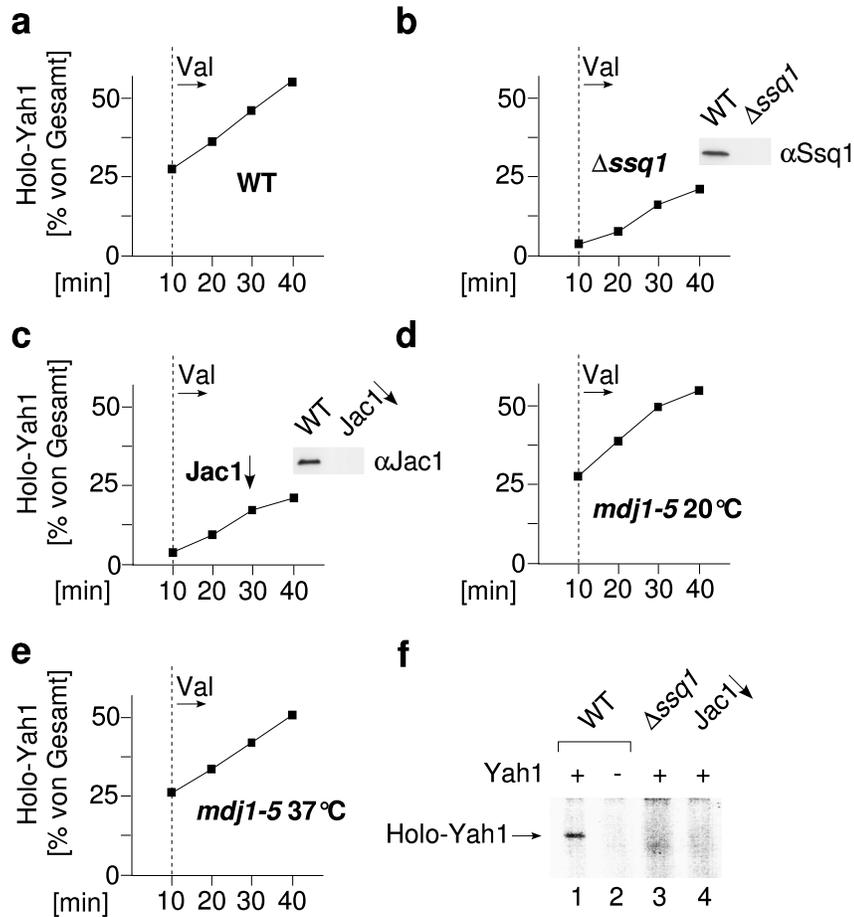


Abbildung 3.14 Ssq1 und Jac1 sind an der Assemblierung von Fe/S-Clustern beteiligt. **(a–e)** Yah1 wurde für 10 min bei 20°C mit 50 μg der angegebenen Mitochondrien (Jac1 \downarrow – von Jac1 depletiert) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von Valinomycin (Val) gestoppt. Die Proben wurden dann für die angegebenen Zeiten reinkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und die Proteine mittels Nativgelelektrophorese analysiert. **(f)** 50 μg der angegebenen Mitochondrien wurden für 60 min mit 0,15 nmol oder ohne Vorstufen-Yah1 in Anwesenheit von 20 μCi ^{35}S -Cystein inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und mittels Nativgelelektrophorese analysiert. Der Fe/ ^{35}S -Cluster wurde durch Autoradiographie detektiert.

typmitochondrien ca. 25% des Gesamtproteins als Holo-Form vor. Durch Reinkubation wurden innerhalb von 40 min weitere 25% des Proteins in die Holo-Form überführt, insgesamt wurde also in ca. 50% des importierten Proteins ein Fe/S-Cluster inseriert. In Mitochondrien, die von Nfs1 depletiert waren, lagen nach 10 min nur Spuren des Proteins in der Holo-Form vor, nach 40 min wurde nur in ca. 10% des Gesamtproteins ein Fe/S-Cluster inseriert. Der für die Mutante stark reduzierte Einbau von Fe/S-Clustern, spiegelt die essentielle Rolle von Nfs1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese wieder.

Um die Abhängigkeit des Versuchsaufbaus von der Anwesenheit von Eisenionen zu untersuchen, wurde nach dem Import von Yah1 in einen Teil der Proben *o*-Phe gegeben, das zweiwertiges Eisen maskiert. Wie Abbildung 3.13c zeigt, wurde die Fe/S-Cluster-Assemblierung durch die Zugabe von *o*-Phe sofort gestoppt.

3.2.6 *Ssq1* und *Jac1* sind für die Assemblierung von Fe/S-Clustern notwendig

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Versuchsaufbau bietet die Möglichkeit zu prüfen, welche Faktoren an der Assemblierung von Fe/S-Clustern beteiligt sind. Sowohl das mitochondriale Hsp70-Chaperon *Ssq1* als auch das DnaJ-Homolog *Jac1* sind Komponenten des ISC-Maschinerie. Bisher wurde für noch kein mitochondriales Chaperon eine Rolle in der Assemblierung von Fe/S-Clustern gezeigt. Aus diesem Grund wurde das in Abschnitt 3.2.5 beschriebene Experiment mit Δ *ssq1*-Mitochondrien und von *Jac1* depletierten Mitochondrien durchgeführt. *Ssq1* und *Jac1* waren in den Mitochondrien durch Westernblotanalyse nicht nachweisbar (s. Abbildung 3.14b/c). Für beide Mitochondrien war die Fe/S-Cluster-Assemblierung stark reduziert. Nach 10 min waren nur ca. 3% des importierten Ferredoxins in die Holo-Form überführt, wohingegen der Anteil in Wildtyp-Mitochondrien zu diesem Zeitpunkt bei 25% lag. Durch Nachinkubation für 40 min stieg das Verhältnis von Holo- zu Gesamt-Yah1 in Mitochondrien der Mutanten auf ca. 20%, zum gleichen Zeitpunkt wurden in Wildtyp-Mitochondrien über 50% von Yah1 in die Holo-Form überführt. Die Chaperone *Ssq1* und *Jac1* sind also für die Assemblierung von Fe/S-Clustern notwendig.

Ist der Defekt in der Fe/S-Cluster-Biosynthese für die beiden Chaperone *Ssq1* und *Jac1* spezifisch, oder sind für diesen Prozess auch andere Chaperone der Matrix notwendig? *Mdj1* ist wie *Jac1* ein DnaJ-Homolog, das zusammen mit *Ssc1* für die Faltung von Proteinen in der Matrix zuständig ist [98, 124]. In der temperatursensitiven Mutante *mdj1-5* lässt sich *Mdj1* durch Präinkubation der Mitochondrien bei 37°C inaktivieren. Es konnte kein Unterschied in der Fe/S-Cluster-Assemblierung für Mitochondrien vor oder nach der Induktion des Phänotyps festgestellt werden, wie Abbildung 3.13d/e zeigt. In beiden Fällen wurden Kinetiken erhalten, die der Wildtypsituation entsprachen. Für die Assemblierung von Fe/S-Clustern werden also spezifisch die Chaperone *Ssq1* und *Jac1* benötigt.

Obwohl die Fe/S-Cluster-Biosynthese für Δ *ssq1*- und von *Jac1* depletierten

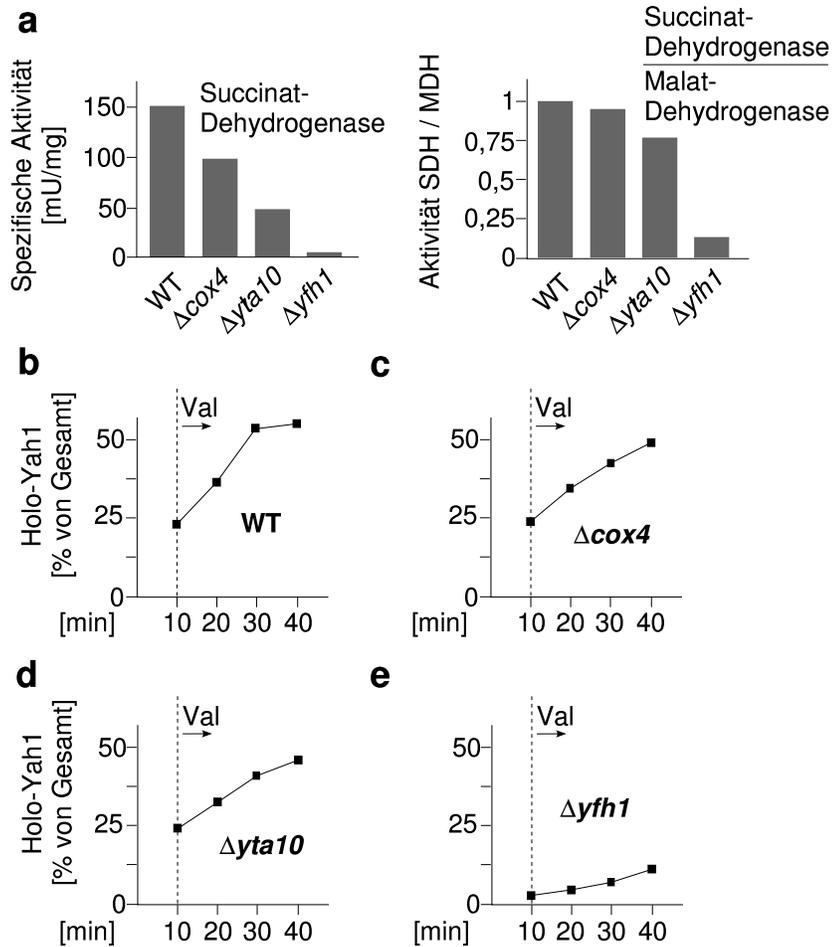


Abbildung 3.15 Yfh1 ist für die Fe/S-Cluster-Insertion in Yah1 notwendig. **(a)** Spezifische Enzymaktivitäten von SDH bzw. des Verhältnisses von SDH zu MDH in Mitochondrien der angegebenen Stämme. **(f)** Yah1 wurde für 10 min bei 20°C mit 50 μg der angegebenen Mitochondrien inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von Valinomycin (Val) gestoppt. Die Proben wurden dann für die angegebenen Zeiten reinkubiert. Die reisolierten Mitochondrien wurden mittels Nativgelelektrophorese analysiert.

Mitochondrien stark reduziert ist, lässt sich eine Konversion von Apo- zu Holo-Yah1 beobachten. Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass die geringen Mengen *in vitro* translatierten Yah1-Proteins durch noch in Spuren vorhandenes Jac1 konvertiert wurden. Um die Konversion größerer Mengen von Yah1 zu untersuchen wurde rekombinant gewonnenes Vorstufen-Yah1 in Gegenwart von ^{35}S -Cystein in Mitochondrien importiert. Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, konnte nur für Wildtyp-Mitochondrien der Einbau von Fe/ ^{35}S -Clustern nachgewiesen werden, für $\Delta ssq1$ - und von Jac1 depletierten Mitochondrien wurde kein Signal erhalten.

3.2.7 Yfh1 ist für die Assemblierung von Fe/S-Cluster notwendig

Sind die Beobachtungen in $\Delta ssq1$ - oder von Jac1 depletierten Mitochondrien spezifisch für Störungen der Fe/S-Cluster-Assemblierung? In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob in anderen Mutantenstämmen mit Defekten in der mitochondrialen Biogenese die Fe/S-Clustern-Assemblierung ebenfalls gehemmt ist. Zum einen wurde eine Deletionsmutante der Untereinheit 4 der Cytochrom c-Oxidase untersucht ($\Delta cox4$). In diesem Stamm ist die Atmungskette nicht funktionell, weshalb die Hefen nur in Gegenwart fermentierbarer Kohlenstoffquellen wachsen können [39]. Als zweite Kontrolle wurde eine Deletionsmutante in YTA10 getestet, in der die Atmungskette ebenfalls nicht funktionell ist. Yta10 ist eine Protease in der Innenmembran [5]. In beiden Fällen war das Verhältnis von SDH zu MDH im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. Diese Tendenz spiegelte sich in der Fe/S-Cluster-Biosynthese wieder, die Werte lagen insgesamt aber nur wenig unter denen des Wildtyps (s. Abbildung 3.15a–d). Obwohl beide Mutantenstämme, $\Delta cox4$ und $\Delta yta10$, starke mitochondriale Defekte haben, ist die Biogenese von Fe/S-Clustern kaum beeinträchtigt. Der Versuchsaufbau ist demnach für die Messung der Fe/S-Cluster-Assemblierung spezifisch.

Yfh1 aus *S. cerevisiae* ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und homolog zum humanen Frataxin. Mutationen in Frataxin können zur neurodegenerativen Krankheit Friedreich-Ataxie führen. Die Funktion von Yfh1 ist bisher nur wenig verstanden. Es scheint eine Rolle in der Eisenhomöostase zu besitzen, da Mutationen in dem Gen zur Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien führen können. Außerdem wurden in einem Deletionsstamm von Yfh1 erniedrigte Aktivitäten von Fe/S-Cluster-Proteinen gemessen [31, 94]. Eine direkte Rolle in der Assemblierung von Fe/S-Clustern konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Um die Funktion von Yfh1 zu untersuchen, wurde in $\Delta yfh1$ -Mitochondrien die Aktivität des Fe/S-Cluster-Proteins SDH gemessen. Die Mitochondrien zeigten stark reduzierte Aktivitäten des Enzyms (s. Abbildung 3.15e). Auch die Fe/S-Cluster-Assemblierung war in der Mutante stark gehemmt. So blieb der Anteil von Holo-Yah1 nach 40 min unter 12%, verglichen mit über 50% in Wildtyp-

Mitochondrien. Demnach ist Yfh1 direkt an der Biosynthese von Fe/S-Clustern beteiligt.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Import von Tim13 in den Intermembranraum

In der vorliegenden Arbeit wurde der Import von Tim13 untersucht. Tim13 gehört zu einer Gruppe von kleinen, löslichen Intermembranraumproteinen, die keine für mitochondriale Proteine typischen N-terminalen Präsequenzen besitzen. Der Importmechanismus dieser Intermembranraumproteine ist bisher kaum verstanden.

4.1.1 Translokation über den TOM-Komplex

Um die Translokation von Tim13 über die mitochondriale Außenmembran zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Importexperimente mit *in vitro* synthetisiertem Tim13 durchgeführt. Tim13 kann in isolierte Mitochondrien importiert werden und ist nach dem Import im Intermembranraum lokalisiert. Diese Daten stimmen mit vorigen Untersuchungen überein, in denen für Tim13 und den anderen kleinen Tim-Proteinen eine Lokalisation im Intermembranraum gezeigt wurde [56, 1, 57].

Die Rezeptorkomponenten Tom20 und Tom70 des TOM-Komplexes sind für die Translokation der kleinen Tim-Proteine nicht notwendig, da sich die Importeffizienzen von Tim9 und Tim13 in Mitochondrien aus $\Delta tom20$, $\Delta tom70$ - und Wildtypstämmen nicht unterscheiden [60]. Die Behandlung von Mitochondrien mit Trypsin, wodurch alle proteasezugänglichen Rezeptorkomponenten verdaut werden, führt ebenfalls nicht zu verminderten Import von Tim13 [70]. Ein von den TOM-Rezeptoren unabhängiger Proteinimport ist von nur sehr wenigen mitochondrialen Proteinen bekannt, sowohl die Translokation von Vorstufenproteinen mit N-terminalen Präsequenzen als auch der Import von Proteinen mit internen Importsequenzen sind in der Regel von den Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes abhängig. Eine Ausnahme bildet die Translokation von Apo-Cytochrom c in den Intermembranraum, die sich vom Import anderer mitochondrialer Proteine fundamental unterscheidet. Apo-Cytochrom c besitzt wie die

kleinen Tim-Proteine keine N-terminale Präsequenz und wird auch nicht prozessiert [27, 81]. Wie für Tim13 werden für den Import von Apo-Cytochrom c weder die proteasesensitiven Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes noch ATP benötigt [76, 115, 25].

Die *in vitro* Translokation von Apo-Cytochrom c wird durch Blockierung des TOM-Komplexes mit Porin nicht gehemmt, das Protein kann außerdem spontan in Lipiddoppelschichten inserieren [90, 45]. Aus diesen Gründen war lange Zeit unklar, ob der TOM-Komplex für den Import von Apo-Cytochrom c überhaupt notwendig ist. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der TOM-Komplex den Import von Apo-Cytochrom c vermittelt. So kann Apo-Cytochrom c in Lipidvesikel importiert werden, in denen Antikörper gegen das Protein eingeschlossen sind und der TOM-Komplex rekonstituiert ist [22]. Dabei wird das Protein über den TOM-Komplex in das Lumen der Vesikel importiert und durch die Interaktion mit den Antikörpern am Wiederaustritt gehindert. In diesem Versuchsaufbau konkurriert Apo-Cytochrom c nicht mit pSu9-DHFR um Translokationskomponenten. pSu9-DHFR enthält eine typische N-terminale Importsequenz und zeigt eine starke Interaktion mit dem TOM-Komplex [111]. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dass sich die Importwege von Apo-Cytochrom c und pSu9-DHFR über den TOM-Komplex unterscheiden und die zwei Poren des Komplexes zwei Translokationswege für unterschiedliche Vorstufenproteine widerspiegeln; eine Pore für Vorstufenproteine mit N-terminaler Präsequenz, die zweite Pore für Proteine wie Apo-Cytochrom c ohne Präsequenz [22]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kompetition von Tim13 und pSu9-DHFR um Translokationskomponenten gezeigt werden, obwohl Tim13 wie Apo-Cytochrom c keine N-terminale Präsequenz besitzt. Vergleicht man die Translokation von Tim13 und Apo-Cytochrom c über die Außenmembran, lassen sich folgende Aussagen treffen: Beide Proteine werden unabhängig von den Rezeptorkomponenten über den TOM-Komplex importiert. Obwohl beides kleine Intermembranraumproteine ohne N-terminale Präsequenz sind, unterscheiden sich ihre Wege über den TOM-Komplex. Tim13 wird über einen zumindest teilweise identischen Translokationsweg wie Vorstufenproteine mit N-terminaler Präsequenz importiert, Apo-Cytochrom c dagegen über einen anderen Weg.

4.1.2 Import in den Intermembranraum

Wie schon aus früheren Studien bekannt, ist der Import der kleinen Tim-Proteine vom Membranpotential unabhängig [55, 56]. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass der Import von Tim13 auch kein ATP benötigt. Es gibt also keine Komponente, die ATP abhängig die in den Intermembranraum ankommende Polypeptidkette von Tim13 bindet und so ein Zurückgleiten des Proteins verhindert. Gibt es einen Faktor im Intermembranraum, der Tim13-unabhängig von ATP bindet? So wurde beispielsweise für den Import von Apo-Cytochrom c vorgeschlagen, dass CCHL als Rezeptor der *trans*-Seite fungiert und die Interakti-

on von Apo-Cytochrom *c* zu CCHL für die Translokation des Proteins notwendig ist [76]. In den Intermembranraum ankommende Polypeptidketten von Transporterproteinen ohne Präsequenz werden vom Tim9/10-Komplex gebunden und dann auf den TIM22-Komplex übertragen [57, 55, 1, 109, 110]. Eine gleiche Funktion übt der Tim8/13-Komplex für den Import für Tim23 aus [87]. Auch wenn die genannten Beispiele sehr unterschiedliche Proteine und Importwege aufzeigen, wird in allen Fällen ein durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum ankommendes Protein gebunden, das dann nicht mehr zurückgleiten kann. Endogenes Tim13 ist im löslichen, heterooligomeren Tim8/13-Komplex lokalisiert. Dieser Komplex, oder eine unvollständig assemblierte Form davon, könnte für Tim13 als Rezeptor fungieren. In dieser Arbeit wurde aber gezeigt, dass der Tim8/13-Komplex für die Translokation von Tim13 nicht notwendig ist, da die Importraten für Wildtyp- und $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Mitochondrien gleich sind. Es ist außerdem möglich rekombinant gewonnenes Tim13 in Mitochondrien des $\Delta tim8/\Delta tim13$ -Stamms zu importieren. Alle diese Beobachtungen deuten auf eine Translokation von Tim13 hin, die unabhängig von der Anwesenheit eines Akzeptors auf der Intermembranraumseite abläuft.

CCHL und CC₁HL sind die bisher einzigen bekannten Intermembranraumproteine, die unabhängig vom Membranpotential, von ATP und einem Rezeptor der *trans*-Seite importiert werden. Diese Proteine sind allerdings, im Gegensatz zu Tim13, mit der Innenmembran assoziiert und nicht frei löslich. Diese Interaktion mit der Innenmembran könnte genügen, um die Proteine während der Importreaktion im Intermembranraum zu fixieren. CCHL und CC₁HL falten sich während der Importreaktion und bilden im Intermembranraum eine proteaseresistente Domäne aus. Aus diesem Grund wurde für diese Proteine untersucht, ob die Faltung auf der *trans*-Seite eine Rolle für den Import spielt, indem sie ein Zurückgleiten der Polypeptidkette verhindert. Dieses Importmodell wurde für beide Proteine verworfen, da es möglich ist, die gefalteten, proteaseresistenten Domänen in isolierte Mitochondrien zu importieren [69, 112]. Für Tim13 ist dieses Modell trotzdem interessant, da keine Interaktion des Proteins zur Innenmembran besteht. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Cysteine von Tim13 für die Translokation des Proteins notwendig sind, da weder durch NEM modifiziertes Protein noch Tim13 mit Cystein-zu-Serin-Punktmutationen in Mitochondrien importiert werden. Das Cysteinmotiv könnte entweder für die Bindung von Metallionen oder die Ausbildung von Disulfidbrücken notwendig sein. Beides sind Prozesse, die häufig an der Faltung von Proteinen beteiligt sind. Ist die Faltung von Tim13 auf der *trans*-Seite für den Import des Proteins essentiell? Eine ähnliche Beobachtung wurde für den Import von Apo-Cytochrom *c* gemacht, dessen Holo-Form Häm bindet. Apo-Cytochrom *c*, dem die Häm-Bindungsstelle fehlt, wird deutlich schlechter importiert als das Wildtypprotein [26].

Abgesehen von der Faltung könnten die eingeführten Punktmutationen in Tim13 auch eine Signalsequenz stören, die für den Import des Proteins notwendig ist. Aus verschiedenen Gründen ist dies unwahrscheinlich: schon eine einzige Punkt-

mutation von Cystein zu Serin genügt, um den Import von Tim13 vollständig zu hemmen (trifft auf Positionen 57 und 73 zu); Cystein trägt weder eine Ladung noch hat es eine lipophile Seitenkette, wie es für Aminosäuren von Signalsequenzen üblich ist [121]; für den Austritt von Tim13 durch den TOM-Komplex sind die Cysteine nicht notwendig, da NEM modifiziertes Tim13 aus dem Intermembranraum herausdiffundieren kann.

4.1.3 Oxidationszustand, Zinkbindung und Faltung von Tim13

Die Cysteine des endogenen Tim13 lassen sich vollständig mit AMS modifizieren und liegen folglich in reduzierter Form vor. Im Gegensatz dazu wurden in vorigen Arbeiten Disulfidbrücken in den kleinen Tim-Proteinen nachgewiesen [18, 19]. Diese Daten wurden aus Experimenten mit Intermembranraumfraktionen isolierter Mitochondrien erhalten. Die Proteine dieser Fraktionen wurden dabei mit für Thiolgruppen spezifischen Reagenzien modifiziert. Die Isolierung von Mitochondrien dauert in der Regel mehrere Stunden, in denen Kontakt zu Luftsauerstoff besteht. Da die kleinen Tim-Proteine oxidationsempfindlich sind (vgl. Abschnitt 3.1.4), liegen sie in aufgearbeiteten Intermembranraumfraktionen vermutlich durch Luftsauerstoff oxidiert vor. Weiterhin kann bei einer Derivatisierungsreaktion in Gegenwart von Luftsauerstoff, die in der Regel ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur ausgeführt werden muss, eine Bildung von Disulfidbrücken in Tim13 nicht ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde eine Oxidation von Tim13 vermieden, indem die Derivatisierungsreaktion mit AMS unter Stickstoff durchgeführt wurde. Außerdem wurden für die Reaktion Sphäroplasten an Stelle isolierter Mitochondrien verwendet, wodurch eine Oxidation während der Mitochondrienpräparation ausgeschlossen wurde.

Rekombinant exprimiertes und gereinigtes MBP-Tim13 bindet Zink. Tim13 sollte eigentlich ein Mol Zink pro Mol Protein binden, da Zn^{2+} vier Liganden beansprucht und Tim13 vier Cysteine besitzt. Das relativ niedrige molare Verhältnis Zink zu Protein von ca. 0,25 beruht wohl auf der starken Überexpression von MBP-Tim13 im *E. coli*-System. In Zellen kommt Zn^{2+} nicht in freier Form vor, weshalb bei starker Überexpression eines Zink bindenden Proteins die Verfügbarkeit von Zn^{2+} als limitierender Faktor angesehen werden muss. Das Bindungsverhältnis lässt sich erhöhen, indem während der Aufreinigung des Proteins Zinkacetat zugegeben wird. Das Verhältnis von 0,25 entspricht also nicht dem gesättigten Zustand von Tim13.

Sowohl endogenes als auch rekombinantes Tim13 besitzen eine proteaseresistente Domäne, die das Cysteinmotiv beinhaltet. Die Proteaseresistenz dieser Domäne deutet auf eine stabile Faltung des Proteins hin. Für die Faltung ist das Cysteinmotiv notwendig, da in rekombinantem MBP-Tim13^{SSSS} die Domäne voll proteasezugänglich ist. Die Faltung von rekombinantem Tim13 wird außerdem durch Zinkionen stabilisiert, da die durch Proteasebehandlung entstehenden

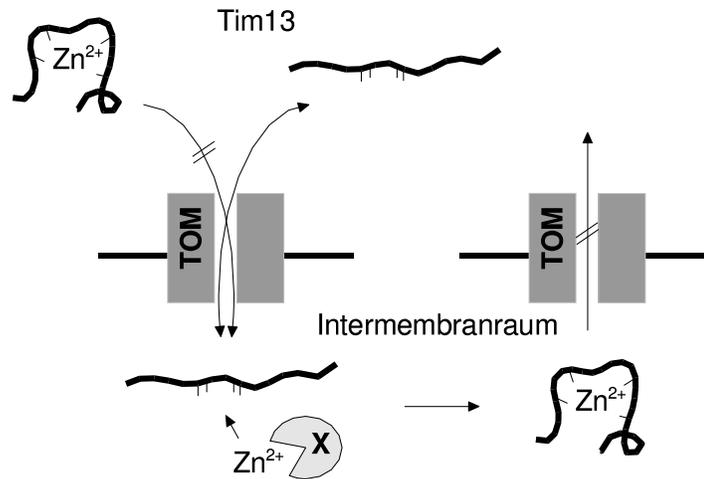


Abbildung 4.1 Tim13 gelangt über den TOM-Komplex in den Intermembranraum von Mitochondrien. Im Intermembranraum wird der Kofaktor Zn^{2+} durch ein bis *dato* nicht bekanntes Metallochaperon (X) in Tim13 assembliert, wodurch sich das Protein faltet. Tim13 kann nur im entfalteten Zustand den TOM-Komplex überqueren. Aus diesem Grund kann das gefaltete Protein nicht mehr aus dem Intermembranraum austreten. Durch die Kofaktorassemblierung wird das Gleichgewicht „Tim13 im Cytosol/Tim13 im Intermembranraum“ auf die Seite des Intermembranraums verschoben.

Fragmente von Tim13 durch Zusatz von Zn^{2+} -spezifischen Chelatoren destabilisiert werden.

Die für rekombinantes und endogenes Tim13 bestehende Faltung bildet sich auch während des *in vitro*-Imports von Tim13 aus. Vor dem Import liegt Tim13 ungefaltet vor, nach dem Import können die proteaseresistenten Fragmente von Tim13 nachgewiesen werden. Tim13 mit Cystein-zu-Serin-Punktmutationen kann nicht mehr in Mitochondrien importiert werden und auch keine Fragmente ausbilden. Wird Tim13 nach der Translokation in den Intermembranraum durch Faltung von einem Wiederaustritt ins Cytosol abgehalten?

4.1.4 Kofaktorassemblierung und Proteinimport

Der Import von Tim13 in isolierte Mitochondrien wird durch Depletion von Metallionen durch Chelatoren stark reduziert und kann durch Zugabe von Zinkionen wiederhergestellt werden. Für den Import muss das Protein in gestreckter Konformation vorliegen, gefaltetes Protein wird nicht importiert. Durch Reinkubation von Mitochondrien in Anwesenheit von Chelatoren tritt zuvor importiertes Tim13 wieder vollständig aus den Mitochondrien aus. Dieser „Proteinexport“ tritt auch dann auf, wenn Mitochondrien nach dem Import von Tim13 in Anwesenheit von NEM reinkubiert werden. Tim13 tritt durch den TOM-Komplex aus, da der Zu-

satz von rekombinanten gereinigtem pSu9-DHFR zum Reaktionsansatz den Austritt von Tim13 aus den Mitochondrien blockiert.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wird für den Import von Tim13 das in Abbildung 4.1 gezeigte Modell vorgeschlagen: Tim13 gelangt in entfaltetem Zustand über den TOM-Komplex in den Intermembranraum von Mitochondrien. In gestrecktem Zustand ist ein Wiederaustritt ins Cytosol möglich. Im Intermembranraum wird in Tim13 der Kofaktor Zn^{2+} assembliert, wodurch sich das Protein faltet. Die Insertion des Metalls muss durch ein bis *dato* unbekanntes Metallochaperon vermittelt werden, da Zinkionen in der Zelle nicht in freier Form vorkommen [86]. Die Faltung von Tim13 hindert das Protein an einem Wiederaustritt ins Cytosol durch den TOM-Komplex. Aufgrund der Kofaktorassemblierung und Faltung von Tim13 wird das Gleichgewicht „Tim13 im Cytosol/Tim13 im Intermembranraum“ auf die Intermembranraumseite verschoben. Dieses *Folding-trap*-Modell steht im Einklang mit einem *Brownian Ratchet*-Mechanismus. Dabei gelangen Proteine allein durch die Brownsche Molekularbewegung über Translokationsporen. Da durch die Brownsche Molekularbewegung nach dem Zweiten Hauptsatz der Thermodynamik keine Arbeit verrichtet werden kann, muss die Translokation durch chemische Asymmetrie der *cis*- und *trans*-Seite zu Stande kommen [108]. Im Fall des Tim13-Imports würde diese Asymmetrie auf der Anwesenheit des Metallochaperons und die dadurch bedingte Faltung des Proteins beruhen.

Ein solches *Folding-trap*-Modell ist bisher noch nicht beschrieben worden. Kürzlich wurde für Sod1, einem Kupfer und Zink bindenden Protein im Intermembranraum von Mitochondrien, ein ähnlicher Importmechanismus vorgeschlagen. Sod1 erhält Kupfer von dem Metallochaperon CCS und Zink von einem nicht bekannten Faktor. Die Holo-Form von Sod1 kann genau wie die Holo-Form von Tim13 nicht in Mitochondrien importiert werden. Im Unterschied zum Tim13-Import werden für die Translokation von Sod1 konservierte Cysteinreste benötigt, die während der Assemblierung von Kupfer in Sod1 intermolekulare, transiente Disulfidbrücken zu CSS bilden [30]. Liegt Sod1 vollständig assembliert und gefaltet im Intermembranraum vor, kann es nicht mehr durch den TOM-Komplex austreten.

Viele der bisher bekannten Intermembranraumproteine sind klein, besitzen keine Präsequenz und binden Kofaktoren. Für die Translokation von Tim13 ist die Assemblierung des Kofaktors Zn^{2+} notwendig. Die Kofaktorinsertion scheint auch für den Import von Apo-Cytochrom c und Sod1 eine Rolle zu spielen. Vielleicht trifft das *Folding-trap*-Modell allgemein auf Kofaktor bindende Proteine des Intermembranraums zu, was in zukünftigen Arbeiten zu zeigen ist. Es wäre außerdem interessant, das Metallochaperon, das während der Importreaktion für die Insertion von Zn^{2+} in die kleinen Tim-Proteine verantwortlich ist, zu identifizieren. Dieses Protein sollte eine essentielle Komponente des Intermembranraums sein, da auch der Tim9/10-Komplex essentiell ist.

4.2 Fe/S-Cluster Assemblierung in Mitochondrien

4.2.1 Ssq1, Jac1 und Mge1 als Hsp70-Chaperonsystem

Die Rolle von Chaperonen in der Assemblierung von Fe/S-Clustern ist bisher wenig verstanden. In *S. cerevisiae* sind alle Komponenten der ISC-Maschinerie in der Matrix von Mitochondrien lokalisiert, inklusive dem Hsp70-Chaperon Ssq1 und dem J-Typ-Chaperon Jac1. Neben Ssq1 sind Ssc1 und Ecm10 weitere Hsp70-Chaperone der mitochondrialen Matrix. Ssc1 bindet über den TIM23-Komplex ankommende Polypeptidketten und treibt so ihre Translokation voran. Es ist aber auch für die Faltung neu importierter Proteine verantwortlich [85, 46].

Die Rolle von Hsp70-Chaperonen in der Faltung von Proteinen ist am besten für das bakterielle Chaperon DnaK und seinen Kofaktoren DnaJ und GrpE verstanden. Vermutlich bindet in diesem Prozess zuerst das Kochaperon DnaJ die ungefaltete Polypeptidkette des Substrats und reicht sie an DnaK weiter. Durch die Interaktion von DnaJ mit DnaK wird die ATPase-Aktivität von DnaK stimuliert, wodurch es in die ADP-Form überführt wird und das Substrat fest bindet. Die Interaktion von DnaJ mit DnaK führt zu einem ternären Komplex, der DnaK, DnaJ und das Substrat beinhaltet. Mit Hilfe des Nukleotidaustauschfaktors GrpE dissoziiert ADP von DnaK, wodurch der ternäre Komplex zerfällt und der Zyklus von vorne beginnen kann. Mit jedem Zyklus wird ein Teil des Substrats in die gefaltete Form überführt [38]. In Mitochondrien aus *S. cerevisiae* ist das zu DnaK/DnaJ homologe Chaperonsystem Ssc1/Mdj1 an der Faltung von Proteinen beteiligt [98, 124]. Als Nukleotidaustauschfaktor fungiert das GrpE-Homolog Mge1 [125]. In dieser Arbeit wurde auch eine Bindung von Mge1 durch Ssq1 gezeigt. Ssq1 interagiert aber nicht wie Ssc1 mit Tim44. Da die Interaktion von Ssc1 mit Tim44 für die Funktion im Proteinimport benötigt wird, ist die Beteiligung von Ssq1 an der Translokation von Proteinen unwahrscheinlich. Aus diesen Gründen bilden vermutlich Ssq1 und Jac1 zusammen mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 ein Hsp70-Chaperonsystem, das an der Faltung von Polypeptidketten beteiligt ist.

4.2.2 *In vitro*-Assemblierung des Fe/S-Clusters von Yah1

Wie lässt sich die Assemblierung von Fe/S-Clustern beobachten? Eine wichtige Methode zur Strukturaufklärung von Fe/S-Clustern in Proteinen ist die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie). Für diese Methode sind aufgereinigte Fe/S-Proteine notwendig, weshalb die Messung der Fe/S-Cluster-Assemblierung in Zellorganellen nicht möglich ist. Eine von Kispal *et al.* etablierte *in vivo*-Methode beruht auf der Inkorporation von ^{55}Fe in Fe/S-Cluster-Proteine [53]. Dabei wird eine Hefekultur kurzzeitig mit ^{55}Fe inkubiert. Danach werden die Zellen geöffnet und das zu analysierende Protein mittels Koimmun-

präzipitation gefällt. Anschließend wird die Radioaktivität in den Proben gemessen, die den *in vivo*-Einbau von Eisen in die Proteine reflektiert. Diese Methode hat zum Nachteil, dass Unterschiede in der Eisenhomöostase verschiedener Hefestämme mitberücksichtigt werden müssen. Ein verringerter Einbau von Eisen in Apo-Proteine kann neben Defekten in der Fe/S-Cluster-Biosynthese auch auf eine geringere Verfügbarkeit des Metalls hindeuten. Gerade Mutationen in Genen der ISC-Maschinerie führen oft zu einer Akkumulation von Eisen in Mitochondrien und einem Absinken der Konzentration im Cytosol.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbau lässt sich die Assemblierung von Fe/S-Clustern in der mitochondrialen Matrix direkt beobachten. Dabei wird ausgenutzt, dass sich Apo- und Holo-Form von Yah1 in einem Nativgel auftrennen lassen. Für das Experiment wird Vorstufen-Yah1 in isolierte Mitochondrien importiert. Nach der Prozessierung von Yah1 in der Matrix wird durch die ISC-Maschinerie ein Fe/S-Cluster in das Apo-Protein assembliert. Wird der Import gestoppt, nimmt die Apo-Form von Yah1 mit der Zeit ab und die Holo-Form zu. Das Experiment kann in zwei Varianten durchgeführt werden. In der ersten Variante wird radioaktiv markiertes Ferredoxin in Mitochondrien importiert. Die Apo-zu-Holo-Konversion lässt sich nach gelelektrophoretischer Trennung von Apo- und Holo-Yah1 durch Autoradiographie analysieren. In einer zweiten Variante wird nicht markiertes, rekombinant gewonnenes Apo-Yah1 in Anwesenheit von ^{35}S -Cystein in Mitochondrien importiert. Da Nfs1 den Schwefel für die Fe/S-Cluster-Biosynthese durch Desulfurierung von Cystein gewinnt, kann später ein Fe/ ^{35}S -Cluster in Holo-Yah1 durch Autoradiographie detektiert werden.

Mit letzterer Methode werden mehrere Nanogramm Vorstufen-Yah1 in Mitochondrien importiert. Dadurch ist sowohl die Import- als auch die ISC-Maschinerie gesättigt und es können auch weniger starke Defekte in der Fe/S-Cluster-Assemblierung beobachtet werden. Beispielsweise waren die Defekte in der Fe/S-Cluster-Biosynthese in Mitochondrien der *SSQ1*-Deletionsmutante mit radiochemischen Mengen an Yah1 moderat. Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung von rekombinant gewonnenem Yah1 überhaupt keine Fe/S-Cluster-Assemblierung in Δ *ssq1*-Mitochondrien beobachtet werden.

4.2.3 Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion von SSQ1 oder die Depletion von Jac1 zu verminderten Aktivitäten von Fe/S-Enzymen in der mitochondrialen Matrix führt. Um die Involvierung der beiden Komponenten in der Biosynthese von Fe/S-Clustern direkt zu zeigen, wurde die Fe/S-Cluster-Assemblierung von Yah1 in Mitochondrien aus beiden Mutantenstämmen untersucht. Sowohl die Deletion von SSQ1 als auch die Depletion von Jac1 führen zu starken Defekten in der mitochondrialen Fe/S-Cluster-Assemblierung. Beide Proteine sind demzufolge funktionelle Komponenten der ISC-Maschinerie. Für beide Mutantenstämmen wurden noch Restaktivitäten der Fe/S-Cluster-Assemblierung beobachtet. SSQ1 ist ein

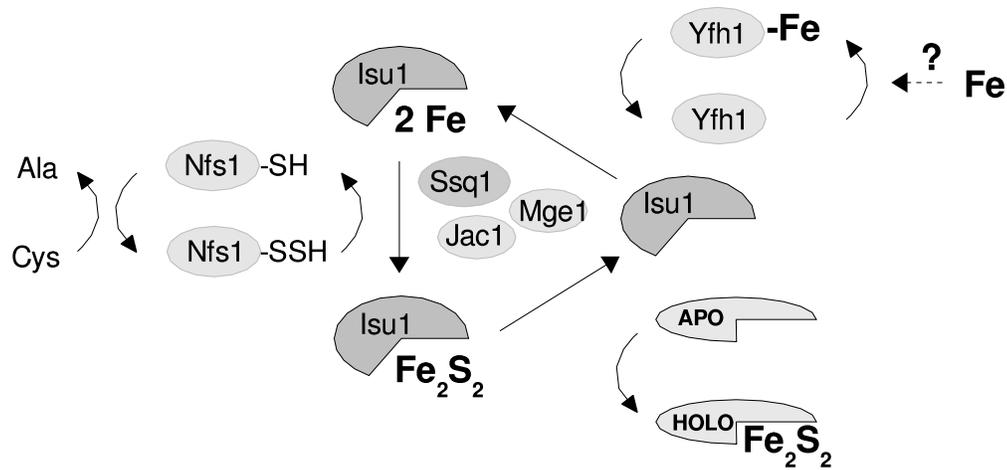


Abbildung 4.2 Durch die Komponenten der ISC-Maschinerie wird in Isu1 schrittweise ein Fe/S-Cluster assembliert und auf ein Apo-Protein übertragen. Eisen wird dabei vom Frataxin-Homolog Yfh1 zur Verfügung gestellt, Schwefel wird durch Desulfurierung von Cystein durch Nfs1 gewonnen. Isu1 ist Substrat des Hsp70-Chaperonsystems Ssq1/Jac1 mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1. Bisher ist nicht bekannt, für welchen der Schritte (Bindung von Eisen, Präassemblierung des Fe/S-Clusters oder Transfer des Clusters auf das Apo-Protein) die Interaktion von Isu1 mit dem Chaperonsystem notwendig ist.

nicht essentielles Gen und vielleicht kann seine Funktion von einem anderen Hsp70-Chaperon der Matrix, Ssc1 oder Ecm10, zumindest teilweise übernommen werden. Die Restaktivität der Fe/S-Cluster-Assemblierung im Jac1-Depletionsstamm ist vermutlich auf Spuren des Proteins zurückzuführen, die trotz Repression des Gens übriggeblieben und mit Westenblotanalyse nicht mehr detektierbar waren.

Die Funktion von Ssq1 und Jac1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese ist auch in späteren Arbeiten untersucht worden [119, 51, 28]. In einer Studie von Voisine *et al.* wurden für die oben beschriebenen Mutanten ebenfalls erniedrigte Enzymaktivitäten von Fe/S-Proteinen gemessen. Gleichzeitig wurde eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien beobachtet, wie es für viele Mutanten der ISC-Maschinerie der Fall ist. Die Reduktion der Enzymaktivitäten wurde auch dann gemessen, wenn der Eisengehalt der Mitochondrien durch Anzucht der Hefen in einem Eisenmangelmedium auf Wildtypniveau gehalten wurde. Die erniedrigte Aktivität war so nicht auf erhöhten oxidativen Stress durch freie Eisenionen in der Matrix zurückzuführen [119].

Welche Funktion könnten die Chaperone Ssq1 und Jac1 in der Assemblierung von Fe/S-Clustern haben? Ein Modell der Fe/S-Cluster-Biosynthese ist, dass der Fe/S-Cluster in einer Komponente der Biosynthesemaschinerie präassembliert und dann auf Apo-Proteine übertragen wird. Sowohl die bakteriellen Proteine NifU und IscA als auch Isu1 aus *S. pombe* sind in der Lage *in vitro* einen labilen Fe/S-Cluster zu assemblieren und auf Apo-Ferredoxin zu übertragen. In einer kürzlich

veröffentlichen Studie in *S. cerevisiae* zeigten Dutkiewicz *et al.*, dass Jac1 und Isu1 *in vitro* die ATPase-Aktivität von Ssq1 stimulieren. Außerdem ermöglicht Jac1 die Interaktion von Isu1 mit Ssq1. Demnach ist Isu1 Substrat des Chaperonsystems Ssq1/Jac1. In Isu1 könnte *in vivo* ein Fe/S-Cluster präassembliert und dann chaperonvermittelt auf ein Apo-Protein übertragen werden [28]. Die Funktionsweise der Chaperone in diesem Prozess ist noch unbekannt. Die Assemblierung eines Fe/S-Clusters in Isu1 und die Übertragung des Clusters auf ein Apo-Protein sind wahrscheinlich mit Konformationsänderungen im Protein verbunden, für die das Ssq1/Jac1-Chaperonsystem notwendig ist.

4.2.4 Yfh1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese

Die neurodegenerative Krankheit Friedreich-Ataxie wird durch Mutationen in Frataxin verursacht und hat unter anderem spinale Degeneration, Muskelatrophie und Polyneuropathie zur Folge [15]. In betroffenen Geweben sind Aktivitäten von Fe/S-Cluster-Enzymen reduziert, außerdem zeigen die Mitochondrien der Zellen erhöhte Eisenkonzentrationen [97]. Hefemitochondrien aus Deletionsstämmen des Frataxinhomologs Yfh1 akkumulieren ebenfalls Eisen [54]. Die erhöhten Eisenkonzentrationen und der damit verbundene oxidative Stress in Mitochondrien wurde als Grund für die erniedrigten Aktivitäten von Fe/S-Proteinen vorgeschlagen. Die in dieser Arbeit beobachtete erniedrigte Assemblierungsrate von Fe/S-Clustern in $\Delta yfh1$ -Mitochondrien lässt jedoch auf eine direkte Rolle von Yfh1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese schließen, was auch in späteren Arbeiten bestätigt wurde [24]. Welche Funktion könnte Yfh1 in der Fe/S-Cluster-Biosynthese spielen? Sowohl bakterielles als auch Hefe-Frataxin können *in vitro* Eisen binden. Die Bindung des Metalls findet über negativ geladene Aminosäureseitenketten des Proteins statt [2]. Möglicherweise stellt Yfh1 in der mitochondrialen Matrix Eisen für die Assemblierung von Fe/S-Clustern zur Verfügung. Die vorigen Überlegungen führen zu dem in Abbildung 4.2 dargestellten Modell der Fe/S-Cluster-Assemblierung.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Biogenese von Mitochondrien ist ein komplexer Prozess, wofür der Import von Vorstufenproteinen aus dem Cytosol in die mitochondrialen Subkompartimente notwendig ist. Matrixproteine falten nach ihrer Translokation mit Hilfe von Chaperonen in ihre aktive Konformation und Membranproteine werden in die Außen- oder Innenmembran integriert. Die Proteintranslokation in Mitochondrien ist relativ gut verstanden und über das Thema liegen zahlreiche Arbeiten vor (zusammengefasst in [40, 79, 91]). Im Gegensatz dazu ist über den Mechanismus der Assemblierung von importierten Polypeptidketten mit ihren zugehörigen Kofaktoren nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand zweier Beispiele die Kofaktorassemblierung in neu importierte Apo-Proteine untersucht.

Tim13 ist ein kleines Protein ohne N-terminale Importsequenz im Intermembranraum der Mitochondrien. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cystein-Motiv von Tim13 *in vivo* reduziert vorliegt und das Protein über die Cysteine Zinkionen binden kann. Endogenes Tim13 besitzt eine proteaseunzugängliche gefaltete Domäne, die das Cystein-Motiv beinhaltet. Die Faltung wird durch Bindung von Zinkionen stabilisiert. Entfaltetes Tim13 kann *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert werden, wofür die konservierten Cysteinreste des Proteins essentiell sind. Die Translokation von Tim13 über die mitochondriale Außenmembran findet in gestreckter Konformation über den TOM-Komplex statt. Im Intermembranraum wird der Kofaktor Zn^{2+} durch ein bis *dato* unbekanntes Metallochaperon in Tim13 assembliert, wodurch sich das Protein faltet. Da gefaltetes Tim13 nicht in der Lage ist den TOM-Komplex zu passieren, kann es nicht mehr aus dem Intermembranraum austreten. Der Import von Tim13 in den Intermembranraum findet unabhängig von Rezeptoren auf der *cis*- oder *trans*-Seite statt und wird nur durch die Faltung des Proteins ermöglicht (*Folding-trap*-Modell). Ein solcher Importmechanismus ist auch auf für andere kofaktorbindende Proteine des Intermembranraums wahrscheinlich.

Alle bekannten, für die Fe/S-Cluster-Assemblierung notwendigen Komponenten in *S. cerevisiae* sind in Mitochondrien lokalisiert und bilden die sogenannte ISC-Maschinerie. Bisher war es nicht möglich die Fe/S-Cluster-Biosynthese *in or-*

ganello zu messen. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, die Fe/S-Cluster-Assemblierung des Matrix lokalisierten Ferredoxins Yah1 zu beobachten. Die Apo- und Holo-Formen des Ferredoxins besitzen in einem Nativgel unterschiedliche Laufverhalten und lassen sich dadurch auftrennen. Wird die Vorstufenform des Yah1 in Mitochondrien importiert, kann so die Konversion der Apo- zur Holoform des Proteins gemessen werden. Mit diesem Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass die beiden mitochondrialen Chaperone Ssq1 und Jac1 funktionelle Komponenten der ISC-Maschinerie sind und eine Rolle in der Assemblierung von Fe/S-Clustern spielen.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Adam, M. Endres, C. Sirrenberg, F. Lottspeich, W. Neupert, and M. Brunner. Tim9, a new component of the tim22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J*, 18(2):313–9, Jan 15 1999.
- [2] S. Adinolfi, M. Trifuoggi, A. S. Politou, S. Martin, and A. Pastore. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet*, 11(16):1865–1877, Aug 2002.
- [3] U. Ahting, M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert, and S. Nussberger. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting tom channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 153(6):1151–60, Jun 11 2001.
- [4] U. Ahting, C. Thun, R. Hegerl, D. Typke, F. E. Nargang, W. Neupert, and S. Nussberger. The tom core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 147(5):959–68, Nov 29 1999.
- [5] H. Arlt, G. Steglich, R. Perryman, B. Guiard, W. Neupert, and T. Langer. The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J*, 17(16):4837–4847, Aug 1998.
- [6] K. P. Baker, A. Schaniel, D. Vestweber, and G. Schatz. A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature*, 348(6302):605–9, Dec 13 1990.
- [7] M. H. Barros, C. G. Carlson, D. M. Glerum, and A. Tzagoloff. Involvement of mitochondrial ferredoxin and cox15p in hydroxylation of heme o. *FEBS Lett*, 492(1-2):133–8, Mar 9 2001.
- [8] M. H. Barros and F. G. Nobrega. Yah1 of *saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene*, 233(1-2):197–203, Jun 11 1999.
- [9] M. H. Barros, F. G. Nobrega, and A. Tzagoloff. Mitochondrial ferredoxin is required for heme a synthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277(12):9997–10002, Mar 22 2002.
- [10] M. F. Bauer, C. Sirrenberg, W. Neupert, and M. Brunner. Role of tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87(1):33–41, Oct 4 1996.

- [11] F. Baumann, I. Milisav, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Ecm10, a novel hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 487(2):307–12, Dec 29 2000.
- [12] H. Beinert, R. H. Holm, and E. Münck. Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures. *Science*, 277(5326):653–9, Aug 1 1997.
- [13] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–1523, Nov 1979.
- [14] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, May 1976.
- [15] V. Campuzano, L. Montermini, M. D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, and A. Monticelli. Friedreich’s ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic gaa triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254):1423–7, Mar 8 1996.
- [16] E. H. Cox and G. L. McLendon. Zinc-dependent protein folding. *Curr Opin Chem Biol*, 4(2):162–165, Apr 2000.
- [17] E. A. Craig, J. Kramer, and J. Kosic-Smithers. Ssc1, a member of the 70-kda heat shock protein multigene family of *saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(12):4156–60, June 1987.
- [18] S. P. Curran, D. Leuenberger, W. Oppliger, and C. M. Koehler. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J*, 21(5):942–953, Mar 2002.
- [19] S. P. Curran, D. Leuenberger, E. Schmidt, and C. M. Koehler. The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol*, 158(6):1017–1027, Sep 2002.
- [20] G. Daum, S. M. Gasser, and G. Schatz. Import of proteins into mitochondria. energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21):13075–80, Nov 10 1982.
- [21] S. Ollagnier de Choudens, T. Mattioli, Y. Takahashi, and M. Fontecave. Iron-sulfur cluster assembly: characterization of isca and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J Biol Chem*, 276(25):22604–7, Jun 22 2001.
- [22] K. Diekert, A. I. de Kroon, U. Ahting, B. Niggemeyer, W. Neupert, B. de Kruijff, and R. Lill. Apocytochrome c requires the tom complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J*, 20(20):5626–35, Oct 15 2001.
- [23] W. J. Dower, J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13):6127–6145, Jul 1988.

- [24] G. Duby, F. Foury, A. Ramazzotti, J. Herrmann, and T. Lutz. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet*, 11(21):2635–2643, Oct 2002.
- [25] M. E. Dumont, T. S. Cardillo, M. K. Hayes, and F. Sherman. Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11(11):5487–96, November 1991.
- [26] M. E. Dumont, J. F. Ernst, and F. Sherman. Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem*, 263(31):15928–37, Nov 5 1988.
- [27] M. E. Dumont, J. F. Ernst, and F. Sherman. Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem*, 263(31):15928–15937, Nov 1988.
- [28] R. Dutkiewicz, B. Schilke, H. Kneiszner, W. Walter, E. A. Craig, and J. Marszalek. Ssq1, a mitochondrial hsp70 involved in iron-sulfur (fe/s) center biogenesis: Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* 2003 May 19; *J Biol Chem*, May 19 2003.
- [29] S. England and L. Siegel. Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *Methods Enzymol*, 13:99–106, 1969.
- [30] L. S. Field, Y. Furukawa, T. V. O’Halloran, and V. C. Culotta. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem*, 278(30):28052–28059, Jul 25 2003.
- [31] F. Foury and O. Cazzalini. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich’s ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, 411(2-3):373–377, Jul 1997.
- [32] O. Gakh, P. Cavadini, and G. Isaya. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, 1592(1):63–77, Sep 2002.
- [33] B. D. Gambill, W. Voos, P. J. Kang, B. Miao, T. Langer, E. A. Craig, and N. Pfanner. A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J Cell Biol*, 123(1):109–117, Oct 1993.
- [34] S. M. Gasser, G. Daum, and G. Schatz. Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21):13034–13041, Nov 1982.
- [35] S. C. Gill and P. H. Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182:319–326, 1989.
- [36] D. M. Glerum, A. Shtanko, and A. Tzagoloff. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 271(24):14504–14509, Jun 1996.

- [37] K. Hahne, V. Haucke, L. Ramage, and G. Schatz. Incomplete arrest in the outer membrane sorts nadh-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments. *Cell*, 79(5):829–39, Dec 2 1994.
- [38] F. U. Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–579, Jun 1996.
- [39] J. M. Herrmann, H. Koll, R. A. Cook, W. Neupert, and R. A. Stuart. Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*, 270(45):27079–27086, Nov 1995.
- [40] J. M. Herrmann and W. Neupert. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*, 3(2):210–214, Apr 2000.
- [41] J. M. Herrmann and W. Neupert. What fuels polypeptide translocation? an energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3):331–8, Aug 15 2000.
- [42] J. M. Herrmann, W. Neupert, and R. A. Stuart. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J*, 16(9):2217–2226, May 1997.
- [43] E. C. Hurt, B. Pesold-Hurt, and G. Schatz. The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *EMBO J*, 3(13):3149–56, Dec 20 1984.
- [44] L. T. Jensen and V. C. Culotta. Role of *saccharomyces cerevisiae* isa1 and isa2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol*, 20(11):3918–27, June 2000.
- [45] W. Jordi, C. Hergersberg, and B. de Kruijff. Bilayer-penetrating properties enable apocytochrome c to follow a special import pathway into mitochondria. *Eur J Biochem*, 204(2):841–846, Mar 1992.
- [46] P. J. Kang, J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E. A. Craig, and N. Pfanner. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348(6297):137–43, Nov 8 1990.
- [47] A. Kaut, H. Lange, K. Diekert, G. Kispal, and R. Lill. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem*, 275(21):15955–61, May 26 2000.
- [48] M. C. Kennedy and H. Beinert. The state of cluster sh and s2- of aconitase during cluster interconversions and removal. a convenient preparation of apoenzyme. *J Biol Chem*, 263(17):8194–8, Jun 15 1988.
- [49] K. Keyer and J. A. Imlay. Superoxide accelerates dna damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13635–40, Nov 26 1996.

- [50] M. Kiebler, R. Pfaller, T. Sollner, G. Griffiths, H. Horstmann, N. Pfanner, and W. Neupert. Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, 348(6302):610–6, Dec 13 1990.
- [51] R. Kim, S. Saxena, D. M. Gordon, D. Pain, and A. Dancis. J-domain protein, jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of fe-s cluster proteins. *J Biol Chem*, 276(20):17524–32, May 18 2001.
- [52] G. Kispal, P. Csere, B. Guiard, and R. Lill. The abc transporter atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett*, 418(3):346–50, Dec 1 1997.
- [53] G. Kispal, P. Csere, C. Prohl, and R. Lill. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J*, 18(14):3981–3989, Jul 1999.
- [54] S. A. Knight, N. B. Sepuri, D. Pain, and A. Dancis. Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J Biol Chem*, 273(29):18389–18393, Jul 1998.
- [55] C. M. Koehler, E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R. J. Schweyen, and G. Schatz. Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, 279(5349):369–73, Jan 16 1998.
- [56] C. M. Koehler, D. Leuenberger, S. Merchant, A. Renold, T. Junne, and G. Schatz. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2141–2146, Mar 1999.
- [57] C. M. Koehler, S. Merchant, W. Oppliger, K. Schmid, E. Jarosch, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz, and K. Tokatlidis. Tim9p, an essential partner subunit of tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J*, 17(22):6477–86, Nov 16 1998.
- [58] T. Komiya, S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz, and K. Mihara. Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J*, 17(14):3886–98, Jul 15 1998.
- [59] K. P. Kunkele, S. Heins, M. Dembowski, F. E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger, and W. Neupert. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, 93(6):1009–19, Jun 12 1998.
- [60] M. Kurz, H. Martin, J. Rassow, N. Pfanner, and M. T. Ryan. Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell*, 10(7):2461–2474, Jul 1999.
- [61] J. Kyshe-Anderson. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, 10:203–207, 1984.

- [62] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259):680–685, Aug 1970.
- [63] S. Laloraya, P. J. Dekker, W. Voos, E. A. Craig, and N. Pfanner. Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. *Mol Cell Biol*, 15(12):7098–7105, Dec 1995.
- [64] H. Lange, A. Kaut, G. Kispal, and R. Lill. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron- sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3):1050–5, Feb 1 2000.
- [65] H. Lange, T. Lisowsky, J. Gerber, U. Muhlenhoff, G. Kispal, and R. Lill. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase erv1p/alr in the maturation of cytosolic fe/s proteins. *EMBO Rep*, 2(8):715–20, August 2001.
- [66] I. Leibrecht and D. Kessler. A novel l-cysteine/cystine c-s-lyase directing [2fe-2s] cluster formation of synechocystis ferredoxin. *J Biol Chem*, 272(16):10442–7, Apr 18 1997.
- [67] J. Li, M. Kogan, S. A. Knight, D. Pain, and A. Dancis. Yeast mitochondrial protein, nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem*, 274(46):33025–34, Nov 12 1999.
- [68] R. Lill and G. Kispal. Maturation of cellular fe-s proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25(8):352–6, August 2000.
- [69] R. Lill, R. A. Stuart, M. E. Drygas, F. E. Nargang, and W. Neupert. Import of cytochrome c heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space. *EMBO J*, 11(2):449–56, February 1992.
- [70] T. Lutz, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J*, 22(17):4400–4408, Sep 2003.
- [71] T. Lutz, B. Westermann, W. Neupert, and J. M. Herrmann. The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol*, 307(3):815–825, Mar 2001.
- [72] U. C. Manning-Krieg, P. E. Scherer, and G. Schatz. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J*, 10(11):3273–3280, Nov 1991.
- [73] L. Manzella, M. H. Barros, and F. G. Nobrega. Arh1 of *saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast*, 14(9):839–46, Jun 30 1998.
- [74] J. Martin, K. Mahlke, and N. Pfanner. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*, 266(27):18051–7, Sep 25 1991.
- [75] A. Mayer, W. Neupert, and R. Lill. Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*, 80(1):127–37, Jan 13 1995.

- [76] A. Mayer, W. Neupert, and R. Lill. Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem*, 270(21):12390–7, May 26 1995.
- [77] U. Muhlenhoff and R. Lill. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3):370–382, Aug 2000.
- [78] Y. Nakai, M. Nakai, H. Hayashi, and H. Kagamiyama. Nuclear localization of yeast nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem*, 276(11):8314–20, Mar 16 2001.
- [79] W. Neupert. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 66:863–917, 1997.
- [80] W. Neupert and M. Brunner. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(8):555–65, August 2002.
- [81] D. W. Nicholson, C. Hergersberg, and W. Neupert. Role of cytochrome c heme lyase in the import of cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem*, 263(35):19034–19042, Dec 1988.
- [82] K. Nishio and M. Nakai. Transfer of iron-sulfur cluster from nifu to apoferredoxin. *J Biol Chem*, 275(30):22615–8, Jul 28 2000.
- [83] M. Nobumoto, M. Yamada, S. Song, S. Inouye, and A. Nakazawa. Mechanism of mitochondrial import of adenylate kinase isozymes. *J Biochem (Tokyo)*, 123(1):128–35, January 1998.
- [84] T. V. O’Halloran and V. C. Culotta. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem*, 275(33):25057–25060, Aug 2000.
- [85] K. Okamoto, A. Brinker, S. A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert, and M. Brunner. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J*, 21(14):3659–71, Jul 15 2002.
- [86] C. E. Outten and T. V. O’Halloran. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 292(5526):2488–2492, Jun 2001.
- [87] S. A. Paschen, U. Rothbauer, K. Kaldi, M. F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J*, 19(23):6392–6400, Dec 2000.
- [88] H. R. Pelham and R. J. Jackson. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67(1):247–256, AUG 1976.
- [89] W. Pelzer, U. Muhlenhoff, K. Diekert, K. Siegmund, G. Kispal, and R. Lill. Mitochondrial isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett*, 476(3):134–9, Jul 7 2000.

- [90] R. Pfaller, H. F. Steger, J. Rassow, N. Pfanner, and W. Neupert. Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J Cell Biol*, 107(6 Pt 2):2483–2490, Dec 1988.
- [91] N. Pfanner, E. A. Craig, and A. Honlinger. Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:25–51, 1997.
- [92] N. Pfanner, M. G. Douglas, T. Endo, N. J. Hoogenraad, R. E. Jensen, M. Meijer, W. Neupert, G. Schatz, U. K. Schmitz, and G. C. Shore. Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem Sci*, 21(2):51–52, Feb 1996.
- [93] N. Pfanner, M. Tropschug, and W. Neupert. Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell*, 49(6):815–823, Jun 1987.
- [94] D. C. Radisky, M. C. Babcock, and J. Kaplan. The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem*, 274(8):4497–4499, Feb 1999.
- [95] J. Rassow, B. Guiard, U. Wienhues, V. Herzog, F. U. Hartl, and W. Neupert. Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J Cell Biol*, 109(4 Pt 1):1421–1428, Oct 1989.
- [96] K. M. Robinson, A. von Kieckebusch-Guck, and B. D. Lemire. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant disrupted for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. *J Biol Chem*, 266(32):21347–21350, Nov 1991.
- [97] A. Rotig, P. de Lonlay., D. Chretien, F. Foury, M. Koenig, D. Sidi, A. Munnich, and P. Rustin. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, 17(2):215–217, Oct 1997.
- [98] N. Rowley, C. Prip-Buus, B. Westermann, C. Brown, E. Schwarz, B. Barrell, and W. Neupert. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, 77(2):249–259, Apr 1994.
- [99] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, Jan 1988.
- [100] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, Dec 1985.
- [101] P. E. Scherer, U. C. Krieg, S. T. Hwang, D. Vestweber, and G. Schatz. A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein. *EMBO J*, 9(13):4315–4322, Dec 1990.

- [102] B. Schilke, J. Forster, J. Davis, P. James, W. Walter, S. Laloraya, J. Johnson, B. Miao, and E. Craig. The cold sensitivity of a mutant of *saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial dna. *J Cell Biol*, 134(3):603–13, August 1996.
- [103] B. Schilke, C. Voisine, H. Beinert, and E. Craig. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18):10206–11, Aug 31 1999.
- [104] H. C. Schneider, J. Berthold, M. F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert. Mitochondrial hsp70/mim44 complex facilitates protein import. *Nature*, 371(6500):768–74, Oct 27 1994.
- [105] H. C. Schneider, B. Westermann, W. Neupert, and M. Brunner. The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *EMBO J*, 15(21):5796–5803, Nov 1996.
- [106] A. D. Sharrocks. A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene*, 138(1-2):105–108, Jan 1994.
- [107] R. S. Sikorski and P. Hieter. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1):19–27, May 1989.
- [108] S. M. Simon, C. S. Peskin, and G. F. Oster. What drives the translocation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9):3770–3774, May 1992.
- [109] C. Sirrenberg, M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by tim22. *Nature*, 384(6609):582–5, Dec 12 1996.
- [110] C. Sirrenberg, M. Endres, H. Folsch, R. A. Stuart, W. Neupert, and M. Brunner. Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins tim10/mrs11 and tim12/mrs5. *Nature*, 391(6670):912–5, Feb 26 1998.
- [111] T. Stan, U. Ahting, M. Dembowski, K. P. Kunkele, S. Nussberger, W. Neupert, and D. Rapaport. Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J*, 19(18):4895–4902, Sep 2000.
- [112] H. Steiner, A. Zollner, A. Haid, W. Neupert, and R. Lill. Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem*, 270(39):22842–9, Sep 29 1995.
- [113] J. Strain, C. R. Lorenz, J. Bode, S. Garland, G. A. Smolen, D. T. Ta, L. E. Vickery, and V. C. Culotta. Suppressors of superoxide dismutase (*sod1*) deficiency in *saccharomyces cerevisiae*. identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem*, 273(47):31138–44, Nov 20 1998.

- [114] R. A. Stuart, D. M. Cyr, E. A. Craig, and W. Neupert. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends Biochem Sci*, 19(2):87–92, Feb 1994.
- [115] R. A. Stuart and W. Neupert. Apocytochrome c: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. *Biochimie*, 72(2-3):115–121, Feb 1990.
- [116] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4354, Sep 1979.
- [117] S. Vial, H. Lu, S. Allen, P. Savory, D. Thornton, J. Sheehan, and K. Tokatlidis. Assembly of tim9 and tim10 into a functional chaperone. *J Biol Chem*, 277(39):36100–8, Sep 27 2002.
- [118] L. E. Vickery, J. J. Silberg, and D. T. Ta. Hsc66 and hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from escherichia coli. *Protein Sci*, 6(5):1047–56, May 1997.
- [119] C. Voisine, Y. C. Cheng, M. Ohlson, B. Schilke, K. Hoff, H. Beinert, J. Marszalek, and E. A. Craig. Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1483–1488, Feb 2001.
- [120] C. Voisine, B. Schilke, M. Ohlson, H. Beinert, J. Marszalek, and E. A. Craig. Role of the mitochondrial hsp70s, ssc1 and ssq1, in the maturation of yfh1. *Mol Cell Biol*, 20(10):3677–84, May 2000.
- [121] G. von Heijne. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, 5(6):1335–1342, 1986.
- [122] W. Voos, B. D. Gambill, S. Laloraya, D. Ang, E. A. Craig, and N. Pfanner. Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol Cell Biol*, 14(10):6627–6634, Oct 1994.
- [123] I. Wagner, H. Arlt, L. van Dyck., T. Langer, and W. Neupert. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J*, 13(21):5135–5145, Nov 1994.
- [124] B. Westermann, B. Gaume, J. M. Herrmann, W. Neupert, and E. Schwarz. Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol Cell Biol*, 16(12):7063–7071, Dec 1996.
- [125] B. Westermann, C. Prip-Buus, W. Neupert, and E. Schwarz. The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J*, 14(14):3452–3460, Jul 1995.
- [126] G. Wu, S. S. Mansy, S. P. Wu Sp, K. K. Surerus, M. W. Foster, and J. A. Cowan. Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (isu1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry*, 41(15):5024–32, Apr 16 2002.

- [127] S. P. Wu, G. Wu, K. K. Surerus, and J. A. Cowan. Iron-sulfur cluster biosynthesis. kinetic analysis of [2Fe-2S] cluster transfer from holo isu to apo fd: role of redox chemistry and a conserved aspartate. *Biochemistry*, 41(28):8876–85, Jul 16 2002.
- [128] L. Zheng, V. L. Cash, D. H. Flint, and D. R. Dean. Assembly of iron-sulfur clusters. identification of an iscsua-hscba-fdx gene cluster from azotobacter vinelandii. *J Biol Chem*, 273(21):13264–72, May 22 1998.
- [129] L. Zheng and D. R. Dean. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J Biol Chem*, 269(29):18723–6, Jul 22 1994.
- [130] L. Zheng, R. H. White, V. L. Cash, and D. R. Dean. Mechanism for the desulfurization of l-cysteine catalyzed by the nifs gene product. *Biochemistry*, 33(15):4714–20, Apr 19 1994.
- [131] L. Zheng, R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack, and D. R. Dean. Cysteine desulfurase activity indicates a role for nifs in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(7):2754–8, Apr 1 1993.

Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- T. Lutz, W. Neupert, and J. M. Herrmann. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J*, 22(17): 4400-4408, Sep 2003.
- G. Duby, F. Foury, A. Ramazzotti, J. M. Herrmann, and T. Lutz. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Human Molecular Genetics*, 11(21): 2635-2643, Oct 2002.
- T. Lutz, B. Westermann, W. Neupert, J. M. Herrmann. The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol*, 307(3): 815-825, Mar 2001.

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die lehrreiche Zeit an seinem Institut und seine Unterstützung danken. Sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Erfolg meiner Arbeit und zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Reinhold Herrmann danke ich vielfach für die Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Besonders will ich mich bei Dr. Johannes Herrmann bedanken, in dessen Gruppe meine Arbeit entstand. Er hat mich als „Novizen der Biochemie“ mit dem Arbeitsfeld und den notwendigen Techniken vertraut gemacht, was eine entscheidende Hilfe für meinen Start in die Doktorarbeit war. Durch seine vielfältigen Anregungen und Ideen, sowie zahlreichen Diskussionen, hat er zum Gelingen meiner Arbeit entscheidend beigetragen.

Außerdem will ich den Kollegen der Hannes-Gruppe danken, Stephan – für viele musikalische Eskapaden in unserem Labor und anderswo –, Soledad my Spanish teacher!, Gregor Linux-Master für viele Sitzungen und Diskussionen, Ilona, Marc, Frank, Martin und last but not least Sandra – fast zeitgleich mit mir dem Labor entkommen... allen anderen Labor-Kollegen, Stefan alias Ray (vamos a encontrarnos en España), Béatrice, Kai D., Tung, Flo, Jutta, Petra R., Michael G. und Prof. Dr. Alexander Tzagoloff für nette Diskussionen über die Wissenschaft, Michael K., Andreja, Tincuta, Shukry, Kai H., Ute, den „Jungs von der Werkstatt“ (Danke für den Proberaum!), den „Spülfrauen“, Gülü, den DJs von M94.5, den Dönerläden der Goethestraße und den Leuten die \LaTeX programmiert haben.

Lebenslauf

	Thomas Lutz
13.12.1972	geboren in Dahn
1979-1983	Besuch der Grundschule Dahn
1983-1992	Besuch des Otfried-von-Weißenburg-Gymnasiums Dahn
1992-1994	Grundstudium Chemie an der Universität Kaiserslautern
1994-1997	Hauptstudium Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern
1997-1998	Diplomarbeit an der Université de Bourgogne (Dijon, Frankreich) bei Prof. Dr. N. Latruffe „Das fluoreszierende Fibrat DNS-X – Synthese – Wirkung als Peroxisomenproliferator – Analytik“
1998-1999	Leitung des QS-Labors der PROVISCO AG (Hauptwil, Schweiz)
1999	Beginn der vorliegenden Arbeit an der LMU München bei Prof. Dr. Dr. W. Neupert in der Arbeitsgruppe von Dr. J. M. Herrmann